

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

**BRUNO DO AMARAL CRISPIM**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM OVINOS NATURALIZADOS DO  
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

**DOURADOS - MS  
2013**

**BRUNO DO AMARAL CRISPIM**

**DIVERSIDADE GENÉTICA EM OVINOS NATURALIZADOS DO  
PANTANAL SUL-MATO-GROSSENSE**

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 Bruno do Amaral Crispim, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral/Bioprospecção, sob a orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Alexéia Barufatti Grisolia e coorientação do Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno

**DOURADOS-MS**

**2013**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

C932d	<p>Crispim, Bruno do Amaral. Diversidade genética em ovinos naturalizados do pantanal sul-mato-grossense. / Bruno do Amaral Crispim. – Dourados, MS : UFGD, 2015. 77f.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Alexeia Barufatti Grisolia. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Variabilidade genética. 2. Recurso genético. 3. Ovelha pantaneira. I. Título.</p> <p>CDD – 633.31</p>
-------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

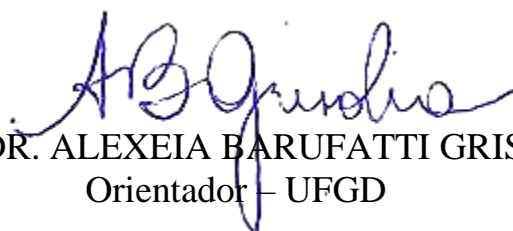
**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**

“Diversidade genética em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Mato-Grossense”

Por

**BRUNO DO AMARAL CRISPIM**

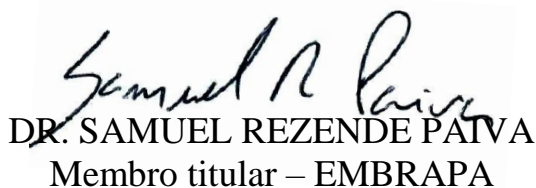
Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD),  
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de  
MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - Área de Concentração: “Bioprospecção”



PROF<sup>a</sup>. DR. ALEXEIA BARUFATTI GRISOLIA  
Orientador – UFGD



DR<sup>a</sup>. ANDRÉA ALVES DO EGITO  
Membro titular – EMBRAPA



DR. SAMUEL REZENDE PATVA  
Membro titular – EMBRAPA

Aprovada em: 05 de março de 2013

*Aos meus pais que sempre estiveram ao meu lado me  
fornecendo amparo e ajuda emocional para que eu pudesse  
seguir sempre com otimismo, força e fé no senhor nosso Deus*

## AGRADECIMENTOS

Esse é um momento que nos tira o peso de tanto trabalho e escrita e nos faz reconhecer o quanto estivemos cercados de pessoas que compartilharam conosco esta experiência e fizeram dela um processo coletivo.

Antes de agradecer às pessoas que foram significativas para a concretização deste trabalho, agradeço primeiramente a Deus por ter me dado o dom da perseverança. Sim! Agradeço sim a Deus, pois tantas vezes quando o cansaço e o desânimo me abateu eu sentia que Ele cuidava de mim, renovava minhas forças e me fazia persistir diante dos obstáculos.

Agradeço à minha família, sobretudo, à minha mãe, que sempre apoiou os meus sonhos e os meus projetos em todos os sentidos. Mais do que isso, na escola da vida, ela foi e é a minha maior instrutora: ensinou-me a ser digno, honesto, honrado, corajoso, determinado e a nunca, mas nunca desistir daquilo que me propus a conquistar.

A meus grande amigos do grupo de pesquisa: Alexandre Campos Banari, André Vieira, Danielly Beraldo dos Santos Silva, Lara Endres da Silva, Joyce Azambuja de Oliveira e Jussara Oliveira Vaini, que durante todos estes anos sempre estiveram ao meu lado, me ajudando, me dando força e coragem para prosseguir, trazendo momentos de descontração e palhaçadas para me alegrarem quando as coisas não estavam indo muito bem, enfim...Foram de extrema importância tê-los como amigos, companheiros e irmãos.

Agradeço as minhas amigas do Mestrado Ana Paula Agüero, Kátia Ávila Antunes, Débora Baldívia da Silva que foram pessoas que puderam desfrutar comigo de muitos momentos de estudos e descontrações e que na hora certa conseguimos superar todos os nossos limites e sonhos que ainda serão alcançados. A todos os meus colegas de mestrado.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alexéia Barufatti Grisolia. MUITÍSSIMO Obrigado pela confiança, por ter acreditado em mim e ter me orientado pelo princípio da humanidade e da coerência. Obrigada pelos momentos de descontração, noites escrevendo e o vai e vem de correções de artigos durante madrugadas infinitas, mas sempre com sua infinita paciência em me ajudar e ensinar, fez dessa trajetória um marco importantíssimo na minha vida, uma maravilhosa caminhada de muito esforço, dedicação e trabalhos. A senhora sabe o quanto a concretização dessa etapa é significativamente importante em minha vida.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno, muito obrigado por ter confiado a mim o desenvolvimento deste maravilhoso projeto ao qual sem seu auxílio nas coletas e no desenvolvimento do mesmo seria impossível eu estar nesse ponto hoje.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação – Mestrado em Biologia Geral: Bioprospecção da UFGD reitero não somente os meus agradecimentos, mas o reconhecimento pelos saberes partilhados, pela competência, empenho e dedicação que empreenderam o ofício docente.

Agradeço imensamente a Dr.<sup>a</sup> Andréa Alves do Egito da Embrapa Grado de Corte, por ter se disposto em deixar seus inúmeros afazeres para participar de minha banca, tanto de qualificação quanto da defesa. Não me sinto apenas agradecido, mas honrado pelas contribuições e apontamentos tão valiosos. Não poderia deixar de citar ainda, a tamanha gentileza em me conceder um treinamento para a análise dos dados, que foram de fundamental importância para a obtenção dos resultados e desenvolvimento dos artigos a serem apresentados na minha dissertação.

Agradeço também imensamente o Dr. Samuel Rezende Paiva da Embrapa Recursos Genéticos, por ter se disposto em deixar seus inúmeros afazeres para participar de minha banca de defesa. Não me sinto apenas agradecido, mas honrado pelas contribuições e apontamentos tão valiosos pelo um dos maiores referenciais em estudo genéticos em ovinos no Brasil.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	01
ABSTRACT.....	02
REVISÃO DE LITERATURA.....	03
OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	21
CAPITULO I - Diversidade genética em ovinos localmente adaptados do Pantanal Sulmatogrossense.....	22
CAPITULO II - Aplicação de marcadores microssatélites na conservação e melhoramento de rebanhos de ovinos Pantaneiros.....	35
ANEXOS – Versões dos artigos publicados.....	47



## RESUMO

As raças ovinas brasileiras, oriundas principalmente de animais trazidos ao país pelos colonizadores portugueses e espanhóis a partir do descobrimento, foram submetidas à seleção natural em função dos ambientes e condições edafoclimáticas diversas possibilitando a formação de raças atualmente denominadas crioulas, localmente adaptadas, nativas ou naturalizadas. O objetivo do presente estudo foi determinar a diversidade genética do grupamento Pantaneiro, sua relação genética com as demais raças criadas no Estado do Mato Grosso do Sul, os padrões de introgressão gênica e miscigenação entre as mesmas visando gerar informações úteis para a conservação de animais crioulos pantaneiros, grupamento genético de grande importância e pouco pesquisado no Estado. Para tal avaliação foram utilizados 8 locos de marcadores microssatélites em animais naturalizados (Pantaneiros) e em outros oriundos de 6 raças criadas no Estado do Mato Grosso do Sul (Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile de France, Suffolk e Hampshire Down). Parâmetros referentes a capacidade dos locos microssatélites servirem para discriminar indivíduos/populações de ovinos pantaneiros de diferentes regiões, serem utilizados em testes de exclusão de paternidade, avaliação de diversidade genética também foram estimados. Mediante as análises dos resultados foi possível concluir que ovinos crioulos pantaneiros podem constituir uma raça, com ampla diversidade genética e, podendo ser utilizada como fonte de recursos genéticos para a região.

**Palavras-chave: variabilidade genética, recurso genético, ovelha Pantaneira**

## **ABSTRACT**

The Brazilian sheep breeds, originated mainly from animals brought to the country by Spanish and Portuguese colonists from the discovery, were subjected to natural selection depending on soil and climatic conditions and environments allowing the formation of several breeds currently called Creole, locally adapted, native or naturalized. The aim of this study was to determine the genetic diversity of the grouping Pantaneiro, their genetic relationship with other breeds reared in the state of Mato Grosso do Sul, the patterns of gene introgression and admixture between them in order to generate useful information for conservation of animals Creoles wetland genetic grouping of great importance and little researched in the state. For this review we used eight loci microsatellite markers in animals naturalized (Pantaneiros) and other breeds raised from 6 in the state of Mato Grosso do Sul (Bergamácia, Dorper, White Dorper, Ile de France, Suffolk and Hampshire Down). Parameters on the ability of microsatellite loci serve to discriminate individuals/sheep populations from different regions of the Pantanal, be used in paternity exclusion tests, assessment of genetic diversity were also estimated. Upon analyzing the results it was concluded that sheep criolos wetland may constitute a race, with wide genetic diversity, and can be used as a source of genetic resources for the region.

**Key-words: genetic variability, genetic resource sheep breeds, pantanal sheep**

# **REVISÃO DE LITERATURA**

## **MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA E RELAÇÃO EVOLUTIVA DE OVINOS NATURALIZADOS NO BRASIL**

**Artigo de Revisão Publicado:**

**African Journal of Biotechnology**

**Vol. 11(90), pp. 15617-15625, 8 November, 2012**

**Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>**

**DOI: 10.5897/AJB12.2275**

**ISSN 1684–5315 ©2012 Academic Journals.**

# MARCADORES MOLECULARES PARA ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA E RELAÇÃO EVOLUTIVA DE OVINOS NATURALIZADOS NO BRASIL

**Bruno do Amaral Crispim<sup>1</sup>, Luiz Augusto Cauz dos Santos<sup>1</sup>, Márcia Cristina Matos<sup>2</sup>,  
Leonardo de Oliveira Seno<sup>3</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados/MS, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal/SP, Brasil

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados/MS, Brasil  
brunocrispim.bio@gmail.com

## **Resumo**

Os ovinos naturalizados no Brasil são originários de diversas raças trazidas pelos colonizadores portugueses e espanhóis que, com o passar dos anos, sofreram evolução e adaptações às variações climáticas e adquiriram tolerância ou resistência a doenças, características adaptativas de fundamental importância para a sobrevivência desses animais. Os marcadores moleculares são amplamente utilizados nos estudos de variabilidade genética nas mais diversas espécies, de modo que marcadores moleculares como AFLP, RFLP, microssatélite, mtDNA, SNP e dentre outros, têm auxiliado na caracterização da diversidade genética, definição de estruturas populacionais e investigação da história natural, comportamento e evolução das diversas raças ovinas. Dentro desse contexto, apresentamos uma revisão sobre a utilização desses marcadores moleculares nos estudos que abordam os aspectos ecológicos e conservacionistas das raças ovinas naturalizadas brasileiras.

**Palavras-chave:** genética de conservação, marcadores moleculares, ovinos.

## **1- INTRODUÇÃO**

As raças ovinas brasileiras são oriundas de animais que foram trazidos ao país principalmente a partir do descobrimento pelos colonizadores portugueses e espanhóis. No decorrer dos anos, estas raças foram submetidas à seleção natural em função dos diferentes ambientes e condições edafoclimáticas, raças atualmente conhecidas como crioulas, locais, nativas ou naturalizadas (Mariante et al., 1999). Dados do último censo agropecuário realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) mostraram que o rebanho ovino brasileiro é constituído por mais de 17 milhões de cabeças, presentes principalmente nas regiões Sul e Nordeste.

A ovinocultura de corte constitui boa opção de criação aos pecuaristas em função dos altos preços alcançados, como também pelo crescente aumento na demanda da carne ovina, mais especificamente pela carne de cordeiro (Aro et al., 2007). As raças ovinas naturalizadas se destacam pelas características de rusticidade e capacidade de adaptação a regiões de clima tropical e

subtropical, o que garante que essas raças possuam atributos importantes para considerá-las detentoras de recursos genéticos para uso futuro.

As raças naturalizadas brasileiras são, em geral, formadas por animais de pequeno porte e que foram, até o momento, submetidos a baixas taxas de seleção artificial e melhoramento genético, sendo pouco especializadas na produção intensiva de leite e/ou carne (Paiva, 2005a). Na tabela 1 estão descritas informações gerais sobre as raças naturalizadas que mais se destacam no país.

**Tabela 1.** Origem, local de ocorrência e características gerais das raças de ovinos naturalizados no Brasil.

Raças Naturalizadas	Origem	Local de Ocorrência	Características	Referência
Crioula Lanada	Cruzamento entre raças locais e importadas tais como: Hispânica Lacha, Romney Marsh e Corriedale, bem como rebanhos introduzidos por colonizadores portugueses	Rio Grande do Sul; Também encontrado pela América do Sul (do Peru ao Uruguai)	Possui a cara e as extremidades descobertas. A região com lã varia do branco ao preto, tamanho médio; aptidão para produção de lã; resistente a endoparasitas.	Mariante et al., 2003; ARCO, 2011
Santa Inês	Cruzamento das raças Bergamácia, Morada Nova e crioulos do Nordeste (possivelmente originários da África)	Nordeste brasileiro	São deslanados, com pêlos curtos e de grande porte. Sua carne é de excelente qualidade e baixo teor de gordura. Com importância econômica em função do seu porte e adaptação ao ambiente.	Mariante et al., 2003; Paiva, 2005a
Morada Nova	Cruzamentos entre raça africana e portuguesa Bordaleiro	Nordeste	São deslanados, mochos, pelagem vermelha, branca ou creme, com ou sem brincos. Destinados a produção de carne e pele de alta qualidade. Fonte de proteína às populações dessas localidades.	Oklahoma State University, 2007; ARCO, 2011
Bergamácia Brasileira	Originária da Itália, possivelmente vinda do Sudão	Região Nordeste (Bahia) e um pouco na região Centro-Oeste do país.	São de grande porte, lanados e brancos. É rústico e de múltipla utilidade para produção de carne, lã e leite	ARCO, 2011
Somalis Brasileira	Somália e Etiópia, com ancestral remoto ovino Urial.	Nordeste (Ceará e Rio Grande do Norte)	Prolífera, garupa gorda e com alguma lã no corpo, com aptidão para carne e pele	ARCO, 2011
Damara (Rabo Largo)	Noroeste da Namíbia e Sul da Angola.*	Nordeste, regiões áridas	Porte médio com corpo longo e profundo, com aptidão para carne e pele (variando de vermelha, branca e suas combinações)	ARCO, 2011,
Barriga Preta	Origem africana, com influência de raças européias	Alguns locais no Nordeste e um núcleo de conservação em Roraima	É altamente prolífera (maior do mundo), eficiência reprodutiva, são animais deslanados,	Oklahoma State University, 2007

\* A hipótese que Rabo Largo seja derivada da Damara não foi confirmada por microssatélites (Paiva, 2005a).

A partir do século XX, em razão de cruzamentos indiscriminados com animais de raças exóticas, importadas principalmente da África e Europa, foi colocada em risco a existência e a preservação das raças naturalizadas que hoje são importante patrimônio genético (Morais, 2001). Deve-se ressaltar que esses animais apresentam características que podem ser consideradas úteis tanto do ponto de vista produtivo quanto adaptativo, tais como: tolerância ou resistência a doenças e parasitas e amplas variações adaptativas relacionadas à disponibilidade e qualidade de alimento e água. Assim sendo, os animais melhor adaptados e/ou mais resistentes sobreviveram e se reproduziram até os dias atuais. Desse modo, as raças naturalizadas constituem resultado da competência do processo de seleção natural ao longo de anos.

Pesquisas visando à conservação e o melhoramento genético das raças naturalizadas são de grande importância para a seleção dos animais, com a finalidade de controlar cruzamentos, evitando endogamia e cruzamentos indiscriminados para que, dessa forma, as raças puras sejam conservadas. Nesse sentido, é necessário buscar um sistema de produção que torne mais evidente suas potencialidades, para que as mesmas sejam reconhecidas pelos criadores e que estes percebam a possibilidade da utilização das raças locais para obter maior retorno financeiro (Notter, 1999).

Estudos relacionados ao conhecimento de características adaptativas das diferentes raças ao ambiente são de fundamental importância a fim de suportar os sistemas de produção na pecuária baseada nas raças adaptadas, reduzindo o impacto sobre o ambiente e obtendo melhores produtos para o consumo.

Nos últimos anos, com a evolução tecnológica, novas ferramentas moleculares foram desenvolvidas e ajudam a compreender a origem e o processo de domesticação das espécies domésticas. Essas ferramentas têm, portanto, auxiliado na compreensão das relações evolutivas, taxonomia e demografia de uma ampla diversidade de espécies, fornecendo subsídios importantes tanto na identificação de áreas prioritárias para programas de preservação, quanto no entendimento da diversidade genética em espécies domésticas e silvestres ameaçadas de extinção (Grisolia and Rosa and Paiva, 2009).

Recentemente, os marcadores do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) trouxeram novas perspectivas para estudos genômicos e em particular, para a investigação de diversidade do genoma dentro e entre indivíduos e populações, da estrutura populacional, na busca pelos genes causadores de doenças e na identificação de assinaturas deixadas pela seleção (Pariset et al., 2012).

Dessa maneira, essa revisão tem por finalidade discorrer sobre a evolução do uso dos marcadores moleculares nos estudos de diversidade genética e relações evolutivas da espécie ovina, com o devido enfoque para as raças naturalizadas no Brasil.

## 2- MARCADORES MOLECULARES NUCLEARES

Os marcadores moleculares podem ser considerados qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA correspondente a regiões expressas ou não do genoma (Ferreira and Grattapaglia, 1996). Inicialmente foram desenvolvidos marcadores isoenzimáticos, que são produtos diretos da expressão gênica (Oliveira et al., 2002) e, posteriormente, vieram os marcadores que utilizam técnicas moleculares que permitem a amplificação de DNA a partir de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

A partir de pesquisas relacionadas aos padrões de variância genética dentro de uma população para determinados locos de marcadores é possível minimizar o impacto gerado pelos mais diversos cruzamentos entre os animais naturalizados, garantindo a conservação da diversidade genética. Esses estudos permitem gerar informações relativas à perda de variabilidade genética, intra-população, como consequência da redução do tamanho efetivo da população, conduzindo ao aumento da consanguinidade e da deriva genética (Kantanen et al., 1999).

A utilização de marcadores moleculares nucleares proporciona o aumento da eficiência de um programa de melhoramento genético, por meio da seleção evitando os cruzamentos de mesma geração (Melo et al., 2008). Atualmente, os marcadores polimórficos mais utilizados para a análise de diversidade genética são AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), PCR/RFLP (*Restriction Fragment Length Polimorphism-Polimerase Chain Reaction*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), Microssátelites ou STR (Simple Sequence Repeats), SRY (sex-determining region Y) e SNP.

A técnica de AFLP está baseada na amplificação por PCR de um subconjunto de fragmentos que foram obtidos a partir da digestão do DNA genômico por enzimas de restrição do tipo II, que clivam o DNA em sítios específicos (Lopes et al., 2002). A utilização desse tipo de marcador foi eficiente nos estudos de diversidade genética em ovinos, tais como o de Xiao et al. (2009) que realizou análise desse marcador em seis raças de ovinos em Xinjian na China.

A RFLP-PCR é um marcador no qual a detecção de padrões de polimorfismo entre indivíduos é baseada na diferença de tamanho dos fragmentos de restrição gerados por digestão de endonuclease a partir de uma região amplificada. A análise de marcadores moleculares por PCR-RFLP em espécies filogeneticamente próximas tem sido usada para elucidar classificações taxonômicas ambíguas. Paiva et al. (2005a) utilizando este marcador em parte do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) (fragmento de 1052 pares de bases) demonstraram que as principais raças de ovinos naturalizados do Brasil foram classificadas de origem européia, tais como Santa Inês e Bergamácia, porém algumas outras raças naturalizadas, como a Somalis e Morada Nova demonstraram ter origem africana.

Estudos com RAPD é baseado na reação de cadeia de polimerase utilizando primers homólogos a sítios alvos no genoma. Este marcador auxilia no conhecimento dos padrões de variação genética, permitindo a elaboração de medidas para conservação de espécies ameaçadas ou em perigo de extinção. Em meio às vantagens na utilização deste marcador, algumas desvantagens podem ser encontradas como baixa reprodutibilidade (Costa et al., 2008) a formação de heteroduplex é característica de dominância (Binneck et al., 2002). Contudo, alguns estudos demonstraram eficiência na utilização desta técnica para estudos de diversidade genética em raças ovinas paquistanesas (Qasim et al., 2011), indianas (Kumar et al., 2003) e turcas (Elmaci, 2007).

Outro marcador amplamente utilizado para estudos de caracterização de variabilidade genética, identificação individual, testes de paternidade, construção de mapas genéticos, estudos de genética de populações é o STS (*Sequence Tagged Sites*), Microsatélite ou SSR. Os microsatélites possuem alta taxa de mutação, abundância e distribuição através do genoma, neutralidade, codominância e fácil automatização dos procedimentos analíticos que permitem a estimação de diversidade genética entre e dentro de raças (Ligdaa et al., 2009). Possuem boa reprodutibilidade e alto grau de polimorfismo (Cañon et al., 2000) e, são amplamente utilizados para a caracterização de diversidade genética de raças de ovinos (Ramey II et al., 2000; Arranz et al., 2001).

Marcadores Moleculares de SRY são extremamente sensíveis para estudo ligados à herança paterna, para a detecção da história genética, dos processos de domesticação de raças, das relações populacionais e do fluxo gênico no sexo masculino. Portanto, a utilização de marcadores aliados ao cromossomo Y pode-se ter uma possível visão específica do fluxo gênico masculino. O número de estudos realizados em ovelhas utilizando cromossomo Y tem sido limitado quando comparado a outras espécies animais como bovinos (Hanotte et al., 2000; Pérez-Pardal et al., 2009) e caprinos (Pidancier et al., 2006; Sechi et al., 2009). Em ovinos, apenas um locus de microsatélite (SRYM18) e oito SNP, localizado na região 5' do promotor do gene sexo-determinante (SRY), foram identificados (Meadows et al., 2006; Meadows and Kijas, 2009).

Os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (adenina, citosina, timina e guanina). Os SNPs são bi-alélicos, ou seja, geralmente são encontrados apenas duas variantes em uma espécie (por exemplo, um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C). Os SNPs são extremamente abundantes no genoma de espécies não-endogâmicas e podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada. Até recentemente o método padrão de prospecção de marcadores SNP era baseado no método de sequenciamento Sanger (Caetano, 2009). Atualmente, as tecnologias de sequenciamento de segunda geração (Roche 454 - Margulies et al.,



2005; Solexa-Illumina – Bennett 2004 and ABI Solid -Valouev et al., 2008) são capazes de produzir vastos conjuntos de dados, na ordem de milhões de bases sequenciadas.

## 2.1 MICROSSATELITES

Os microssatélites são os marcadores mais utilizados atualmente para estudo de diversidade genética e a estrutura de populações dos animais domésticos (Baumung et al., 2004). A abundância deste marcador ao longo do genoma, o seu alto grau de polimorfismo e a codominância, são as principais características que tornam-o importante ferramenta para análise genômica.

Por meio da avaliação de oito locos de microssatélites em cinco raças de ovinos não aparentados (Romney, Border Leicester, Suffolk, Awassi, Austrália e Nova Zelandia Merino), Buchanan et al. (1994) encontraram diferenças altamente significativas nas frequências alélicas entre os indivíduos, indicando que a genotipagem por meio de microssatélites pode ser ferramenta útil para examinar as relações evolutivas entre as raças. Estudos utilizando marcadores microssatélites para caracterização genotípica e avaliações da diversidade genética de ovinos foram também descritos por Arranz (1998) em raças espanholas e também por Stahlberger-Saitbekova (2001) que determinou a relação genética entre raças suíças. Nesses estudos os microssatélites eficientes e para a avaliação de diversidade genética e demonstração da distância genética entre os animais envolvidos.

Diversos trabalhos demonstraram a utilização de marcadores microssatélites em estudos de diversidade genética de animais nativos do Brasil. Menezes et al. (2006) utilizou 27 marcadores microssatélites para analisar a variabilidade genética de raças caprinas nativas do Brasil, o resultado demonstrou que todos os microssatélites foram polimórficos e apresentaram alta capacidade para caracterização genética destas raças. Paiva et al. (2005a) utilizou marcadores microssatélites para 18 locos em estudos da diversidade genética de ovinos naturalizados e exóticos no Brasil (Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo, Morada Nova e Somalis) os resultados obtidos mostraram a eficiência destes marcadores na caracterização destas raças, pois todas as raças diferiram significativamente, embora tenham apresentado baixa variabilidade genética.

Almeida (2007) determinou a variabilidade de 20 microssatélites em 14 raças portuguesas de ovinos para 717 animais. A análise desses resultados permitiu avaliar o grau de estruturação da população portuguesa de ovinos e estimar parâmetros de diversidade genética em cada uma das raças.

Dessa maneira, os microssatélites têm se demonstrado o marcador de excelência tanto para caracterização de novas raças naturalizadas (Paiva et al., 2003), como também para estudos de variabilidade genética de populações (Paiva et al., 2005b; El Nahas et al., 2008).

A tabela abaixo contém os dados referentes aos marcadores microssatélites recomendados pela FAO (2011) para estudos de paternidade, variação e diversidade genética em ovinos.

**Tabela 2.** Marcadores de microssatélites recomendados pela ISAG-FAO (2011) indicando o locus, cromossômico, sequencias de primers, temperatura de anelamento, número de acesso no GeneBank e tamanhos de alelos em pares de bases.

Locus	Cromossomo	Primer sequence (5' -> 3') Forward and Reverse	Temp. de Anelamento (°C)	Numero de acesso no Genebank	Tamanho dos alelos (bp)
OarFCB128	OAR2	ATTAAAGCATCTTCTCTTTATTTCTCCGC CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG	55	L01532	96-130
OarCP34	OAR 3	GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC	50	U15699	112-130
OarCP38	OAR 10	CAACTTTGGTGCATATTCAAGGTTGC GCAGTCGCAGCAGGCTGAAGAGG	52	U15700	117-129
OarHH47	OAR 18	TTTATTGACAACTCTTCTTCTAACTCCACC GTAGTTATTTAAAAAATATCATACCTCTTAAGG	58	L12557	130-152
OarVH72	OAR 25	GGCCTCTCAAGGGGCAAGAGCAGG CTCTAGAGGATCTGGAATGCAAAGCTC	57	L12548	121-145
OarAE129	OAR 5	AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG GTAGATCAAGATATAGAATATTTTCAACACC	54	L11051	133-159
BM1329	OAR 6	TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC AACACCGCAGCTTCATCC	50	G18422	160-182
BM8125	OAR 17	CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG GGGGTTAGACTTCAACATACG	50	G18475	110-130
HUJ616	OAR 13	TTCAAACACTACACATTGACAGGG GGACCTTTGGCAATGGAAGG	54	M88250	114-160
DYMS1	OAR 20	AACAACATCAAACAGTAAGAG CATAGTAACAGATCTTCTCTACA	59	...	159-211
SRCRSP9	CHI12	AGAGGATCTGGAAATGGAATC GCACTCTTTTCAGCCCTAATG	55	L22201	99-135
OarCB226	OAR 2	CTATATGTTGCCTTTCCCTTCTGTC GTGAGTCCCATAGAGCATAAGCTC	60	L20006	119-153
ILSTS5	OAR 7	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	55	L23481	174-218
ILSTS11	OAR 9	GCTTGCTACATGGAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	55	L23485	256-294
ILSTS28	OAR 3	TCCAGATTTTGTACCAGACC GTCATGTCATACCTTTGAGC	53	L37211	105-177
SRCRSP5	OAR 18	GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG GTTTCTTTGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	56	L22197	126-158
MAF214	OAR 16	GGTGATCTTAGGGAGTTTTGGAGG AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG	58	M88160	174-282
SRCRSP1	CHI13	TGCAAGAAGTTTTTCCAGAGC ACCCTGGTTTCACAAAAGG	54	L22192	116-148
MAF33	OAR 9	GATCTTTGTTTCAATCTATTCCAATTC GATCATCTGAGTGTGAGTATATACAG	60	M77200	121-141
MCM140	OAR 6	GTTTCGACTTCTGGGACTGGTCTC GTCCATGGATTTGCAGAGTCAG	60	L38979	167-193
OarFCB20	OAR 2	AAATGTGTTTAAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	56	L20004	95-120
OarFCB193	OAR 11	TTCATCTCAGACTGGGATTCAGAAAGGC	54	L01533	96-136

		GCTTGGAATAACCCTCCTGCATCCC			
OarFCB304	OAR 19	CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	56	L01535	150-188
OarJMP29	OAR 24	GTATACACGTGGACACCGCTTTGTAC GAAGTGGCAAGATTCAGAGGGGAAG	56	U30893	96-150
OarJMP58	OAR 26	GAAGTCATTGAGGGGTCGTAACC CTTCATGTTACAGGACTTCTCTG	58	U35058	145-169
MAF65	OAR 15	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	60	M67437	123-127
MAF70	OAR 4	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC	60	M77199	124-166
MAF209	OAR 17	GATCACAAAAGTTGGATACAACCGTGG TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG	63	...	...
BM1824	OAR 1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAACCTGCTTCTTG	58	...	...
INRA063	OAR 14	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	58	...	...

## 2.2- Marcadores de DNA Mitocondrial

As mitocôndrias, organelas citoplasmáticas, contêm DNA próprio que, durante o processo de divisão, possuem capacidade de replicação. A única maneira dos descendentes adquirirem mitocôndrias é por meio do óvulo fornecido por sua mãe, ou seja, os marcadores moleculares baseados em DNA mitocondrial são maternalmente herdados, diferente da herança bi-parental que ocorre com marcadores moleculares nucleares (Olson et al., 2009). As características genéticas e estruturais extremamente peculiares e únicas dos marcadores mitocondriais permitiram que muitos pesquisadores os utilizassem.

Para a realização de estudos de origem evolutiva, dinâmica populacional e domesticação em animais, o sequenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) é uma ferramenta amplamente utilizada, uma vez que apresenta elevada taxa de mutação, falta de recombinação e é herdado maternalmente, permitindo assim o estudo da divergência entre as populações selvagens e domésticas em pequena escala de tempo de domesticação (Bruford et al., 2003; Toro et al., 2009). O mtDNA foi utilizado para estudar a origem de bovinos (Loftus et al., 1994), equinos (Vila et al., 2001), suínos (Giuffra et al., 2000; Larson et al., 2005), caprinos (Joshi et al., 2004; Sardina et al., 2006) e ovinos (Wood and Phua, 1996; Hiendleder et al., 1998; Guo et al., 2005; Pedrosa et al., 2005; Pereira et al., 2006; Tapio et al., 2006; Meadows et al., 2006).

Estudo realizados por Bruford et al. (2003) indicam que a linhagem majoritária de mtDNA dos ovinos descende de uma provável domesticação inicial na região “Crescente Fértil”, que compreende atualmente Israel, Cisjordânia e Líbano, bem como, partes da Jordânia, Síria, Iraque, Egito, sudeste da Turquia e sudoeste do Irã. De acordo com Olson et al. (2009), a herança materna é altamente conservada em muitos dos genes localizados no genoma mitocondrial, estes marcadores

podem ser usados para resolver as relações que mensuram períodos de tempo muito longos e são relevantes quando se considera questões de filogenética e importância taxonômica.

Em ovinos, os cruzamentos indiscriminados entre as mais diversas raças, dificulta a caracterização das mesmas por marcadores moleculares nucleares e, dessa forma, a utilização de marcadores mitocondriais possibilitou que problemas relacionados à origem de muitas raças naturalizadas de ocorrência mundial pudessem ser solucionados.

Em um estudo de diversidade genética realizado por Meadows et al. (2005) utilizando 17 raças ovinas de origem européia e asiática, foram encontrados 57 haplótipos únicos dentro dos 121 animais sequenciados. Através da distribuição dos haplótipos pode-se verificar que a maioria dos animais estavam confinados a uma única raça (51 de 57), enquanto seis haplótipos estavam presentes em múltiplas raças. As distribuições destas diferenças mostraram a presença de dois picos distintos, o que indica a presença de grupos divergentes de haplótipos. Os haplótipos formaram um grande grupo que contém um tipo linhagem ovina B maior de origem europeia e os haplótipos restantes formam um grupo separado provavelmente correspondem a uma linhagem A de origem Asiática.

No Brasil, Paiva et al. (2005a), examinando seis raças de ovinos naturalizadas constataram a presença massiva de haplogrupo Europeu, com exceção de dois animais da raça Dorper (de origem Africana), que apresentaram mtDNA referente ao haplogrupo Asiático. Esses resultados confirmam a hipótese de origem dos ovinos brasileiros procederem do continente Europeu.

Estudo realizado por Gonçalves et al. (2010) no Sul do Brasil (Santa Catarina e Rio Grande do Sul) utilizando sequenciamento mitocondrial do gene ND5 (NADH desidrogenase de subunidade 5) em 225 indivíduos de duas variedades de ovelhas crioulas (Fronteira e Serrana) indicou diferenças genéticas significativas entre as mesmas. A filogenia Bayesiana com base em 18 haplótipos de ND5 indicou a existência das seguintes estruturas geográficas: haplótipos Fronteira, foram agrupados em um clado monofilético, e Serrana que mostrou dois aglomerados parafiléticos. Os estudos referentes a esses grupos de ovelhas indicou a possibilidade de ocorrência de isolamento geográfico, associado com diferenças na forma que rebanhos estavam alocados, que pode ter provocado a redução do fluxo de genes. Esse fato pode reforçar a idéia de serem duas linhagens evolutivas.

No Nordeste do Brasil, pesquisa realizada por Paiva et al. (2011) a partir de análises moleculares e de pedigree para conservação da raça Somali, utilizado microssatélites e 404 pares de bases a partir da região de controle do mtDNA, pôde-se observar média de 5,32 alelos para diversidade do rebanho total com heterozigosidade esperada de 0,5896, heterozigosidade observada de 0,6451 para os locos microssatélites. Dezesesseis haplótipos de mtDNA foram identificados e por meio da análise da rede foi possível observar relação entre todos os haplótipos identificados. A

variabilidade genética mitocondrial desta população mostrou a formação de pelo menos dois grandes grupos de haplótipos, uma por H6, H13, H15, H16 e outra com os 12 demais. Do ponto de vista da variabilidade genética, a manutenção de muitos haplótipos semelhantes na conservação genética do rebanho não é desejável e, desse modo, é preferível manter populações com indivíduos que possuam haplótipos distintos.

### 2.3 SNP

A utilização de marcadores SNPs em estudos de associação e mapeamento genético, assim como em ensaios diagnósticos para confirmação de paternidade, identificação individual (rastreadibilidade), detecção de doenças genéticas e/ou polimorfismos associados a características de produção esteve por muito tempo limitada às restrições tecnológicas. No entanto, no decorrer da última década ocorreram avanços de grande magnitude no sequenciamento do genoma dos mamíferos e no desenvolvimento de ferramentas de bioinformática, os quais possibilitaram otimização na identificação de SNPs.

Há pouco tempo atrás o método padrão de prospecção de marcadores SNP era baseado no método de sequenciamento Sanger. Atualmente, existem painéis de alta densidade de SNPs, cujo objetivo é a ampla cobertura do genoma com esses marcadores, pois existe alta probabilidade de que muitos desses SNPs estejam próximos a genes de interesse e, dessa forma, possam explicar parte da variação genética presente em uma população.

A partir de 23 raças domésticas e duas selvagens, Kijas et al. (2009) desenvolveram um painel de 1.536 SNPs para analisar o genoma nuclear ovino, o qual gerou clusters para grandes grupos com base na origem geográfica dos animais e os marcadores puderam identificar com sucesso subestrutura de população dentro das raças individuais.

A única plataforma de genotipagem de alta densidade disponível para a espécie pertence, até o momento, à Illumina (San Diego, CA). O Ovine SNP50 BeadChip foi desenvolvido em colaboração com o Consórcio Internacional de Genômica Ovina e contém mais de 54.000 SNPs, fornecendo uma cobertura uniforme do genoma. Este chip foi validado em 75 raças ovinas de importância econômica, incluindo as raças Santa Inês, Morada Nova e Crioula Lanada. As aplicações de um painel de alta densidade de marcadores incluem além de estudos de associação e seleção genômica, a melhor determinação de paternidade e atribuição de pedigree, assim como análises mais precisas de diversidade e composição de raças (Illumina, 2012).

Em um estudo de associação de todo o genoma (GWAS) na raça Wild Soay (*Ovis aries*), Jhonston et al. (2011) relataram que por meio da genotipagem de 486 ovelhas (Ovine SNP50 BeadChip), foi possível identificar com ~36.000 SNPs um gene autossômico e candidato principal para chifres (RXFP2, *Relaxin-like receptor 2*). Evidenciaram também que SNPs adicionais no gene

e próximos a este suportam um novo modelo de herança para chifres na raça. Assim, o SNP50 Ovino Bead-Chip poderia ser utilizado para verificar se o mesmo grupo de genes explica os polimorfismos para chifres em diferentes raças e espécies.

Kijas et al. (2012) desenvolveram um estudo com o objetivo principal de montar um painel mundial da diversidade das raças ovinas. Assim, por meio de painel de alta densidade (~49.034 SNP) genotiparam 2.819 animais provenientes de 74 raças ovinas oriundas da Ásia, África, Sudoeste da Ásia (Oriente Médio), Caribe, América do Norte, América do Sul (Santa Inês e Morada Nova), Europa e Austrália. Dentre os resultados relatados, eles puderam demonstrar que raças ovinas mantiveram altos níveis de diversidade genética, em contraste com outros animais domésticos como os cães, por exemplo. Também identificaram regiões particulares do genoma que podem conter forte evidência de acelerada mudança em resposta à seleção artificial.

Compreender a estrutura genética é essencial para alcançar o melhoramento genético por meio de estudos de associação genômica, da seleção genômica e da dissecação das características quantitativas (Kijas et al., 2009). Dessa forma, a informação proveniente de painéis densos de SNPs pode auxiliar na compreensão da estrutura genética e da evolução recente das espécies.

Paiva et al. (2012) realizaram um estudo utilizando 17 marcadores com 467 amostras de seis diferentes raças (crioulo n = 300 Bergamácia n = 24; Corridale n = 28; Pantaneira n = 50; Rabo Largo n = 20; Santa Inês n = 45) que foram testadas para validar a técnica, apenas dois SNPs não produziram resultados consistentes e foram excluídos. Os demais marcadores foram usados para realizar o teste de alocação usando a estrutura de cinco repetições tendo um total de 250k permutações cada. Os resultados indicaram que o painel criado é eficiente em distinguir as raças, com exceção a Pantaneira e as crioulas, que foram agrupadas em um único grupo, sugerindo que estes dois grupos são altamente relacionados e provavelmente devem estar classificados em dois ecótipos da mesma raça, mostrando que mesmo sendo um painel reduzido é uma ferramenta útil para a certificação de raças em animais vivos e de produtos derivados.

### **3- PERSPECTIVAS FUTURAS / CONCLUSÃO**

A análise dos padrões de variação genética molecular constitui tecnologia de grande importância para reconstrução da história evolutiva, na estimativa da diversidade genética e estruturação das populações de animais e na perspectiva de conservação. Além disso, permite a definição das unidades taxonômicas quando se trata de tomar decisões sobre quais as populações conservar e auxilia na escolha dos progenitores para reprodução, com o objetivo de minimizar a perda de variabilidade genética. A utilização de marcadores moleculares microssatélites e mitocondriais proporcionam vantagens para estudos relacionados à genética de conservação. No entanto, os marcadores SNP estão tornando os marcadores de eleição nos estudos genéticos, devido

a sua abundância genômica a redução dos custos de genotipagem em grande escala, A concretização dos projetos de sequenciamento do genoma dos animais domésticos permitirá avaliar de forma mais objetiva os recursos genéticos dos animais domésticos. A variabilidade de genes responsáveis por características produtivas e de resistência a doenças será, obviamente, o alvo preferencial como forma de valorizar raças para manutenção de raças crioulas.

## REFERÊNCIAS

Almeida PAR (2007). Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA – microssatélites: uma perspectiva de conservação. Doutorado em Ciência Animal. Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

ARCO (2011). Assistência ao Rebanho de Criadores de Ovinos. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. <http://www.arcoovinos.com.br>. Accessed 10 de February 2012.

Aro DT, Polizer KA, Pena SB (2007). O Agronegócio na Ovinocultura de Corte no Brasil. Rev. Cien. Eletro. Med. Vet. 9: 1-6.

Arranz JJ, Bayón Y, Primitivo FS (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. Anim Genet. 29: 435–440.

Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo F (2001). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. Genet Select Evol. 33: 529–542.

Baumung R, Simianer H, Hoffmann I (2004). Genetic diversity studies in farm animals – a survey. J. Anim. Breed. Genet. 121: 361-373.

Bennett S (2004). Solexa Ltd. Pharmacogenomics. 5: 433-438.

Binneck E, Nedel JLN, Dellagostin OA (2002). Análise de RAPD na identificação de cultivares: uma metodologia útil? Rev Bras de Semen. 24: 183-196.

Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nat. Rev. Genet. 4: 901–910.

Buchanan FC, Adams LJ, Littlejohn RP, Maddox JF, Crawford AM (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. Genomics. 2: 397- 403.

Caetano AR (2009). Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectiva para o futuro. Rev. Bras. de Zootec. 38: 64-71.

Cañon J, et al. (2000). The genetic structure of Spanish celtic horse breeds inferred from microsatellite data. Anim Genet. 31: 39-48.

- Costa MM, Unêda-Trevisoli SH, Pinheiro JB, Kiihl RAS, Calvo, ES, Di Mauro AO (2008). Marcadores RAPD para detecção de resistência à ferrugem-asiática-da-soja. *Pesq. Agropec. Bras.* 43: 1733-1739.
- El Nahas SM, Hassan AA, Mossallam AAA, Mahfouz ER, Bibars MA, Oraby HAS e Hondt HA (2008). Analysis of genetic variation in different sheep breeds using microsatellites. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 1060–1068.
- Elmaci C, Oner Y, Ozis S, Tuncel E (2007). RAPD Analysis of DNA Polymorphism in Turkish Sheep Breeds. *Bioch. Genetics.* 45: 691-696.
- FAO (2011). *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome.
- Ferreira ME e Grattapaglia D (1996). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética 2ª Ed.* Embrapa/Cenargen, Brasília-DF, Brazil.
- Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon JT, Anderson L (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics.* 154: 1785–1791.
- Gonçalves GL, Moreira GR, Freitas TR, Hepp D, Passos DT, Weimer TA (2010). Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Anim Genet.* 3: 308-10.
- Guo J, Du LX, Ma YH, Guan WJ, Li HB, Zhao QJ, Li X, Rao SQ (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim Genet.* 36: 331–336.
- Hanotte O, Tawah CL, Bradley DG, Okomo M, Verjee Y, Ochieng J, Rege JE (2000). Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan Africa cattle breeds. *Mol. Ecol.* 9: 387-396.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998). The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *J. Mol. Evol.* 47: 441–448.
- IBGE (2010). *Produção da Pecuária Municipal.* V.38, Brazil.
- Illumina (2012). *Ovine SNP50 Genotyping BeadChip.* [http://www.illumina.com/documents/%5Cproducts%5Cdatasheets%5Cdatasheet\\_ovinesnp50.pdf](http://www.illumina.com/documents/%5Cproducts%5Cdatasheets%5Cdatasheet_ovinesnp50.pdf). Accessed 10 de February 2012.



- Johnston SE, McEwan JC, Pickering NK, Kijas JW, Beraldi D, Pilkington JG, Pemberton JM, Slate J (2011). Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. *Mol. Ecology*. 20: 2555–2566.
- Joshi MB, Rout PK, Mandal AK, Tyler-Smith C, Singh L, Thangaraj K (2004). Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Mol. Biol. Evol.* 21:454–462.
- Kantanen J, Olsaker I, Adalsteinsson S, Sandberg K, Eythorsdottir E, Pirhonen K, Holm LE (1999). Temporal changes in genetic variation of North European cattle breeds. *Anim. Genet.* 30: 6–28.
- Kijas JW, Townley D, Dalrymple BP, Heaton MP, Maddox JF, McGrath A, Wilson P, Ingersoll RG, McCulloch R, McWilliam S, Tang D, McEwan J, Cockett N, Oddy VH, Nicholas FW, Raadsma H (2009). A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PLoS ONE*. 4: 4668.
- Kumar KG, Kumar P, Bhattacharya TK, Bhushan B, Patel AK, Choudhary V, Sharma A (2003). Genetic Relationship Among Four Indian Breeds of Sheep Using RAPD-PCR. *J.of Appl. Anim. Res.* 24: 177-183.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A (2005). Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307:1618–1621.
- Ligda CH, Altarayrah J, Georgoudis A (2009). Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Rumin. Res.* 83: 42-48.
- Loftus RT, Machugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham EP (1994). Evidence for two independent domestications in cattle. *Proc. Natl Acad. Sci.* 91:2757–2761.
- Lopes MS, Lopes MTG, Figueira A, Camargo LEA, Fungaro MHP, Carneiro MS, Vieira MLC (2002). Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotec. Cien. And Desenv.* 29: 56-60.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 7057: 376-380.
- Mariante AS, Albuquerque MSN, Egito AA, McManus C (1999). Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. *Anim. Genetic Res. Inform.* 25: 107-121.
- Mariante AS, McManus C, Mendonça JF (2003). Country report on the state of animal genetic resources: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brazil.

- Meadows JR, Li K, Kantanen J, Tapio M, Sipos W (2005). Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J. Hered.* 96: 494–501.
- Meadows JRS, Hanotte O, Drögemüller C, Calvo J, Godfrey R, Coltman D, Maddox JF, Marzanov N, Kantanen J, Kijas JW (2006). Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. *Anim. Genet.* 37: 444-453.
- Melo DC, Oliveira DAA, Seerig A, Carvalho DC (2008). Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 32: 220-224.
- Menezes MPC, Martinez AM, Ribeiro MN, Pimenta-Filho EC, Bermejo JVD (2006). Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *R. Bras. Zootec.* 35: 1336-1341.
- Morais ORO (2001). O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: *Melhoramento genético aplicado à produção animal*. Belo Horizonte, FEPMUZ Editora, Brazil.
- Notter DR (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Anim. Scien.* 77: 61-69.
- Oklahoma State University (2007). *Animal Science*. <http://www.ansi.okastate.edu/breeds/sheep> Accessed 10 December 2007.
- Oliveira ACB, Sedyama MAN, Sedyama T, Finger FL, Cruz CD (2002). Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. *Hort. Bras.* 20: 576-582.
- Olson ZH, Whittaker DG, Rhodes OE (2009). The use of molecular markers in wild sheep research in North America: a review. *Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium* 16: 251-269.
- Paiva SR, Silvério VC, Egito AA, MacManus C, Faria DA, Mariante AS, Castro SR, Albuquerque MSM, Dergam J (2003). Caracterização Genética da Raça Santa Inês. In: *2ND International Symposium on Sheep and Goat Production*, João Pessoa, *Anais do Segundo Sincorte*. 1: 487-499.
- Paiva SR, Silvério VC, Paiva DAF, Mcmanus, CM, Egito AA, Faria DA, Mariante A S, Castro STR, Albuquerque MSM, Dergam JA (2005a). Origin Of The Main Locally Adapted Sheep Breeds Of Brazil: A RFLP-PCR Molecular Analysis. *Arch. Zootec.* 54: 395-399.
- Paiva SR, Silvério VC, Egito AA, McManus CM, Faria DA, Mariante AS, Castro STR, Albuquerque MSM, Dergam JA (2005b). Genetic variability of the main Brazilian hair sheep breeds using RAPD-PCR markers and conservation implications. *Pesq. Agrop. Bras.* 40: 887-893.

- Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, Barretto GB, Carneiro PL, Lobo RN, McManus C (2011) Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 43: 1449-57.
- Paiva SR, Vieira FD, Yamagishi MEB, Lacerda T, Vasconcelos C, Mcmanus C, Tanno P, Higa R, Carneiro PLS, Azevedo HC, Facó O, Souza CJH, Araujo AM, Martins VM, Caetano AR (2012). Validation of a low density SNP panel for breed certification testing in Brazilian sheep (*Ovis aries*) breeds as a tool for flock genetic management. In: International Plant and Animal genome Conference, San Diego.
- Pariset L, Joost S, Gargani M, Valentini A (2012). Landscape Genomics in Livestock. In: Analysis of Genetic Variation in Animals. INTECH, Rijeka, Croatia.
- Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutiérrez-Gil B, Primitivo FS, Bayón Y (2005). Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc. R. Soc. B.* 272: 2211–2217.
- Pereira F, Davis SJM, Pereira L, Mcevoy B, Bradley DG, Amorim A (2006). Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1420–1426.
- Qasim M, Ahmad H, Ghafoor S, Afridi SG, Muhammad I, Imtia AK (2011). Estimation of Genetic Diversity in Sheep (*Ovis aries*) using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Inter. J. Ani. and Vet. Adv.* 3: 6-9
- Ramey II RR, Luikart G, Singer FJ (2000). Genetic Bottlenecks Resulting from Restoration Efforts: The Case of Bighorn Sheep in Badlands National Park. *Rest. Ecol.* 8: 85-90.
- Rosa AJM, Paiva SR (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Brazil.
- Sardina MT, Ballester M, Marmi J, Finocchiaro R, Van Kaam JBCHM, Portolano B, Folch JM (2006). Phylogenetic analysis of Sicilian goats reveals a new mtDNA lineage *Anim. Genet.* 37: 376–378.
- Stahlberger-Saitbekova N, Schläpfer J, Dolf G, Gaillard C (2001). Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J. Anim. Breed. and Genet.* 118: 379–387.
- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Inkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H, Kantanen J (2006). Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1776–1783.
- Toro MA, Fernández J, Caballero A (2009). Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livest. Science.* 120: 174–195.

- Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Gen. Res.* 18: 1051-1063.
- Vila C, Leonard JA, Götherström A, Marklund S, Sandberg K, Liden K, Wayne R, Ellegren H (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science.* 291: 474–477.
- Wood NJ, Phua SH (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim. Genet.* 27: 25–33.
- Xiao F, Yong F, Ting S, Jin-Fu W (2009). Six Local Sheep Breeds AFLP Analysis of Genetic Diversity in Xinjian. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine.*

## OBJETIVOS

### Gerais

- Fornecer subsídios para caracterização da variabilidade genética das raças ovinas produzidas no Estado do Mato Grosso do Sul;
- Contribuir com informações genéticas para o reconhecimento do grupamento genético pantaneiro sul-mato-grossense como raça ovina junto à associação nacional de criadores.

### Específicos

- Determinar a frequência alélica de oito locos microssatélites em sete raças ovinas criadas no MS e no grupamento Pantaneiro;
- Analisar a estrutura populacional do grupamento Pantaneiro;
- Verificar o grau de miscigenação e introgressão alélica entre as raças estudadas;
- Verificar a capacidade de discriminação de oito locos microssatélites para diferenciação de populações Pantaneiras.

# **CAPITULO I**

## **DIVERSIDADE GENÉTICA EM OVINOS LOCALMENTE ADAPTADOS DO PANTANAL SULMATOGROSSENSE**

**Artigo Publicado:**

**Genetics and Molecular Research**

**Vol. 12(4), pp. 5458-5466, 11 November, 2013**

**Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>**

**DOI: 10.4238/2013.November.11.7**

**ISSN 1676-5680**

# Diversidade genética em ovinos localmente adaptados do Pantanal Sulmatogrossense

Bruno do Amaral Crispim<sup>1</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1</sup>, Leonardo de Oliveira Seno<sup>2</sup>, Andréa Alves do Egito<sup>3</sup>, Fernando Miranda de Vargas Junior<sup>2</sup>, Marcio Rodrigues de Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados – FCBA/UFGD, Mato Grosso do Sul - Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados – FCA/UFGD, Mato Grosso do Sul – Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Corte – Campo Grande, MS - Brasil

## Resumo

Ovinos provenientes do grupamento genético Pantaneiro e de outras sete raças criadas no Estado do Mato Grosso do Sul foram genotipadas utilizando oito locos microssatélites. Objetivou-se neste estudo determinar a variabilidade genética, a relação filogenética, os padrões de introgressão gênica e a miscigenação entre os animais pesquisados para fornecer informações referentes a estrutura genética dos ovinos localmente adaptados sul-mato-grossenses. Um total de 225 animais foi utilizado para as análises genéticas. O grupamento genético Pantaneiro foi o que apresentou o maior número médio de alelos/locos (9,25) e maior riqueza alélica (6,95) enquanto que a população Dorper apresentou os menores valores para os parâmetros acima, sendo 4,88 e 3,86 respectivamente. As análises dos valores de distância genética e de estrutura genética entre as populações possibilitaram gerar subsídios para caracterização desses animais como um grupamento genético diferente. A heterozigosidade esperada média variou de 0,72 (Pantaneira) a 0,55 (Dorper), enquanto que a heterozigosidade média observada variou de 0,63 (White Dorper) a 0,54 (Dorper). Baseado nos diversos parâmetros estatísticos analisados foi possível demonstrar que a "raça" Pantaneira quando comparada com as outras populações constitui um reservatório de diversidade genética que pode conter alelos raros e úteis para o melhoramento genético ressaltando assim a importância de sua conservação.

**Palavras-Chave:** recursos genéticos, ovelha Pantaneira, variabilidade genética

## 1. Introdução

A expansão da ovinocultura no Estado do Mato Grosso do Sul vem ocorrendo, e o grupamento genético ovino localmente adaptado (Gomes *et al.*, 2007) denominado Ovelha Pantaneira (OPT), pode ser útil para incrementar a cadeia produtiva pelo uso de material genético rústico e de alta adaptabilidade às condições ambientais da região.

Em 2007 deu-se início a um estudo exploratório realizado por pesquisadores da Universidade Anhanguera (UNIDERP), da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), que tinha o objetivo de identificar e conservar o grupamento genético de OPT encontrado em diferentes locais no Estado. Inicialmente os pesquisadores envolvidos adquiriram cerca de 450 animais, incluindo matrizes e carneiros de diversos rebanhos encontrados

no alto e baixo Pantanal Sul-mato-grossense, como Anastácio (64), Nioaque (100), Aquidauana (139) e de propriedades da região de Pedro Gomes (147).

O grupamento genético OPT, apresenta uma combinação de alelos que se aproxima das raças lanadas do Sul e deslanadas do Nordeste. Esse fato aponta a possibilidade desses animais constituírem um grupamento genético distinto dos demais (Gomes *et al.*, 2007). As fêmeas destes animais possuem boa habilidade materna e estacionalidade reprodutiva nula (Martins *et al.*, 2008). Os cordeiros apresentam bom potencial produtivo com relação às características de carcaças e qualidade da carne, além disso, as OPTs oferecem como subproduto a lã, que é utilizada para artesanatos regionais. Atualmente, pode-se observar que a OPT é encontrada em fazendas isoladas na região, vivendo há anos sem qualquer tipo de seleção artificial ou melhoramento genético, fato este que possibilita concluir que esses ovinos são localmente adaptados à região Sulmatogrossense (Vargas Junior *et al.*, 2011).

De modo geral marcadores genético-moleculares multilocus, como os microssatélites são apropriados tanto para estudos de variabilidade genética quanto testes de paternidade, além de terem ampla cobertura no genoma e fácil detecção. Os microssatélites são codominantes, altamente polimórficos, e possuem uma heterozigosidade esperada frequentemente superior a 0,7 que permite a discriminação entre os indivíduos relacionados (Regitano & Coutinho, 2001).

As análises moleculares podem fornecer subsídios tanto para identificação de áreas prioritárias para programas de conservação de recursos genéticos, quanto para entendimento da diversidade genética em espécies domésticas e silvestres ameaçadas de extinção (Rosa & Paiva, 2009). Diante do exposto, presume-se que a criação de programas de conservação utilizando ferramentas moleculares é de fundamental importância para gerar informações referentes aos padrões de diversidade genética dos grupos localmente adaptados, além de permitir que as mesmas possam ser utilizadas para sistema produtivo, agregando características de adaptação e rusticidade, (Baker, 1994).

Pesquisas que avaliem a variabilidade genética são de grande relevância pelo fato de gerar informações que possibilitem caracterizar a OPT. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade genética, os padrões de introgressão gênica e a ocorrência de miscigenação entre este grupamento genético e comparando-o com outras raças ovinas do Estado do Mato Grosso do Sul.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Animais**

Amostras de sangue de 195 animais, pertencentes a sete populações ovinas criadas no Estado do Mato Grosso do Sul (Brasil), foram coletadas de modo aleatório em diferentes rebanhos. Os locais de coleta e número de animais amostrados estão descritos na Tabela 1.



**Tabela 1.**

Dados referentes às populações, locais de coleta e número de animais.

<b>Populações</b>	<b>Localidade</b>	<b>Sigla</b>	<b>N</b>
Bergamácia	Retiro dos Leite - Jardim/MS	OB	30
Ovelha Pantaneira	Fazenda Experimental UFGD - Dourados/MS	OP	30
Dorper	Cabanha Morena - Caarapó/MS	DP	30
White Dorper	Cabanha Morena - Caarapó/MS	DW	15
Hampshire Down	Fazenda Mate Laranjeira - Ponta Porã/MS	HS	30
Suffolk	Cabanha LCL - Caarapó/MS	SF	30
Ile de France	Fazenda Chancan - Campo Grande/MS	IF	30

## 2.2. Locos microssatélites

O DNA genômico total foi extraído de tecido sanguíneo baseado em um método orgânico segundo protocolo de Sambrook et al. (1989) adaptado por Crispim et al. (2012).

Para as reações de PCR, foi utilizado um painel comercialmente disponível de oito locos microssatélites previamente utilizados por Souza et al. (2012) (CSRD247, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB304, OarCP49, SPS113, D5S2). As reações foram realizadas em um sistema multiplex fluorescente incluindo os oito marcadores na mesma reação em um volume final de 10µl, contendo: 3,6µl de água ultrapura, 1,5µl de 10x tampão de PCR, 1,5µl de mix dos oligonucleotídeos iniciadores, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs, 0,4µl de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 3,0 µl de DNA (50-100ng). E, em seguida colocadas no termociclador (Applied Biosystems).

Os ciclos de temperatura e condições para a amplificação foram constituídos de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 7 minutos, 40 ciclos com desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Ao final dos 40 ciclos realizou-se uma extensão final a 72°C por 30 minutos. Ao término do processo de amplificação, as amostras foram resfriadas a 4°C. Foram utilizados controles negativos em todos os experimentos.

Após a PCR, os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em um equipamento MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems (GE Healthcare, USA). Para tanto, foi preparada uma solução com TWEEN e marcador de peso molecular ET-400 (GE Healthcare). Em cada amostra foram colocados 0,3µl do marcador ROX, 7,7µl de TWEEN 0.02X e 2µl do produto amplificado. A placa com as amostras foi desnaturada por 3 minutos a 94°C e colocada diretamente no gelo. A injeção das amostras foi feita a 3 KV por 80 segundos e a corrida a 8 KV por 80 minutos. Os resultados provenientes da genotipagem para discriminação dos alelos foi visualizado no programa Fragment Profiler version 1,2® (GE Healthcare)

## 2.3. Análises estatísticas

A frequência alélica foi estimada por contagem direta e os parâmetros de diversidade dos locos e desempenho forense em testes de paternidade foram estimados para todos os microssatélites

em todas as populações utilizando o programa CERVUS 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Os parâmetros foram os seguintes: heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e o equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW). Para calcular a riqueza alélica (RA) e as estimativas das estatísticas F de Wright ( $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ ) foi utilizado o programa FSTAT. O valor de P foi ajustado pelo procedimento de Bonferroni (Goudet, 2002) utilizando o mesmo pacote estatístico. As estruturas populacionais foram avaliadas pelo método de análise da variância molecular (AMOVA) implementado no programa ARLEQUIN (Schneider et al., 2000).

O dendrograma foi construído por meio da análise de agrupamento (cluster) Neighbor Net com o programa Sliptree baseado em cálculos de distâncias genéticas de Reynold's ( $F_{ST}$ ) por meio do FSTAT.

Os indivíduos foram agrupados em um determinado número de populações e assinalados probabilisticamente a grupos inferidos pela metodologia Bayesiana implementada no programa Structure (Pritchard et al., 2000) com base na frequência alélica dos 8 locos microssatélites. Os testes foram realizados pelo modelo de miscigenação (admixture model) onde as frequências alélicas foram correlacionadas. Para escolher o número apropriado de populações inferidas, foram realizadas várias análises com k (número de populações inferidas) variando de 2 a 10 e 300.000 interações (período “burn-in” de 3000), com três repetições independentes para cada uma das análises. Os valores reais de K foram inferidos a partir da magnitude de  $\Delta K$  dada em função de K, com o auxílio do programa Structure Harvester (Earl e vonHoldt et al., 2012) seguindo o modelo proposto por Evanno et al. (2005).

### 3. Resultados

Os parâmetros genéticos populacionais observados a partir da genotipagem dos 195 animais das sete populações analisadas com os oito locos microssatélites estão descritos na Tabela 2. O grupamento genético OPT foi o que apresentou número de alelos por locos (9,25) e riqueza alélica (6,95) maiores quando comparado com animais das outras populações em estudo, enquanto que a população Dorper apresentou os menores valores, sendo 4,88 e 3,86 respectivamente.

Os locos microssatélites HSC, CSR247 e OarAE129 estavam em equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) quando todas as populações foram analisadas em conjunto. Entretanto, quando as análises estatísticas foram realizadas para cada população, animais White Dorper não apresentaram nenhum marcador em equilíbrio. O grupamento genético Pantaneiro e as populações Bergamácia e Hampshire Down apresentaram maior número de marcadores em equilíbrio. Em relação a outras populações, Ile de France apresentou dois locos e a população Dorper apenas 1 loco em equilíbrio (Tabela 2).

**Tabela 2.**

Estimativas de variabilidade genética observadas nas sete populações estudadas baseadas em 8 locos microssatélites (N – número de indivíduos; NMA - número médio de alelos; RA – riqueza alélica; Locos em EHW – número de locos que apresentaram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg

Populações	N	NMA	Heterozigidade		RA	F <sub>IS</sub>	Locos em EHW
			Observada	Esperada			
Pantaneira	30	9,25± 3,77	0,63 ± 0,03	0,72 ± 0,04	6,95	0,129*	3
Bergamácia	30	5,75± 1,67	0,60 ± 0,03	0,63 ± 0,06	4,75	0,062	3
Dorper	30	4,88 ± 3,27	0,54 ± 0,03	0,55 ± 0,09	3,86	0,021	1
White Dorper	15	5,13 ± 2,47	0,70 ± 0,04	0,69 ± 0,05	5,06	0,027	0
Suffolk	30	6,00 ± 2,14	0,66 ± 0,03	0,65 ± 0,07	5,05	0,019	2
Hampshire Down	30	7,38 ± 2,97	0,68 ± 0,03	0,65 ± 0,05	5,88	0,045	3
Ile de France	30	5,25 ± 2,12	0,60 ± 0,03	0,66 ± 0,03	4,62	0,079*	2

\* p<0,05

A análise da estrutura populacional demonstrou que existe diferença genética entre as populações de 13,72%, (Tabela 3) e que as estimativas de diferenciação baseadas em F<sub>ST</sub> foram significativas (p<0,001).

**Tabela 3.**

Análise de variância Molecular (AMOVA) interpopulacional e intrapopulacional das 7 populações ovinas estudadas; GL -Grau de liberdade; IF - Índice de fixação.

Fonte de Variação	GL	Variação(%)	IF
Interpopulacional	6	13,72	F <sub>ST</sub> = 0.13721*
Intrapopulacional	194	88,33	

\* p<0,001

A matriz de diferenciação genética entre as populações, baseada em índices de F<sub>st</sub>, pode ser visualizada na Tabela 4. Nela pode-se observar que os padrões mais altos de diferenciação genética foram obtidos entre as populações de Bergamácia e Hampshire Down (0,250) enquanto que os menores valores foram observados para as populações de Suffolk e Hampshire Down (0,069). As análises de estimativa de diferenciação possibilitaram identificar que os animais do grupamento genético OPT estão geneticamente mais próximos de animais da população Suffolk (0,078) e também próximos das demais raças quando essas são comparadas às outras.

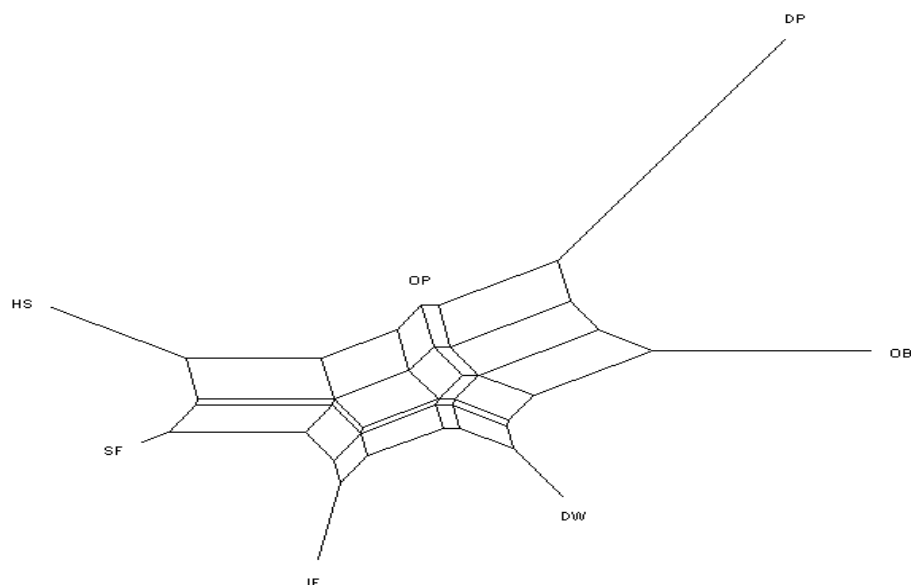
**Tabela 4.**

Estimativa aos pares de diferenciação genética entre as populações ovinas estudadas (OB - Bergamácia; DP - Dorper; DW - White Dorper; HS - Hampshire Down; IF - Ile de France; OP - Pantaneira; SF - Suffolk).

	OB	DP	DW	HS	IF	OP	SF
OB							
DP	0.18140						
DW	0.12440	0.19948					
HS	0.25082	0.21992	0.16221				
IF	0.17938	0.23601	0.09408	0.13918			
OP	0.10757	0.10130	0.08177	0.08359	0.08823		
SF	0.19916	0.24001	0.12801	0.06941	0.08389	0.07853	

A análise dos dados baseados na metodologia de Neighbor-Net indicou que o grupamento genético OPT se posiciona de modo intermediário em relação às outras populações estudadas. As populações Suffolk e Hampshire Down se agruparam de forma distinta demonstrando sua

proximidade genética quando comparadas com outras populações. A população Dorper foi a que apresentou maior distância em relação às demais populações (Fig. 1).



**Fig. 1** - Dendrograma Neighbor-Net baseado na distância genética de Reynold's ( $F_{ST}$ ) a partir de oito locos microssatélites demonstrando a relação genética entre as sete populações ovinas estudadas (OP - Ovino Pantaneiro; DP - Dorper; DW - White Dorper; OB - Bergamácia; HS - Hampshire Down; IF - Ile de France e SF - Suffolk).

A Tabela 5 mostra a proporção de cada população atribuída para os cinco grupos inferidos mais prováveis, demonstrando interação com a mínima variância utilizando o programa Structure.

**Tabela 5.**

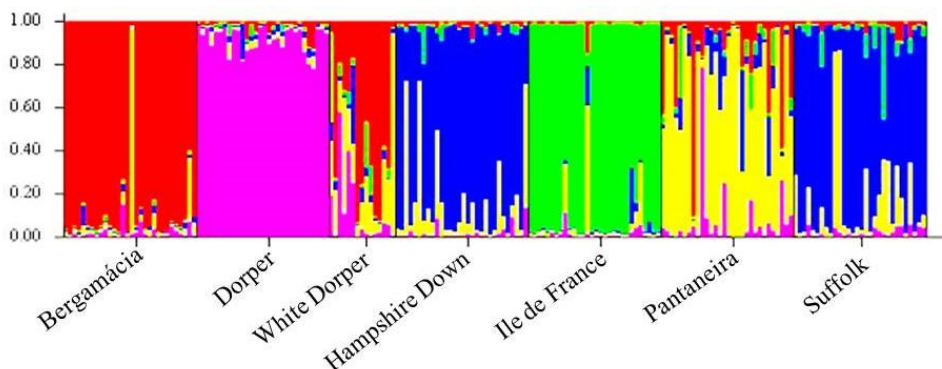
Número de indivíduos (N) por população e proporção de associação de cada população em cada um dos 5 grupos inferidos pelo programa Structure. Associações superiores a 0,5 estão em negrito

Populações	Clusters Inferidos					N
	1	2	3	4	5	
Bergamácia	<b>0,890</b>	0,009	0,015	0,061	0,025	30
Dorper	0,024	0,012	0,020	0,023	<b>0,921</b>	30
White Dorper	<b>0,514</b>	0,071	0,052	0,243	0,120	15
Hampshire Down	0,016	0,023	<b>0,792</b>	0,147	0,022	30
Ile de France	0,012	<b>0,897</b>	0,026	0,048	0,017	30
Pantaneiro	0,152	0,044	0,081	<b>0,646</b>	0,077	30
Suffolk	0,022	0,047	<b>0,756</b>	0,151	0,023	30

Na Tabela 5 verifica-se que os clusters inferidos de número 1, 2 e 5 representam as populações de Bergamácia, Ile de France e Dorper com 89%, 89,7% e 92,1% de alocação correta de seus indivíduos em suas respectivas populações. O cluster 3 representam as populações Hampshire Down e Suffolk com uma proporção de atribuição de 79,2% e 75,6%, respectivamente. O menor valor de atribuição significativo ( $>0,5$ ) foi encontrado na população White Dorper com uma

proporção de atribuição de 51% no cluster 1. Para o grupamento Pantaneiro a maior proporção de atribuição significativa foi de 64,6% para o cluster 4.

A estrutura genética das populações estudadas foi analisada por meio de estatística Bayesiana utilizando o programa Structure. O agrupamento com  $K=5$  (Fig. 2) corresponde ao  $K$  real segundo metodologia proposta por Evano (2005), onde em todas as populações analisadas foram observadas por padrões de miscigenação complexos. O diagrama mostrou similaridade entre as populações Hampshire Down e Suffolk e entre a raça Bergamácia e White Dorper que em menor proporção que as anteriores, parecem compartilhar um mesmo pool gênico. Também pode ser observado que existe miscigenação dentro do grupamento Pantaneiro.



**Fig. 2** - Agrupamento individual dos 195 indivíduos das sete populações ovinas analisadas por meio de método estatístico Bayesiano utilizando-se o programa Structure. Cada animal foi representado por uma linha vertical dividida em segmentos classificados de acordo com a cor e tamanho que corresponde à proporção relativa do genoma do animal referente população inferida pelo programa. As diferentes populações foram separadas pelas linhas pretas.

#### 4. Discussão

O grupamento genético Pantaneiro foi o que demonstrou maior riqueza alélica quando comparada com as demais populações em estudo (Tabela 2). Considerando-se que a introdução de ovinos na América do Sul tenha acontecido concomitante com o processo de colonização e o tamanho efetivo da população esteja em processo de formação, os níveis elevados de diversidade observados nas diferentes populações estudadas pode estar relacionado ao fato da pressão seletiva aliada à miscigenação ter implicado na introgressão de genes nas populações. Entretanto animais da população Dorper, oriundos de melhoramento genético consolidado, apresentaram menor riqueza alélica e baixa heterozigosidade observada.

Os resultados foram consistentes com os observados por Gornas et al. (2011) e Alvarez et al. (2012) que também realizaram estudo com diferentes raças ovinas localmente adaptadas e especializadas e, encontraram baixa variabilidade e heterozigosidade observada para os indivíduos das raças especializadas. Estes resultados sugerem a possibilidade deste grupamento genético Pantaneiro constituir importante reservatório de diversidade genética sendo possível a sua utilização em programas de melhoramento e no manejo genético de rebanhos.

Os oito locos microssatélites foram considerados multialélicos para os animais pertencentes do grupamento genético Pantaneiro (Tabela 2). Considerando-se os animais pantaneiros genotipados, os parâmetros populacionais referentes a número médio de alelos (9,25),  $H_o$  (0,63),  $H_e$  (0,72) e RA (6,95) foram consideravelmente mais elevados quando comparados com resultados das demais populações estudadas e com os dados observados para outras raças ovinas localmente adaptadas e exóticas, na Espanha (Calvo et al., 2011), na Índia (Arora et al., 2011), bem como raças italianas (Lasagna et al., 2011) e cubanas (Alvarez et al., 2012).

Tolone et al. (2012) encontraram resultados bastante similares quando analisaram 5 raças sicilianas com 20 microssatélites e encontraram média de 10,95 alelos por locos para a ovelha nativa Pinzirita, enquanto Baumung et al. (2006) relataram média de 15 alelos, quando 25 marcadores microssatélites foram genotipados em 11 raças austríacas. Embora as estimativas dos números médios dos alelos possam variar de acordo com cada marcador a ser estudado é possível inferir que o método de genotipagem utilizado para obter estes resultados revelou que a população do grupamento genético Pantaneiro apresentou níveis relativamente altos de diversidade genética, demonstrando que, estes podem ser detentores de alelos raros na população atual que poderiam vir a ser favoráveis no futuro, caso estejam relacionados com características de resistência e adaptabilidade ao meio ambiente.

A quantidade maior de locos marcadores em EHW encontrados para o grupamento genético Pantaneiro e as populações Bergamácia e Hampshire Down pode ser explicada pelo fato destes animais não serem oriundos de cruzamentos controlados (programas de melhoramento). Entretanto, a população White Dorper foi a única que não apresentou nenhum marcador em equilíbrio, tal fato pode ser explicado pela pequena população amostrada (15 indivíduos) e, além disso, ser uma população consolidada por meio de cruzamentos preferenciais estabelecidos a partir de programas de melhoramento genético. Várias pesquisas utilizando raças localmente adaptadas ou crioulas confirmaram que as mesmas apresentam EHW superiores quando comparadas às raças mais especializadas (McManus et al., 2010; Paiva et al., 2011a; Tolone et al., 2012).

Pode-se observar no dendrograma (Fig. 1) que as populações com possível ancestralidade comum ficaram mais próximas, tais como a Suffolk, Hampshire Down e Ile de France. Este fato pode ser explicado pelo compartilhamento de alelos comuns do mesmo ancestral de origem europeia (Southdown) (ARCO, 2013), propiciando a similitude genética destas e sua proximidade indicada no gráfico gerado pelo método Neighbor-Net. O grupamento genético Pantaneiro se posicionou medianamente no gráfico demonstrando que por se tratar de um animal localmente adaptado, pode apresentar a miscigenação com demais populações analisadas, porém geneticamente distinto.

Os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) mostraram que a variação entre as populações foi alta (Yeh, 2000) e significativa, apresentando índice de fixação ( $F_{ST}=0,13$ ). Baseando-se nesse critério, podemos inferir que cada uma das populações em estudo pode ser considerada uma entidade genética independente. A partir desse dado, destaca-se que o grupamento genético OPT pode ser considerado diferente das demais populações estudadas, porém apresenta grau de miscigenação com outras raças criadas no Estado (Fig. 2 e Tabela 2).

O número de populações inferidas pelo programa Structure e a estrutura populacional gerada pelo mesmo no gráfico visualizado na Fig. 2 confirmaram também que o grupamento Pantaneiro é geneticamente distinto. Embora seja possível observar certo grau de compartilhamento de alelos com as demais populações inferidas e a quantidade de marcadores utilizados tenha sido insuficiente para distinguir todas as raças estudadas, este é o primeiro estudo de caracterização do grupamento genético Pantaneiro, e dentro das perspectivas de credenciamento desta população como uma raça distinta, os resultados encontrados foram extremamente satisfatórios, uma vez que condiz com o histórico das populações analisadas.

Os resultados observados na matriz de diferenciação genética e na análise realizada pelo Structure indicou que as populações Hampshire Down e Suffolk, possuem um alto grau de similaridade (0,06). Esse fato pode ser explicado pelo próprio processo de formação das populações determinado pela ancestralidade comum entre ambas, por apresentarem função similar na indústria ovina e terem uma suposta mistura racial (Blackburn et al., 2011). Estudo de meta-análise realizado por Paiva et al. (2011b) também confirma a associação destas populações que se agrupam em um mesmo cluster.

De acordo com a Tabela 5, pode-se verificar que em populações ou raças mais homogêneas geneticamente testes de alocação individual demonstram melhor eficácia. Possivelmente resultado melhores poderiam também ser obtidos caso o número de marcadores fosse superior, e sendo assim poder-se-á utilizar testes desta natureza para a formação ou manejo genético de núcleos de conservação da população de ovinos Pantaneiros.

Pesquisas como essa, que demonstram a importância da exploração das potencialidades da diversidade genética encontrada em rebanhos localmente adaptados. Genes inatos com valores adaptativos ligados aos rigores climáticos tropicais quando comparado com raças criadas/melhoradas em ambientes temperados poderiam ser de elevada utilidade tendo em vista as mudanças climáticas previstas para os próximos anos. As raças exóticas, embora consideradas de alto desempenho, apresentam uma redução de sua produtividade por não se adequarem facilmente às condições de criação e manejo impostos no Brasil, aliado ainda aos intempéries climáticos (clima tropical). A introgressão de genes entre estas populações poderá gerar produtos cuja média geral de produção e rusticidade superem as médias dos pais.

## 5. Conclusão

As sete populações ovinas estudadas podem ser consideradas entidades genéticas distintas. O grupamento genético Pantaneiro apresentou variabilidade genética superior quando comparada às demais estudadas. Esse fato indica a importância da conservação do grupamento genético Pantaneiro que pode ser detentor de alelos raros que podem ser economicamente importantes para o melhoramento genético da espécie ovina.

## Agradecimentos

À FUNDECT pelo auxílio financeiro para a execução da pesquisa, a UFGD pelo apoio, a CAPES pela concessão da bolsa que me auxiliou para continuar o desenvolvimento da pesquisa, ao Médico Veterinário Elton Bock Corrêa inspetor da ARCO (Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos) pela logística de acesso aos criadores de ovinos e a Dra. Raquel Soares Juliano pela disponibilização dos animais proveniente da Embrapa Pantanal.

## Referências

- Álvarez, I., Capoteb, J., Traoréc, A., Fonseca, N., Pérez, K., Cuervo, M., Fernández, I., Goyachea, F., 2012. Genetic relationships of the Cuban hair sheep inferred from microsatellite polymorphism. *Small Rumin. Res.* 104, 89–93.
- ARCO, 2013. Assistência ao Rebanho de Criadores de Ovinos. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. <http://www.arcoovinos.com.br>. Acessado em 10 janeiro de 2013.
- Arora, R., Bhatia, S., Mishra, B.P., Joshi, B.K., 2011. Population structure in Indian sheep ascertained using microsatellite information. *Anim. Genet.* 42, 242-250.
- Barker, J.S.F., 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Guelph and Ontario, Canada 21, 501–508.
- Baumung, R., Cubric-Curik, V., Schwend, K., Achmann, R., Solkner, J., 2006. Genetic characterization and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J. Anim. Breed. Genet.* 123, 265–271.
- Blackburn, H.D., Paiva, S.R., Wildeus, S., Getz, W., Waldron, D., Stobart, R., Bixby, D., Purdy, P.H., Welsh, C., Spiller, S., 2011. Genetic structure and diversity among US sheep breeds: identification of the major gene pools. *J. Anim. Sci.* 89, 2336–2348.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet.* 32, 314-331.



- Bozzi, R., Degl'Innocenti, P., Rivera Diaz, P., Nardi, L., Crovetto, A., Sargentini, C., Giorgetti, A., 2009. Genetic characterization and breed assignment in five Italian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Rumin. Res.* 85, 50–57.
- Callen, D.F., Thompson, A.D., Shen, Y., Phillips, H.A., Richards, H.I., Mulley, J.C., Sutherland, G.R., 1993. Incidence and origin of “null alleles” in the “AC” microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52, 922-927.
- Calvo, J.H., Alvarez-Rodriguez, J., Marcos-Carcavilla, A., Serrano, M., Sanz, A., 2011. Genetic diversity in the *Churra tensina* and *Churra lebrijana* endangered Spanish sheep breeds and relationship with other Churra group breeds and Spanish mouflon. *Small. Rumin. Res.* 95, 34-39.
- Crispim, B.A., Silva, D.B.S., Banari, A.L., Seno, L.O., Grisolia, A.B., 2012. Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microssatélites. *J. Selva Andina Res. Soc.*, 3, 3-13.
- Earl, D.A. e vonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genetics Res.* 4, 359-361.
- Egito, A.A., Mariante, A.S., Albuquerque, M.S.M., 2002. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Archivos de Zootecnia*, 51, 39-52.
- Evano, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- Faleiro, F., 2007. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados, 102 p.
- Gornas, N., Weimann, C., El Hussien, A., Erhardt, G., 2011. Genetic characterization of local Sudanese sheep breeds using DNA markers. *Small. Rumin. Res.* 95, 27-33.
- Goudet, J., 2002. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2).
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C., 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecology* 16, 1099-1106.
- Lasagna, E., Bianchi, M., Ceccobelli, S., Landi, V., Martínez Martínez, A., Vega Pla, J.L., Panella, F., Delgado Bermejo, J.V., Sarti, F.M., 2011. Genetic relationships and population structure in three Italian Merino-derived sheep breeds. *Small Ruminant Res.* 96:111-119.
- Ligda, C.H., Altarayrah J., Georgoudis A., 2009. Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Ruminant Research.* 83, 42–48

- Mariante, A.S, Albuquerque, M.S.N., Egito, A.A., McManus, C., 1999. Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. *Anim. Genetic Res.* 25, 107-121.
- Mcmanus, C., Paiva, S.R., Araujo, R.O., 2010. Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia.* 39, 236-246.
- Morais, O.R.O., 2001. O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: *Melhoramento genético aplicado à produção animal.* Belo Horizonte, FEPMUZ Editora, Brasil.
- Notter, D.R., 1999. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *Journal of Anim. Scien.* 77, 61-69.
- Paiva, S.R., Facó, O., Faria, D.A., Lacerda, T., Barretto, G.B., Carneiro, P.L., Lobo, R.N., McManus, C., 2011a Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 1449-57.
- Paiva, S.R., Mariante, A.S., Blackburn, H.D., 2011b. Combining US and Brazilian Microsatellite data for a Meta-Analysis of Sheep (*Ovis aries*) Breed Diversity: Facilitating the FAO Global Plan of Action for Conserving Animal Genetic Resources. *J. Heredity* 102, 697–704.
- Peter, C.H, Prinzenberg, E., Erhardt, G., 2005. Null allele at the OarAE129 locus and corresponding allele frequencies in German sheep breeds. *Anim. Genet.* 36, 92–93.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155, 945-959.
- Rosa, A.J.M. e Paiva, S.R., 2009. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Brasil.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L., 2000. Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis. Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva.
- Souza, C.A., Paiva, S.R., McManus, C.M., Azevedo, H.C., Mariante, A.S., Grattapaglia, D., 2012. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 11, 1217-1229.
- Tolone, M., Mastrangelo, S., Rosa, A.J.M., Portolano, B., 2012. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small. Rumin. Res.* 102, 18-25.
- Yeh, F.C., 2000. Population genetics. In: *Forest conservation genetics: principles and practice.* A. Young, D. Boshier & T. Boyle (eds.) pp. 21=37. Collingwood: CSIRO Publishing.

## **CAPITULO II**

### **APLICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA CONSERVAÇÃO E MELHORAMENTO DE REBANHOS DE OVINOS PANTANEIROS**

**Artigo Publicado:  
Electronic Journal of Biotechnology  
17 (2014) 317–321  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.09.007>  
ISSN 0717-3458**

## **Aplicação de marcadores microsatélites na conservação e melhoramento de rebanhos de ovinos Pantaneiros**

Bruno do Amaral Crispim<sup>1</sup>, Leonardo de Oliveira Seno<sup>2</sup>, Andréa Alves do Egito<sup>3</sup>, Fernando Miranda de Vargas Junior<sup>2</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados – FCBA/UFGD, Mato Grosso do Sul - Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados – FCA/UFGD, Mato Grosso do Sul – Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Corte – Campo Grande, MS - Brasil

### **Resumo**

Objetivou-se neste estudo utilizar marcadores microsatélites para avaliar a diversidade genética dos ovinos Pantaneiros com a finalidade de auxiliar planos de conservação e manejo visando aprimorar sistemas de acasalamento e taxa de endogamia. Um total de 127 animais pertencentes às populações provenientes da Fazenda Experimental da UFGD (Dourados/MS) e da Embrapa Pantanal (Corumbá/MS) foram genotipados com oito locos microsatélites. A população de Pantaneiros da UFGD foi a que apresentou maior número médio de alelos (11,13) e riqueza alélica (8,94). O conteúdo de informação polimórfica mostrou-se altamente informativo nos locos estudados, obtendo-se média de 0,71. A heterozigosidade observada foi menor que a esperada para todos os marcadores avaliados. A análise de variância molecular apresentou 5,2% de índice de diferenciação entre as populações. Os resultados dos diversos parâmetros estatísticos indicaram que as populações de ovinos estudadas necessitam de atenção na gestão de rebanhos, bem como a sua utilização como estoque de recursos genéticos animais no gerenciamento reprodutivo de outros rebanhos, objetivando dessa forma manter e enriquecer a base genética deste grupamento animal.

**Palavras-Chave:** diversidade genética, recurso genético animal, relação de parentesco, raça localmente adaptada

### **INTRODUÇÃO**

O grupamento genético de ovinos adaptado às condições do Pantanal Sul-Mato-Grossense [1], caracterizado também como Ovino Pantaneiro (OPT), pode servir como recurso genético animal para incremento na melhoria na cadeia produtiva de ovinos no Estado do Mato Grosso do Sul. As fêmeas destes ovinos possuem boa habilidade materna e sazonalidade reprodutiva nula [2, 3]. Os cordeiros apresentam potencial produtivo satisfatório com relação às características de carcaça e qualidade da carne [3,4]. Além disso, as OPTs oferecem a lã, que pode ser utilizada como matéria-prima no artesanato local.

As raças ovinas crioulas se destacam pela rusticidade e capacidade de adaptação a regiões de clima semiárido, tropical e subtropical no Brasil. Gomes et al. [1] descreveram que os ovinos Pantaneiros apresentam combinação alélica similar à das raças lanadas do Sul e deslanadas do Nordeste.

Estes animais apresentam características fenotípicas similares entre si, mas diferem quando comparadas às demais raças criadas no Brasil. Atualmente, pode-se observar que a OPT é

amplamente encontrada em diversas fazendas isoladas na região Sul-Mato-Grossense, vivendo há anos sem qualquer tipo de seleção com a finalidade de melhoramento genético, fato este que possibilita concluir que esses ovinos são localmente adaptados [2].

Marcadores genético-moleculares, como os microssatélites, podem complementar informações morfológicas e produtivas dos recursos genéticos, contribuindo para aumentar a eficiência dos processos de análise de diversidade e pureza genética além de gerar informações para planejamento de cruzamentos e seleção de genótipos em programas de melhoramento genético [5]. Os microssatélites são apropriados tanto para estudos de variabilidade genética quanto testes de paternidade. Estes marcadores são codominantes e apresentam heterozigosidade esperada frequentemente superior a 0,7, permitindo a discriminação entre indivíduos. Devido à especificidade dos ensaios de PCR e ao alto conteúdo de polimorfismo, esses marcadores permitem determinar a identidade entre indivíduos baseada em estimativas derivadas de frequências alélicas.

A avaliação da diversidade por meio de marcadores microssatélites tornou-se uma ferramenta de grande importância para programas de conservação e melhoramento genético de rebanhos de animais em núcleos de conservação.

Diante do exposto, objetivou-se neste estudo avaliar os marcadores microssatélites para caracterização e determinação da diversidade genética para fins de conservação e manejo com o intuito de melhorar o sistema de acasalamento e proporcionar a diminuição da consanguinidade das populações de ovinos Pantaneiros.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais**

Amostras de sangue de 127 animais foram coletadas em dois Núcleos de Conservação de Ovinos Pantaneiros. Um deles localizado na Fazenda Experimental da UFGD em Dourados/MS (N=69) com rebanho formado há aproximadamente oito anos, constituído de animais provenientes do Centro Tecnológico de Ovinocultura da ANHANGUERA-UNIDERP de Campo Grande/MS. E o outro localizado na Embrapa Pantanal (N=58) com rebanho formado há cerca de cinco anos, constituído de animais provenientes de diferentes locais da planície Pantaneira de Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil.

### **2.2. Locos microssatélites**

O DNA genômico total foi extraído usando 300 µL de sangue que foram encubados a 60°C com 3 µL de proteinase K (20mg= µL) e 500 µL de SDS 20% tecido sanguíneo baseado em um método orgânico.

Oito locos microssatélites (CSR247, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB304, OarCP49, SPS113, D5S2) foram utilizados para as reações de PCR. As reações foram realizadas em um sistema multiplex fluorescente incluindo todos os marcadores na mesma reação em um volume final de 10µl, contendo: 3,6µl de água ultrapura, 1,5µl de 10x tampão de PCR, 1,5µl de mix dos oligonucleotídeos iniciadores, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs, 0,4µl de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e 3,0 µl de DNA (50-100ng). Controles negativos foram utilizados para monitorar as reações.

Os ciclos de temperatura e condições para a amplificação foram constituídos de um passo inicial de desnaturação a 95°C por 7 minutos, 40 ciclos com desnaturação de 95°C por 30 segundos, anelamento a 63°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos. Ao final dos 40 ciclos realizou-se extensão final a 72°C por 30 minutos. Ao término da amplificação, as amostras foram resfriadas a 4°C.

Os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em um equipamento MegaBACE™ 1000 DNA Analysis Systems (GE Healthcare, USA). Para tanto, foi preparada uma solução com TWEEN e marcador de peso molecular ET-400 (GE Healthcare). Em cada amostra foram colocados 0,3µl do marcador ROX, 7,7µl de TWEEN 0.02X e 2µl do produto amplificado. A placa com as amostras foi desnaturada por 3 minutos a 94°C e colocada diretamente no gelo. A injeção das amostras foi feita a 3 KV por 80 segundos e a corrida a 8 KV por 80 minutos. Os resultados da genotipagem para discriminação alélica foi visualizada no programa Fragment Profiler version 1,2<sup>®</sup> (GE Healthcare)

## **Análises dos dados**

A frequência alélica foi estimada por contagem direta e os parâmetros de diversidade dos locos foram estimados para todos os microssatélites utilizando os programas CERVUS 3.0 [8], Microsatellite Toolkit, GenAlEx [9] e FSTAT [10] sendo eles: heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) e riqueza alélica (RA).

As estimativas de coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) e as estruturas populacionais foram avaliadas pelo método de análise da variância molecular (AMOVA) implementado no programa ARLEQUIN [11].

As distâncias genéticas aos pares entre todos os indivíduos foram estimadas pelo logaritmo de proporção de compartilhamento dos alelos (Dps) [12] utilizando o programa MICROSAT [13]. O método de agrupamento de Neighbor Joining (NJ) [14] foi utilizado para construir uma árvore baseada na matriz de distância genética por meio do pacote computacional PHYLIP [15], sendo o resultado gráfico obtido pelo programa TreeExplorer 2.1.2.

Baseado nos resultados dos genótipos dos 8 locos microssatélites, os indivíduos foram agrupados em determinado número de populações e assinalados probabilisticamente a grupos inferidos pela metodologia Bayesiana implementada no programa Structure [16]. Os testes foram realizados com base no modelo de miscigenação (*admixture model*), em que as frequências alélicas foram correlacionadas. Para escolher o número apropriado de populações inferidas, foram realizadas várias análises com k (número de populações inferidas) variando de 2 a 5 e 300.000 interações (período “*burn-in*” de 3000), com três repetições independentes para cada uma das análises. Os valores reais de K foram inferidos a partir da magnitude de  $\Delta K$  dada em função de K, com o auxílio do programa Structure Harvester [17] seguindo o modelo proposto por Evanno et al. [18].

## RESULTADOS

As análises estatísticas descritivas dos oito locos microssatélites para as populações de ovinos Pantaneiros representados pelos 127 animais genotipados foram demonstradas na Tabela 1. Todos os locos foram polimórficos e resultaram em um número total de 100 alelos. O número médio de alelos por loco foi de 12,5 (variando de 7 a 21 para os marcadores SPS113 e OarCP49, respectivamente).

**Tabela 1.** Variação genética dos microssatélites em OPT.

	Locos	N	Ho	He	PIC	EHW
<b>OPT</b> (n=127)	CDR247	13	0,80	0,79	0,76	NS
	D5S2	9	0,60	0,60	0,56	NS
	HSC	15	0,77	0,85	0,84	NS
	MAF214	9	0,54	0,58	0,81	NS
	OarAE129	12	0,40	0,69	0,72	***
	OarRCP49	21	0,72	0,78	0,76	NS
	OarFCB304	14	0,60	0,73	0,68	NS
	SPS113	7	0,58	0,65	0,60	***
	<b>Média</b>	12,5±4,40	0,62±0,13	0,71±0,09	0,71±0,09	2

Número de alelos por locos (N), Heterozigidade Observada (Ho) e Esperada (He), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e Equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW). NS - Não Significativo.

\*\*\* Em equilíbrio  $p < 0.001$

O conteúdo de informação polimórfica foi altamente informativo em todos os locos para as populações estudadas, obtendo-se média geral de 0,71.

A população da OPT-UFGD apresentou maior de número médio de alelos por locos (11,13), riqueza alélica (8,94), diversidade genética (0,73) e heterozigidade observada (0,67) em relação à população da Embrapa Pantanal. Considerando-se que valores de  $F_{IS}$  estão relacionados à maior homozigidade, o resultado indicou que o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi maior para a população da Embrapa Pantanal (0,08) e menor para a Pantaneira UFGD (0,06) (Tabela2).

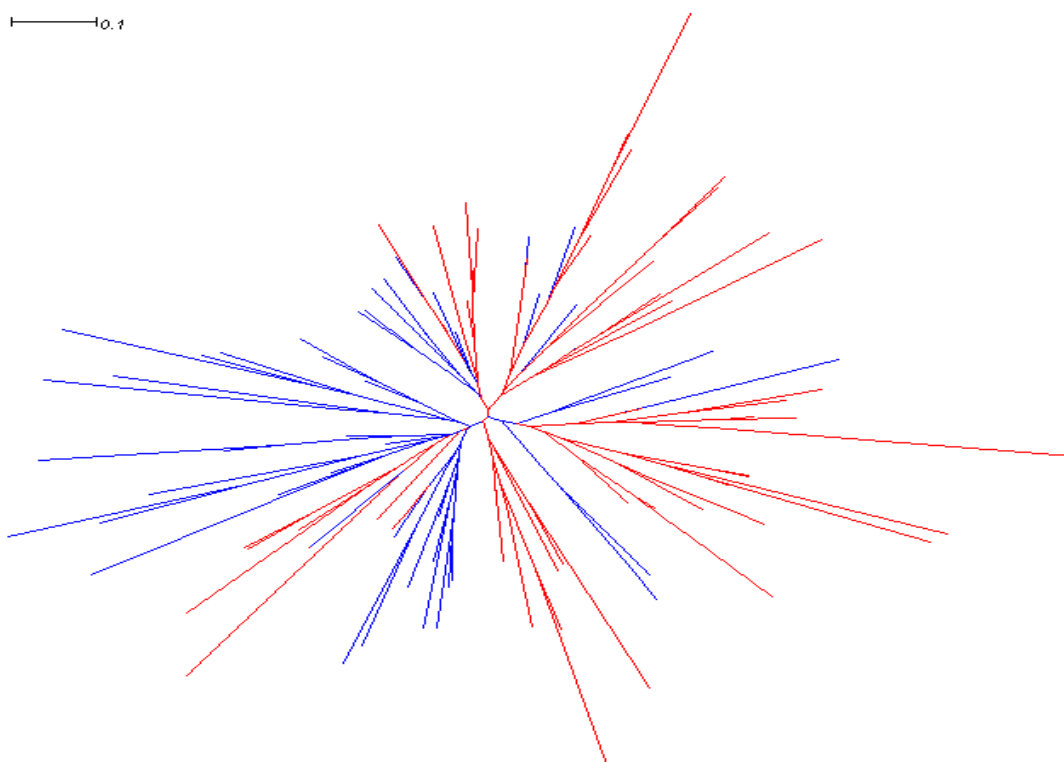
**Tabela 2.** Diversidade genética das populações de ovelha Pantaneira.

Populações	N	NMA	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	RA	DG	HWE
UFGD	69	11,13	0,67	0,74	0,06	8,94	0,73	2

Número de indivíduos (N), Número médio de alelos (NMA), Heterozigiosidade Observada (Ho) e Esperada (He), Coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), Riqueza alélica (RA) e Diversidade genética (DG), Número de locos em equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE).

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou diferença entre as populações de Pantaneira (5,2%). As estimativas de diferenciação genética baseadas em  $F_{ST}$  foram significativas ( $p < 0,002$ ). O dendrograma individual utilizando todos os animais das duas populações de Pantaneira foi construído a partir do método Neighbor Joining baseado nas estimativas de distância em função do compartilhamento alélico entre todos os 127 animais estudados. A maioria dos animais agrupou-se no dendrograma dentro da sua população, embora algumas exceções tenham sido observadas (Figura 1). Este resultado pode ser utilizado para auxiliar nos programas de gerenciamento dos recursos genéticos encontrados visando assim o aumento da variabilidade genética.

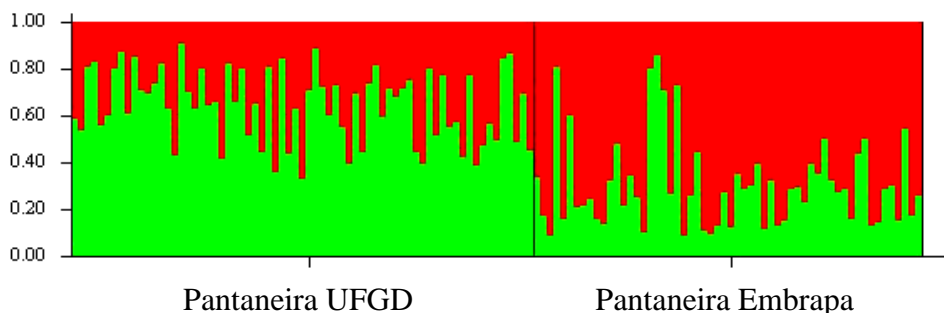
(Pantaneira UFGD = Vermelho e Pantaneira Embrapa Pantanal = Azul)



**Figura 1** - Dendrograma filogenético individual construído com base na matriz de distância genética de Neighbor Joining para as populações de Ovelha Pantaneira.

A estrutura genética das populações estudadas foi analisada por meio de estatística Bayesiana utilizando o programa Structure com números crescentes de populações inferidas pelo próprio programa. O  $K=2$  (Figura 2) corresponde ao  $K$  inferido pelo programa Structure Harvester, segundo metodologia proposta por Evano et al. [18], onde as duas populações de OPTs foram visualizadas por padrões de miscigenação complexos e com similaridade entre elas.





**Figura 2** - Agrupamento individual dos 127 indivíduos das populações de Pantaneiras UFGD e Embrapa, analisadas por meio de método estatístico Bayesiano utilizando-se o programa STRUCTURE. Cada animal foi representado por uma linha vertical dividida em segmentos classificados de acordo com a cor e tamanho que correspondeu à proporção relativa do genoma do animal referente a cada agrupamento particular.

## DISCUSSÃO

Os dados gerados a partir deste trabalho podem fornecer resultados preliminares da variação genética para os animais pertencentes ao grupamento genético de OPT oriundas de dois diferentes Núcleos de conservação Sul-Mato-Grossenses.

As análises dos marcadores indicaram que os oito locos de microssatélites foram considerados informativos para a análise de caracterização e diversidade genética da OPT, pois, apresentaram mais que quatro alelos diferentes por locos [19]. O número médio de alelos por locos encontrado foi de 12,5 que pode ser considerado alto quando comparado com outros trabalhos que utilizaram alguns deste marcadores em raças de ovinos [20,21,22], este fato demonstra a alta variabilidade existente na população de OPT, fato também observado em outras raças localmente adaptadas [23,24], e pode evidenciar a baixa seleção artificial imposta a população até o presente momento.

As médias de  $H_O$  (0,62) foram menores do que o  $H_E$  (0,71), o que pode indicar maior quantidade de homozigotos, reforçando a necessidade de estudos aplicados para a realização de manejo genético no rebanho visando aumento de heterozigosidade.

Os marcadores microssatélites utilizados para a OPT foram considerados altamente informativos, pois apresentaram PIC variando de 0,56 a 0,84 e quando foram analisados em conjunto apresentaram média de 0,71 [25]. Resultados similares foram encontrados por Arora et al. [26], Santos-Silva et al. [27] e Yilmaz & Karaca et al. [28] que obtiveram valores de PIC similares aos encontrados no presente estudo, indicando a eficiência destes marcadores em estudos de diversidade genética em OPT.

Dentre os marcadores analisados apenas dois apresentaram-se em equilíbrio de HWE (OarAE129 e SPS113) quando as populações de OPT foram analisadas em conjunto. Entretanto, quando as mesmas foram analisadas separadamente a OPT da Embrapa apresentou maior número

de locus em equilíbrio, este fato pode estar relacionado a diferença do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) observado nos rebanhos estudados.

O diferente nível de endogamia encontrado entre as populações de OPT (UFGD e Embrapa) pode estar relacionado ao sistema de acasalamento adotado nos diferentes rebanhos. Considerando que o gerenciamento reprodutivo destes animais atualmente é baseado em fenótipo, além de serem constituídas por indivíduos geneticamente relacionados, pequeno número de machos reprodutores para o sistema de criação adotado, desta forma a utilização de ferramentas moleculares com base em estudos de genótipos pode proporcionar um incremento para o melhoramento genético destes rebanhos.

As análises genéticas das duas populações de OPTs demonstraram heterozigosidade, número médio de alelos, riqueza alélica bem como diversidade genética alta (Tabela 2). Este fato pode ser devido à variabilidade genética encontrada em rebanhos submetidos a pouca intervenção de manejo como neste caso. Assim sendo, conservar a diversidade em rebanhos localmente adaptados é de grande importância para manutenção de estoque de recursos genéticos [29,30,31]; Dados similares a estes foram observados por Baumung et al. [20] e Tolone et al. [32] que também realizaram estudo com raças naturalizadas.

Os animais pertencentes ao rebanho da UFGD apresentaram valores diversidade genética, número médio de alelos, riqueza alélica maiores quando comparados aos da população da Embrapa. Este resultado evidencia a formação e o manejo dos dois núcleos de conservação. O rebanho da UFGD foi criado a partir de diferentes rebanhos e tem como prática habitual o intercâmbio de reprodutores de diferentes locais da região pantaneira enquanto que o rebanho da Embrapa apresenta baixo número de machos e encontra-se fechado há algum tempo. Diante do exposto, observa-se a necessidade do estabelecimento de programas de trocas de reprodutores com objetivo de minimizar o coeficiente parentesco entre as populações.

Os fatos citados acima podem estar associados inclusive aos resultados observados de diferenciação das populações em análise onde se verificou um nível significativo de variação genética de 5,2% ( $p < 0.002$ ) na AMOVA entre as populações de Pantaneiras. Associado aos sistemas de formação e manejo dos rebanhos amostrados, processos evolutivos recentes ocasionados por deriva genética e distância geográfica também podem ser incluídos como possíveis causadores desta diferenciação genética.

Baseado no dendrograma filogenético individual construído a partir de indivíduos oriundos das duas populações foi possível observar que grande parte dos animais pertencentes à mesma população se agruparam no mesmo cluster, embora alguns animais não seguiram este padrão (Figura 1). Santos-Silva et al. [27] realizando estudo com 6 raças nativas Portuguesas (Algarvia, Badana, Galega Bragançana, Galega Mirandesa, Mondegueira e Churra da Terra Quente)

visualizaram que os animais pertencentes a mesma população compartilhavam o mesmo cluster por meio da utilização de marcadores microssatélites semelhantes ao estudo.

Os resultados demonstrados por meio da Figura 2 baseado em estatísticas bayesianas mostraram que as duas populações de pantaneira se assemelham e possuem padrões de cluster similares por compartilharem alelos comuns, com pequenas diferenças que podem ser explicadas devido à deriva genética e sistema de manejo e seleção diferenciados.

Os resultados indicam a necessidade de extrema atenção na gestão dos rebanhos de ovinos pantaneiros, tanto na sua utilização como estoque de recursos genéticos animais quanto no gerenciamento reprodutivo de outros rebanhos, com o objetivo de proporcionar a manutenção e enriquecimento da base genética deste grupamento animal permitindo assim conservação de rebanhos com diversidade genética alta nessa região.

### **AGRADECIMENTOS**

À FUNDECT pelo auxílio financeiro para a execução da pesquisa, a UFGD pelo apoio, a CAPES pela concessão da bolsa. Ao Médico Veterinário Elton Bock Corrêa inspetor da ARCO (Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos) pela logística de acesso aos criadores de ovinos, a Dra. Raquel Soares Juliano pela disponibilização dos animais proveniente da Embrapa Pantanal e ao Msc. Marcio Rodrigues de Souza técnico da Fazenda experimental da UFGD que nos auxiliou na coleta de sangue dos animais do estudo.

### **REFERÊNCIAS**

- [1] Gomes WSG, Araújo AR, Caetano AR, Martins CF, Vargas Junior FM, McManus C et al. Origem e Diversidade Genética da Ovelha Crioula do Pantanal, Brasil. In: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México. 2007.
- [2] Vargas Junior FM, Longo ML, Seno LO, Pinto GS, Barbosa-Ferreira M, Oliveira DP. Potencial produtivo de um grupamento genético de ovinos nativos Sul-Mato-Grossenses. Pubvet. 2011; 177:1197.
- [3] Oliveira DP, Oliveira CAL, Martins EN, Vargas Junior FM, Seno LO, Pinto GS, Sasa A, Barbosa-Ferreira M. Parâmetros genéticos para características de desempenho em ovinos naturalizados Sul-Mato-Grossenses. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 2014; 35:963-972. Doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p963>
- [4] Martins CF, Pinto GS, Nubiato KEZ, Fernandes ARM. Características de carcaça de cordeiros nativos de Mato Grosso do Sul terminados em confinamento. Agrarian. 2012;5:384-92.
- [5] Faleiro F. Marcadores moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados; 2007.

- [6] MAPA. Instrução Normativa No. 74 de 20 de Outubro de 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília. 2004.
- [7] ISAG. Applied Genetics in Sheep and Goats Workshop. In: 32th International Conference on Animal Genetics. 2010. Available at [[www.isag.us/Docs/Applied\\_GeneticsSheepGoats\\_CT.pdf](http://www.isag.us/Docs/Applied_GeneticsSheepGoats_CT.pdf)]. ISAG, Edinburgh. Accessed January, 2014.
- [8] Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecology*. 2007;16:1099-1106. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- [9] Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. 2012; 28(19):2537-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbts460>.
- [10] Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J Hered*. 1995;86(6): 485-86.
- [11] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis. Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva. 2000.
- [12] Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. 1994;368:455-57. Doi: <http://dx.doi.org/10.1038/368455a0>
- [13] Minch E; Ruiz-Linares A; Goldstein DB; Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. Microsat2: A computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. Stanford, CA: Department of Genetics, Stanford University. 1998.
- [14] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4: 406-25.
- [15] Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. Seattle, WA: University of Washington; 2002.
- [16] Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155:945-59.
- [17] Earl DA, vonHoldt BM. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Res*. 2012;4: 359-61. Doi: <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- [18] Evano G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14:2611-20. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

- [19] Barker JSF. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph and Ontario, Canada 21, 1994:501–8.
- [20] Baumung R, Cubric-Curik V, Schwend K, Achmann R, Solkner J. Genetic characterization and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J Anim Breed Genet.* 2006;123:265–71. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0388.2006.00583.x>
- [21] d'Angelo F, Albenzio M, Sevi A, Ciampolini R, Cecchi F, Ciani E et al. Genetic variability of the Gentile di Puglia sheep breed based on microsatellite polymorphism. *J Anim Sci.* 2009;87:1205-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1224>
- [22] Calvo JH, Alvarez-Rodriguez J, Marcos-Carcavilla A, Serrano M, Sanz A. Genetic diversity in the *Churra tensina* and *Churra lebrijana* endangered Spanish sheep breeds and relationship with other Churra group breeds and Spanish mouflon. *Small Rumin Res.* 2011;95:34-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.09.003>
- [23] Paiva SR, Mariante AS, Blackburn HD. Combining US and Brazilian Microsatellite data for a Meta-Analysis of Sheep (*Ovis aries*) Breed Diversity: Facilitating the FAO Global Plan of Action for Conserving Animal Genetic Resources. *J Heredity.* 2011;102:697–704. Doi: <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esr101>
- [24] Souza CA, Paiva SR, McManus CM, Azevedo HC, Mariante AS, Grattapaglia D. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet and Mol Res.* 2012;11:1217-29. Doi: <http://dx.doi.org/10.4238/2012.May.8.4>
- [25] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am J Hum Genet.* 1980;32:314-31.
- [26] Arora R, Bhatia S, Mishra BP, Joshi BK. Population structure in Indian sheep ascertained using microsatellite information. *Anim Genet.* 2011;42:242-50. Doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02147.x>
- [27] Santos-Silva F, Ivo RS, Sousa MCO, Carolino MI, Ginja C, Gama LT. Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Rumin Res.* 2008;78:32–40. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.04.006>
- [28] Yilmaz O, Karaca O. Karya Koyunlarda Mikrosatellit İşaretleyicilerle Babalık Testi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012;18:807-13.
- [29] Mariante AS, Egito AA, Albuquerque MSM, Paiva SR, Ramos AF. Managing genetic diversity and society needs. *Rev Bras Zoot.* 2008;37:127-36. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008001300016>

- [30] Dalvit C, De Marchi M, Zanetti E, Cassandro M. Genetic variation and population structure of Italian native sheep breeds undergoing in situ conservation. *J Anim Sci.* 2009;87:3837-44. Doi: <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1682>
- [31] McClean, L, Waterman L, Roberts C. Genetic Analysis of Three Populations of BarbadosBlackbelly Sheep at Microsatellite Loci. *J Agri Scienc Technol.* 2011;1:1187-91.
- [32] Tolone M, Mastrangelo S, Rosa AJM, Portolano B. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Rumin Res.* 2012;102:18-25. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.010>

# **ANEXOS**

## **Artigos - Versões Publicadas**

## Review

# Molecular markers for genetic diversity and phylogeny research of Brazilian sheep breeds

Bruno do Amaral Crispim<sup>1\*</sup>, Márcia Cristina Matos<sup>2</sup>, Leonardo de Oliveira Seno<sup>3</sup> and Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados/MS, Brazil.

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal/SP, Brazil.

<sup>3</sup>Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados/MS, Brazil.

Accepted 2 October, 2012

**Brazilian sheep descended from several breeds brought to the New World by Portuguese and Spanish colonists, and they have evolved and adapted to local climatic variations and acquired tolerance or resistance to many diseases. Molecular markers are widely used in analyzing genetic variability, and markers such as amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), microsatellite, mtDNA and single nucleotide polymorphism (SNP) have facilitated the characterization of genetic diversity and population structure, and in the investigation of the natural history, behavior, and evolution of several sheep breeds. In this context, we present here a review of the uses of molecular markers in ecological and conservation research of Brazilian sheep breeds.**

**Key words:** DNA polymorphism, genetic conservation, *Ovis aries*.

## INTRODUCTION

Brazilian sheep originated from Portuguese and Spanish breeds that were introduced into the New World by colonists. Over the years, these breeds were subjected to natural selection of local environmental and edapho-climatic conditions, resulting in breeds that are currently considered naturalized, locally adapted, or native (Mariante et al., 1999). Agricultural census data collected by the Brazilian Institute of Geography and Statistics put the Brazilian sheep population at more than 17 million animals, center mainly in the southern and northeastern regions of the country.

Ovinoculture constitutes a sound economic option due to demands for meat (Aro et al., 2007). Naturalized

breeds are often preferred due to their rustic characteristics and adaptability in tropical and subtropical climates, giving these breeds important attributes and offering future genetic resources.

The naturalized Brazilian breeds are usually small animals that have been subjected to only weak levels of artificial selection and sustainable genetic improvement, and they are little specialized for intensive milk and/or meat production (Paiva et al., 2005a). The general traits of well-known naturalized breeds in Brazil are described in Table 1.

The survival and preservation of naturalized breeds with important genetic heritages were threatened during the 20<sup>th</sup> century, by indiscriminate crossbreeding with exotic breeds (mainly from Africa and Europe) (Morais, 2001). It should be noted that these naturalized animals have many adaptive traits that make them useful for breeding and production, such as: tolerance or resistance to diseases and parasites, and extensive adaptations related to the availability and quality of food resources and water – as the animals that were better adapted and/or more resistant survived and reproduced. Naturalized breeds therefore represent the results of

\*Corresponding author. E-mail: [brunocrispim.bio@gmail.com](mailto:brunocrispim.bio@gmail.com).

**Abbreviations:** **SNP**, single nucleotide polymorphism; **PCR**, polymerase chain reaction; **AFLP**, amplified fragment length polymorphism; **PCR/RFLP**, restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction; **RAPD**, random amplified polymorphic DNA; **STR**, simple sequence repeats; **SRY**, sex-determining region Y; **COI**, cytochrome oxidase I.



**Table 1.** Origins, sites of occurrence, and phenotypic traits of naturalized Brazilian sheep breeds.

Breed	Origin	Site of occurrence	Phenotypic trait	Reference
Crioula Lanada	Crossbreeding between local and exotic breeds: Spanish Lacha, Romney Marsh and Corriedale, as well as herds introduced by Portuguese colonizers	Rio Grande do Sul State; South America (from Peru to Uruguay)	Face and extremities uncovered. Wool ranges from white to black, medium length, suitable for wool production; Resistant to endoparasites.	Mariante et al., 2003; ARCO, 2011
Santa Inês	Crossbreeding between Bergamacia, Morada Nova and mixed races from Northeastern Brazil (possibly of African origin)	Northeastern Brazil (Ceará, Maranhão, Sergipe, among other states)	Woolless, short hair, small animals. High quality meat with low fat content. Of economic importance due to their sizes and environment adaptations.	Mariante et al., 2003; Paiva, 2005a
Morada Nova	Crossbreeding between African and Portuguese Bordaleiro	Northeastern Brazil (Ceará, Piauí, among other states)	Woolless; no horns; red, white or cream wool; with or without earrings. Suitable for meat production and high quality leather.	Oklahoma State University, 2007; ARCO, 2011
Brazilian Bergamacia	Originally from Italy	Northeastern Brazil (Bahia) and temperate climate states in the central-western region	Large size, white wool Rustic with multiple uses (meat, wool and milk)	ARCO, 2011
Brazilian Somalis	Somalia and Ethiopia	Northeastern Brazil (Ceará and Rio Grande do Norte states)	High fertility, fat rump, with some wool on the body, good meat and leather production	ARCO, 2011
Damara (Rabo Largo)	Northwestern Namibia and southern Angola*	Northeastern Brazil (arid regions)	Medium size, good meat and leather production, woolless animals	ARCO, 2011
Black belly	African origin	Northeastern Brazil and a conservation nucleus in Roraima State	High fertility and reproductively efficient, woolless animals	Oklahoma State University, 2007

\*The hypothesis that Rabo Largo is derived from Damara was not confirmed by microsatellite marker analyses (Paiva et al., 2005a).

long-term natural selection processes.

Conservation and genetic improvement programs focusing on naturalized animals are important to avoid both their inbreeding and indiscriminate crossbreeding, so that pure native breeds can be conserved. In this context, it would be necessary to design production systems that allow producers to use local breeds more efficiently for better financial returns (Notter, 1999). Research on the adaptive traits of different breeds are important for supporting livestock production systems based on native breeds, reducing environment impacts, and obtaining better products for commercial consumption.

Recent technological developments and new molecular tools have dated researchers discovering the origins and domestication processes of a wide variety of species.

These tools have aided our understanding of the evolutionary relationships, taxonomies, and demographics of a wide variety of species and provided support for identifying priority areas for preservation programs and for analyzing genetic diversity in both domestic species and wild and endangered species (Rosa and Paiva, 2009; Grisolia and Moreno-Cotulio, 2012).

Single nucleotide polymorphism (SNP) markers have begun to provide new perspectives for genomic studies, particularly in investigations of the diversities of the genomes of individuals and populations, in the search for genes that cause diseases, and in the identification of selection signatures (Kijas et al., 2012; Pariset et al., 2012).

This review discusses the evolution of the use of molecular markers in analyzing the genetic diversity and

phylogeny of naturalized Brazilian sheep breeds.

## MOLECULAR MARKERS

Molecular markers can be considered as any molecular phenotype derived from a specific DNA segment, and correspond to regions that are expressed (or not) in the genome (Ferreira and Grattapaglia, 1996). Isozyme markers were initially developed, which are direct products of gene expression (Oliveira et al., 2002), but were followed by molecular markers that amplify DNA chains using polymerase chain reaction (PCR).

Research focusing on patterns of genetic variation of certain loci markers within a population make it possible to minimize the impacts generated by crossbreeding between naturalized animals, ensuring the conservation of their genetic diversity. These studies provide information about loss of intra-population genetic variability as a consequence of reductions in the effective size of populations – leading to increases in consanguinity and genetic drift (Kantanen et al., 1999).

The use of nuclear DNA molecular markers can increase the efficiency of genetic breeds programs through selection and by avoiding crossbreeding within the same generation (Melo et al., 2008). The polymorphic markers currently used in genetic diversity analyses are: amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction (PCR/RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), microsatellites or simple sequence repeats (STR), sex-determining region Y (SRY) and SNP.

The AFLP technique is based on PCR amplification of a subset of fragments obtained from the site-specific cleavage of genomic DNA by type II restriction enzymes (Lopes et al., 2002). This technique has been found to be efficient in studies of genetic diversity in sheep, such as those of Xiao et al. (2009) who analyzed this marker in six breeds of sheep in China.

PCR/RFLP detects patterns of polymorphisms among different individuals and is based on the differences in the sizes of restriction fragments generated by endonuclease cleavage of amplified DNA regions. PCR-RFLP analysis of molecular markers in phylogenetically related species has been used to elucidate ambiguous taxonomic classifications. Paiva et al. (2005a), examining this marker in part of the cytochrome oxidase I (COI) mitochondrial gene (1052 base pairs fragment) was able to show that the main breeds of naturalized Brazilian sheep were of European origin (such as Santa Ines and Bergamacia), although other naturalized breeds (such as Somalis and Morada Nova) were of African origin.

RAPD studies are based on polymerase chain reactions, using primers homologous to target sites in the genome. This marker aids in deciphering patterns of genetic variation and can be used to direct conservation measures for threatened or endangered species.

Although there are many advantages to the use of this marker, there are also some disadvantages in terms of low reproducibility (Paiva et al., 2005b) and the formation of heteroduplex is a characteristic of dominance, but a number of researchers have demonstrated the efficiency of this technique in genetic diversity studies of sheep breeds in Pakistan (Qasim et al., 2011), Indian (Kumar et al., 2003), and Turkey (Elmaci, 2007).

Another technique widely used for characterizing genetic variability, individual identifications, paternity testing, the construction of genetic maps, and studies of population genetics employs microsatellites. Microsatellites have high mutation rates, abundances, and distributions throughout the genome, and show neutrality and co-dominance, and the easy automation of analytical procedures allow their use in estimating genetic diversity between and within breeds (Ligda et al., 2009). Microsatellite markers show good reproducibility and high degrees of polymorphism (Cañon et al., 2000; Grisolia et al., 2007) and are widely used in characterizing the genetic diversity of sheep breeds (Ramey II et al., 2000; Arranz et al., 2001).

SRY molecular markers are extremely sensitive probes of paternal inheritance and are used to elucidate genetic histories, the processes of breed domestication, population relationships, and male gene-flow. The use of SRY markers combined with the Y chromosome can provide specific details of the gene-flow in males. The numbers of research projects in sheep using the Y chromosome have been quite limited, however, when compared to other domestic animals such as cattle (Hanotte et al., 2000; Pérez-Pardal et al., 2009) and goats (Pidancier et al., 2006; Sechi et al., 2009). Only one microsatellite locus (SRYM18) and eight SNP, located in the region 5' of the promoter of the sex-determining gene (SRY), have been identified in sheep (Meadows et al., 2006; Meadows and Kijas, 2009).

SNP markers are based on elementary alterations in the DNA molecule, that is, mutations in single nucleotides (adenine, cytosine, thymine, or guanine), and are bi-allelic, that is, only two variants are generally found in a single species (such as an allele corresponding to the base pair A/T and the other to G/C). SNPs are extremely abundant in the genomes of non-endogamic species and can occur in coding regions or with regulatory functions – although, in most cases, they are found in intergenic spacer regions. Until recently, the standard techniques of prospecting for SNP markers were based on Sanger's sequencing method, although second-generation sequencing technologies (Roche 454 - Margulies et al., 2005; Solexa-Illumina – Bennett, 2004; and ABI Solid - Valouev et al., 2008) are now able to produce large data sets (on the order of millions of sequenced bases).

As such, a number of molecular markers can be used to analyze genetic diversity, and while microsatellites have been widely employed (McManus et al., 2010; Paiva et al., 2011b; Souza et al., 2012), SNPs have been

found to be very useful in these studies (Kijas et al., 2012).

### Microsatellites

Microsatellites are the most frequently used markers to explore genetic diversity and the population structures of domestic animals (Baumung et al., 2004). Relatively large genome abundance and high levels of polymorphism and co-dominance in this kind of marker make it an important tool for genomic analyses (Crispim et al., 2012).

Evaluations of eight microsatellite loci polymorphism in five unrelated sheep breeds (Romney, Border Leicester, Suffolk, Awassi, and Australia and New Zealand Merino) showed highly significant differences in allelic frequencies among individuals, indicating that microsatellite markers can be valuable tools in evaluating evolutionary relationships between breeds (Buchanan et al., 1994). Arranz et al. (1998) and Stahlberger-Saitbekova (2001) used microsatellites for genotypic characterization and assessment in Spanish and Swiss sheep breeds, respectively, and these markers were found to be efficient for evaluating genetic diversity and calculating the genetic distances between the animals involved.

Almeida (2007) determined the variability of 20 microsatellites in 717 animals of 14 Portuguese sheep breeds, which allowed this author to evaluate the degree of structuring in these Portuguese sheep populations and estimate genetic diversity parameters for each breed. Several studies have used microsatellite markers to investigate local Brazilian breeds. Paiva et al. (2005a) used microsatellite markers for 18 loci to evaluate genetic diversity in both naturalized and exotic sheep (Santa Ines, Bergamacia, Rabo Largo, Morada Nova, and Somalis) and the results were efficient in characterizing the breeds, although they showed low genetic variability.

Microsatellites have thus been shown to be excellent marker for the characterization of naturalized breeds (Paiva et al., 2003) and in population studies (Paiva et al., 2005b; El Nahas et al., 2008). Table 2 lists the microsatellite markers data recommended for paternity testing and genetic diversity and variations in sheep by the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2011).

### Mitochondrial DNA markers

Mitochondria have their own circular DNA (mtDNA) and replication capacities. Mitochondrial inheritance is also known as maternal inheritance as the molecular markers in mitochondrial DNA are only passed through the female (distinct from the biparental inheritance of most nuclear molecular markers) (Olson et al., 2009). The unique genetic and structural characteristics of mitochondrial

markers have been explored by a number of researchers.

mtDNA sequencing can be used as a tool for determining evolutionary origins and population dynamics, and is useful in domestication studies because mtDNA has high mutation rates, lacks recombinants, and is maternally inherited – thus allowing the evaluation of divergence between wild and domestic populations over the relatively short time scales of human domestication (Bruford et al., 2003; Toro et al., 2009). mtDNA has been used to investigate the origin of bovines (Loftus et al., 1994), equines (Vila et al., 2001), swine (Giuffra et al., 2000; Larson et al., 2005), goats (Joshi et al., 2004; Sardina et al., 2006), and sheep (Wood and Phua, 1996; Hiendleder et al., 1998; Guo et al., 2005; Pedrosa et al., 2005; Pereira et al., 2006; Tapio et al., 2006; Meadows et al., 2006).

Bruford et al. (2003) demonstrated that the majority of mtDNA sheep lineages are derived from a probable site of initial domestication in the “Fertile Crescent” region (which now comprises Israel, West Bank, and some regions of Lebanon, as well as Jordan, Syria, Iraq, Egypt, southeastern Turkey and southwestern Iran). According to Olson et al. (2009), many mitochondrial genes are highly conserved, so these markers can be used to examine very long-term phylogenetic and taxonomic relationships. Indiscriminate crossbreeding between different sheep breeds makes their characterization by nuclear molecular markers more difficult, but mtDNA markers may help solve problems related to the origins of several naturalized breeds throughout the world.

A study of genetic diversity undertaken by Meadows et al. (2005) that examined 17 sheep breeds of European and Asian origin found 57 single haplotypes among the 121 animals sequenced. The distributions of the haplotypes indicated that most of the animals were confined to a single breed (51 from 57), while six haplotypes were present in more than one breed. The distributions of these differences showed five distinct peaks, which indicated the presence of divergent haplotype groups. The majority of the haplotypes formed one large group that contained sheep lineage B (of European origin), while the remaining haplotypes formed a separate group (probably corresponding to lineage A of Asian origin).

Paiva et al. (2005a) examined six breeds of naturalized sheep in Brazil and observed an overwhelming presence of the European haplogroup, except for two Dorper animals (of African origin), which had mtDNA typical of the Asian haplogroup. These results support the hypothesis that Brazilian sheep originated largely from the European continent.

Gonçalves et al. (2010) examined the mitochondrial sequences of the ND5 gene (of subunit 5 of NADH dehydrogenase) in 225 animals of two native breeds (Frontier and Mountain) from southern Brazil (Santa Catarina and Rio Grande do Sul states) and observed significant differences between them. Bayesian phylo-

**Table 2.** Microsatellite markers panel of the International Society for Animal Genetics (ISAG) and FAO by locus, chromosome, primer sequences, annealing temperature, genbank accession number, and allele size in base pairs.

Locus	Chromosome	Primer sequence (5' > 3') forward and reverse	Annealing temperature (°C)	Genebank access number	Allele sizes (bp)
OarFCB128	OAR2	ATTAAAGCATCTTCTCTTTATTTCTCGC CAGCTGAGCAACTAAGACATACATGCG	55	L01532	96-130
OarCP34	OAR 3	GCTGAACAATGTGATATGTTTCAGG GGGACAATACTGTCTTAGATGCTGC	50	U15699	112-130
OarCP38	OAR 10	CAACTTTGGTGCATATTCAAGGTTGC GCAGTCGCAGCAGGCTGAAGAGG	52	U15700	117-129
OarHH47	OAR 18	TTTATTGACAACTCTCTTCTTAAGTCCACC GTAGTTATTTAAAAAATATCATACTCTTAAGG	58	L12557	130-152
OarVH72	OAR 25	GGCCTCTCAAGGGGCAAGAGCAGG CTCTAGAGGATCTGGAATGCAAAGCTC	57	L12548	121-145
OarAE129	OAR 5	AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG GTAGATCAAGATATAGAATTTTTTCAACACC	54	L11051	133-159
BM1329	OAR 6	TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC AACACCGCAGCTTCATCC	50	G18422	160-182
BM8125	OAR 17	CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG GGGGGTTAGACTTCAACATACG	50	G18475	110-130
HUJ616	OAR 13	TTCAAACACTACACATTGACAGGG GGACCTTTGGCAATGGAAGG	54	M88250	114-160
DYMS1	OAR 20	AACAACATCAAACAGTAAGAG CATAGTAACAGATCTTCCTACA	59	...	159-211
SRCRSP9	CHI12	AGAGGATCTGGAAATGGAATC GCACTCTTTTCAGCCCTAATG	55	L22201	99-135
OarCB226	OAR 2	CTATATGTTGCCTTTCCCTTCCTGC GTGAGTCCCATAGAGCATAAGCTC	60	L20006	119-153
ILSTS5	OAR 7	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	55	L23481	174-218
ILSTS11	OAR 9	GCTTGCTACATGGAAAGTGC CTAAAATGCAGAGCCCTACC	55	L23485	256-294
ILSTS28	OAR 3	TCCAGATTTTGTACCAGACC GTCATGTCATACCTTTGAGC	53	L37211	105-177
SRCRSP5	OAR 18	GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG GTTTCTTTGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	56	L22197	126-158
MAF214	OAR 16	GGGTGATCTTAGGGAGGTTTTGGAGG AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG	58	M88160	174-282
SRCRSP1	CHI13	TGCAAGAAGTTTTTCCAGAGC ACCCTGGTTTCACAAAAGG	54	L22192	116-148

**Table 2.** Continued.

MAF33	OAR 9	GATCTTTGTTTCAATCTATTCCAATTC GATCATCTGAGTGTGAGTATATACAG	60	M77200	121-141
MCM140	OAR 6	GTTCTACTTCTGGGTACTGGTCTC GTCCATGGATTTGCAGAGTCAG	60	L38979	167-193
OarFCB20	OAR 2	AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC	56	L20004	95-120
OarFCB193	OAR 11	TTCATCTCAGACTGGGATTCAGAAAGGC GCTTGAAATAACCCCTCTGCATCCC	54	L01533	96-136
OarFCB304	OAR 19	CCCTAGGAGCTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	56	L01535	150-188
OarJMP29	OAR 24	GTATACACGTGGACACCGCTTTGTAC GAAGTGCAAGATTCAGAGGGGAAG	56	U30893	96-150
OarJMP58	OAR 26	GAAGTCATTGAGGGGTCGCTAACC CTTCATGTTACAGGACTTTCTCTG	58	U35058	145-169
MAF65	OAR 15	AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCTCTCCTCTGAGAATATAACATG	60	M67437	123-127
MAF70	OAR 4	CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC	60	M77199	124-166
MAF209	OAR 17	GATCACAAAAGTTGGATACAACCGTGG TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG	63	...	...
BM1824	OAR 1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC CATTCTCCAAGTCTTCTCTG	58	...	...
INRA063	OAR 14	ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	58	...	...

genetic analysis based on ND5 18 haplotypes pointed to the following geographic structures: the frontier haplotype was clustered in a monophyletic clade, while the mountain haplotype showed two paraphyletic clusters. The studies indicated the occurrence of geographic isolation associated with differences in the ways the herds were distributed (which could have caused gene flow reductions)—thus reinforcing the idea that they are two evolutionary lineages.

Paiva et al. (2011a) analyzed the Somali sheep breed in northeastern Brazil using molecular and pedigree data, microsatellites, and 404 bp of mtDNA control region and obtained an average of 5.32 alleles of herd diversity, with an expected heterozygosity of 0.5896 and an observed heterozygosity of 0.6451 for the microsatellite loci. Sixteen mtDNA haplotypes were identified, and network analysis made it possible to observe the relationships between all of the haplotypes identified. The mitochondrial genetic variability in this population indicated at least two major haplotypes groups. The maintenance of

several similar haplotypes is not desirable in herd genetic conservation, and it would therefore be better to maintain isolated populations of individuals with distinct haplotypes.

When the control regions of mitochondrial DNA (mtDNA) were sequenced to identify phylogenetic relationship between naturalized and commercial Brazilian sheep breeds, the nucleotide diversity value was found to be 0.005 (Silvério et al., 2006). These results indicated that mtDNA AMOVA values were greater than those of nuclear markers. Naturalized Brazilian breeds showed deviations from selective neutrality, as tested by Fu's  $F_s$  ( $p < 0.01$ ), suggesting that these populations are undergoing demographic expansion.

### Single nucleotide polymorphism (SNP)

SNP markers used in association studies, genetic mapping, diagnostic paternity assays, individual identification

(traceability), and to detect genetic diseases and/or polymorphisms associated with production traits have long been limited by technological constraints. However, there have been significant advances in the sequencing of mammalian genomes and in the development of bioinformatics tools during the last decade that have improved SNP massal genotyping.

Until recently, the standard method of prospecting for SNP markers was based on Sanger's sequencing method, but there are now high-density SNP panels, that have high-coverage genome-wide SNP with markers and there is the probability that these SNP are close to genes of interest and account for some of the population genetic variation. Kijas et al. (2009) developed a panel of 1,536 SNP from 23 domestic and two wild breeds of sheep to analyze the nuclear genome, generating clusters of large groups based on the animals' geographic origins and could excessively identify the population substructures within individual breeds. The high-density genotyping platform available for this specie currently belongs to Illumina (San Diego, CA). The Ovine SNP50 BeadChip was developed in collaboration with the International Genomics Consortium Sheep and contains more than 54,000 SNP, providing uniform genome coverage. This chip was validated in 75 economically important sheep breeds, including Brazilian breeds such as Santa Ines, Morada Nova, and Crioula Lanada. The applications of such high-density chips include association studies of genomic selection, paternity testing, and pedigree mismatching, as well as more accurate analyses of the diversity and compositions of animal breeds (Illumina, 2012).

A genome-wide association study (GWAS) of 486 typed animals of the Wild Soay breed (*Ovis aries*) was undertaken by Jhonston et al. (2011) with the Ovine SNP50 BeadChip and identified (using ~36,000 SNP) by an autosomal gene candidate for horns (RXFP2, *Relaxin-like receptor 2*). It also appears that there is an additional SNP in the gene which is supported by a new model of horn inheritance in this breed. Thus, the SNP50 BeadChip could be used to determine if the same gene group could explain horn polymorphisms in different breeds or species.

Kijas et al. (2012) conducted a study with the goal of assembling a global diversity chip of sheep breeds and typed 2,819 animals from 74 sheep breeds from Asia, Africa, Southwest Asia (Middle East), Caribbean, North America, South America (Santa Ines and Morada Nova), Europe and Australia using the Ovine SNP50 BeadChip (~49,034 SNP). Among the reported results, they were able to show that sheep breeds have maintained high levels of genetic diversity (in contrast to other domestic species such as dogs). These authors also identified specific genomic regions that contained strong evidence of the rapid changes of artificial selection in sheep evolution.

In order to understand genetic structure, it is essential

to reach the genetic improvement by genome-wide association studies, genomic selection, and dissection of quantitative characteristics (Kijas et al., 2009). Thus, the information provided by dense SNP chips can aid in our understanding of genetic structure and the recent evolution of domestic species.

Paiva et al. (2012) conducted a research project using 17 markers in 467 individuals of six sheep breeds (Crioula n=300 Bergamacia n=24; Corriedale n=28; Pantaneira n=50; Rabo Largo n=20; Santa Ines n=45). Only two SNP markers did not produce consistent results and were excluded. The selected markers were then used in allocation tests using the structure of five repetitions with a total of 250k permutations each, which was efficient in distinguishing between the breeds. The only exceptions were Pantaneira and Crioula, which were grouped together, suggesting that they were closely related and probably should be classified as two ecotypes of the same breed. Thus, even a reduced panel could serve as a useful tool for animal breed-certification and the identification of their sub-products.

## PERSPECTIVES

Analyses of patterns of molecular genetic variation are fundamental to reconstructing the evolutionary history of species and breeds, as well as for evaluating their genetic diversity, population structures, and their taxonomic definitions – which can help us to conserve and reproduce these breeds and minimize loss of genetic variability. Microsatellite and mitochondrial molecular markers are very useful in conservation studies, although SNP markers are rapidly becoming the markers of choice in genetic studies due to their genomic abundance and low costs for large-scale genotyping. The implementation of sequencing projects in domestic species will allow breeders and scientists to objectively evaluate genetic resources, and the genetic variability linked to productive traits and resistance or tolerance to diseases in naturalized breeds represent an obvious target.

## REFERENCES

- Almeida PAR (2007). Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA – microssatélites: uma perspectiva de conservação. Doutorado em Ciência Animal. Universidade Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- ARCO (2011). Assistência ao Rebanho de Criadores de Ovinos. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. <http://www.arcoovinos.com.br>. Accessed 10 de February 2012.
- Aro DT, Polizer KA, Pena SB (2007). O Agronegócio na Ovinocultura de Corte no Brasil. Rev. Cien. Eletro. Med. Vet. 9(5):1-6.
- Arranz JJ, Bayón Y, Primitivo FS (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. Anim. Genet. 29(6):435-440.
- Arranz JJ, Bayón Y, San Primitivo F (2001). Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. Small Rumin. Res. 39(1):3-10.
- Baumung R, Simianer H, Hoffmann I (2004). Genetic diversity studies in farm animals – a survey. J. Anim. Breed. Genet. 121:361-373.
- Bennett S (2004). Solexa Ltd. Pharmacogenomics 5(4):433-438.

- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003). DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat. Rev. Genet.* 4(11):900-910.
- Buchanan FC, Adams LJ, Littlejohn RP, Maddox JF, Crawford AM (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22:397-403.
- Cañon J, Checa ML, Carleos C, Vega-Pla JL, Vallejo M, Dunner S (2000). The genetic structure of Spanish celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim. Genet.* 31(1):39-48.
- Crispim BA, Silva DBS, Banari AC, Seno LO, Grisolia AB (2012). Discriminação Alélica em Ovinos Naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por Meio de Marcadores de Microsatélites. *J. Selva Andina Res. Soc.* 3(1):3-13.
- El Nahas SM, Hassan AA, Mossallam AAA, Mahfouz ER, Bibars MA, Oraby HAS e Hondt HA (2008). Analysis of genetic variation in different sheep breeds using microsatellites. *Afr. J. Biotechnol.* 7(8):1060-1068.
- Elmaci C, Oner Y, Ozis S, Tuncel E (2007). RAPD Analysis of DNA Polymorphism in Turkish Sheep Breeds. *Biochem. Genet.* 45:691-696.
- FAO (2011). The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture, edited by Barbara Rischkowsky & Dafydd Pilling. Rome.
- Ferreira ME, Grattapaglia D (1996). Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª Ed. Embrapa/Cenargen, Brasília-DF, Brazil.
- Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon JT, Anderson L (2000). The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154:1785-1791.
- Gonçalves GL, Moreira GR, Freitas TR, Hepp D, Passos Weimer TADT (2010). Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep. *Anim. Genet.* 41(3):308-310.
- Grisolia AB, Moreno-Cotulio VR (2012). Molecular Markers and Genetic Diversity in Neotropical Felids, Analysis of Genetic Variation in Animals, Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0093-5, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/analysis-of-genetic-variation-in-animals/molecular-markers-and-genetic-diversity-in-neotropical-felids>.
- Grisolia AB, Moreno VR, Campagnari F, Milazzotto M, Adania CH, Garcia JF, Souza EB (2007). Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. *Genet. Mol. Res.* 6(2):382-389.
- Guo J, Du LX, Ma YH, Guan WJ, Li HB, Zhao QJ, Li X, Rao SQ (2005). A novel maternal lineage revealed in sheep (*Ovis aries*). *Anim. Genet.* 36:331-336.
- Hanotte O, Tawah CL, Bradley DG, Okomo M, Verjee Y, Ochieng J, Rege JE (2000). Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan Africa cattle breeds. *Mol. Ecol.* 9(4):387-396.
- Hiendleder S, Lewalski H, Wassmuth R, Janke A (1998). The Complete Mitochondrial DNA Sequence of the Domestic Sheep (*Ovis aries*) and Comparison with the Other Major Ovine Haplotype. *J. Mol. Evol.* 47(4):441-448.
- Illumina (2012). Ovine SNP50 Genotyping BeadChip. [http://www.illumina.com/documents/products/5Cproducts/5Cdatasheets/5Cdatasheet\\_ovinesnp50.pdf](http://www.illumina.com/documents/products/5Cproducts/5Cdatasheets/5Cdatasheet_ovinesnp50.pdf). Accessed 10 de February 2012.
- Johnston SE, McEwan JC, Pickering NK, Kijas JW, Beraldi D, Pilkington JG, Pemberton JM, Slate J (2011). Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. *Mol. Ecol.* 20(12):2555-2566.
- Joshi MB, Rout PK, Mandal AK, Tyler-Smith C, Singh L, Thangaraj K (2004). Phylogeography and origin of Indian domestic goats. *Mol. Biol. Evol.* 21(1):454-462.
- Kantanen J, Olsaker I, Adalsteinsson S, Sandberg K, Eythorsdottir E, Pirhonen K, Holm LE (1999). Temporal changes in genetic variation of North European cattle breeds. *Anim. Genet.* 30(1):6-28.
- Kijas JW, Lenstra JA, Hayes B, Boitard S, Porto Neto LR, San Cristobal M, Servin B, McCulloch R, Whan V, Gietzen K, Paiva S (2012). Genome-Wide Analysis of the World's Sheep Breeds Reveals High Levels of Historic Mixture and Strong Recent Selection. *PLoS. Biol.* 10(2):e1001258. doi:10.1371/journal.pbio.1001258.
- Kijas JW, Townley D, Dalrymple BP, Heaton MP, Maddox JF, McGrath A, Wilson P, Ingersoll RG, McCulloch R, McWilliam S, Tang D, McEwan J, Cockett N, Oddy VH, Nicholas FW, Raadsma H (2009). A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. *PLoS ONE* 4(3):4668.
- Kumar KG, Kumar P, Bhattacharya TK, Bhushan B, Patel AK, Choudhary V, Sharma A (2003). Genetic Relationship Among Four Indian Breeds of Sheep Using RAPD-PCR. *J. Appl. Anim. Res.* 24(2):177-183.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A (2005). Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307(5715):1618-1621.
- Ligda CH, Altarayrah J, Georgoudis A (2009). Genetic analysis of Greek sheep breeds using microsatellite markers for setting conservation priorities. *Small Rumin. Res.* 83(1):42-48.
- Loftus RT, Machugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham EP (1994). Evidence for two independent domestications in cattle. *Proc. Natl Acad. Sci.* 91:2757-2761.
- Lopes MS, Lopes MTG, Figueira A, Camargo LEA, Fungaro MHP, Carneiro MS, Vieira MLC (2002). Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Biotecnol. Cienc. Desenvolv.* 29(5):56-60.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057):376-380.
- Mariante AS, Albuquerque MSN, Egito AA, McManus C (1999). Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. *Anim. Genet. Res. Inform.* 25(1):107-121.
- Mariante AS, McManus C, Mendonça JF (2003). Country report on the state of animal genetic resources: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brazil.
- McManus C, Paiva SR, Araújo RO (2010). Genetics and breeding of sheep in Brazil. *R. Bras. Zootec.* 39:236-246.
- Meadows JRS, Li K, Kantanen J, Tapio M, Sipos W (2005). Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *J. Hered.* 96(5):494-501.
- Meadows JRS, Hanotte O, Drögemüller C, Calvo J, Godfrey R, Coltman D, Maddox JF, Marzanov N, Kantanen J, Kijas JW (2006). Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. *Anim. Genet.* 37(5):444-453.
- Meadows JRS, Kijas JW (2009). Re-sequencing regions of the ovine Y chromosome and wild sheep reveals novel paternal haplotypes. *Anim. Genet.* 40(1):119-123.
- Melo DC, Oliveira DAA, Seerig A, Carvalho DC (2008). Aplicações práticas de marcadores microsatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 32(4):220-224.
- Morais ORO (2001). O melhoramento genético dos ovinos no Brasil. In: Melhoramento genético aplicado à produção animal. Belo Horizonte, FEPMUJ Editora, Brazil.
- Notter DR (1999). The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. *J. Anim. Sci.* 77:61-69.
- Oklahoma State University (2007). Animal Science. <http://www.ansi.okastate.edu/breeds/sheep> Accessed 10 December 2007.
- Oliveira ACB, Sediya MAN, Sediya T, Finger FL, Cruz CD (2002). Variabilidade genética em batata-doce com base em marcadores isoenzimáticos. *Hortic. Bras.* 20(4):576-582.
- Olson ZH, Whittaker DG, Rhodes OE (2009). The use of molecular markers in wild sheep Research in North America: a review. *Proceeding of the Northern Wild Sheep and Goat Council Biennial Symposium* 16:251-269.
- Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, Barretto GB, Carneiro PL, Lobo RN, McManus C (2011a) Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 43(7):1449-1457.
- Paiva SR, Mariante Ada S, Blackburn HD (2011b). Combining US and Brazilian microsatellite data for a meta-analysis of sheep (*Ovis aries*) breed diversity: facilitating the FAO Global Plan of Action for

- Conserving Animal Genetic Resources. *J. Hered.* 102(6):697-704.
- Paiva SR, Silvério VC, Egito AA, MacManus C, Faria DA, Mariante AS, Castro SR, Albuquerque MSM, Dergam J (2003). Caracterização Genética da Raça Santa Inês. In: 2ND International Symposium on Sheep and Goat Production, João Pessoa, Anais do Segundo Sincorte 1:487-499.
- Paiva SR, Silvério VC, Egito AA, McManus CM, Faria DA, Mariante AS, Castro STR, Albuquerque MSM, Dergam JA (2005b). Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds. *Pesq. Agrop. Bras.* 40(9):887-893.
- Paiva SR, Silvério VC, Paiva DAF, Mcmanus CM, Egito AA, Faria DA, Mariante AS, Castro STR, Albuquerque MSM, Dergam JA (2005a). Origin Of The Main Locally Adapted Sheep Breeds Of Brazil: A RFLP-PCR Molecular Analysis. *Arch. Zootec.* 54:395-399.
- Paiva SR, Vieira FD, Yamagishi MEB, Lacerda T, Vasconcelos C, Mcmanus C, Tanno P, Higa R, Carneiro PLS, Azevedo HC, Faco O, Souza CJH, Araujo AM, Martins VM, Caetano AR (2012). Validation of a low density SNP panel for breed certification testing in Brazilian sheep (*Ovis aries*) breeds as a tool for flock genetic management. In: International Plant and Animal genome Conference, San Diego.
- Pariset L, Joost S, Gargani M, Valentini A (2012). Landscape Genomics in Livestock. In: Analysis of Genetic Variation in Animals. INTECH, Rijeka, Croatia.
- Pedrosa S, Uzun M, Arranz JJ, Gutiérrez-Gil B, Primitivo FS, Bayón Y (2005). Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *Proc. R. Soc. B.* 272(1):2211-2217.
- Pereira F, Davis SJM, Pereira L, Mcevoy B, Bradley DG, Amorim A (2006). Genetic signatures of a Mediterranean influence in Iberian Peninsula sheep husbandry. *Mol. Biol. Evol.* 23:1420-1426.
- Pérez-Pardal L, Royo LJ, Beja-Pereira A, Curik I, Traoré A, Fernández I, Casais R, Goyache F (2009). Y-specific microsatellites reveal an African subfamily in taurine (*Bos taurus*) cattle. *Anim. Genet.* doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01982.x.
- Pidancier N, Jordan S, Luikart G, Taberlet P (2006). Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Mol. Phylogenet. Evol.* 40:739-749.
- Qasim M, Ahmad H, Ghafoor S, Afridi SG, Muhammad I, Imtia AK (2011). Estimation of Genetic Diversity in Sheep (*Ovis aries*) using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Int. J. Anim. Vet. Adv.* 3(1):6-9.
- Ramey II RR, Luikart G, Singer FJ (2000). Genetic Bottlenecks Resulting from Restoration Efforts: The Case of Bighorn Sheep in Badlands National Park. *Rest. Ecol.* 8(4):85-90.
- Rosa AJM, Paiva SR (2009). Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, Brazil.
- Sardina MT, Ballester M, Marmi J, Finocchiaro R, Van Kaam JBCHM, Portolano B, Folch JM (2006). Phylogenetic analysis of Sicilian goats reveals a new mtDNA lineage. *Anim. Genet.* 37(4):376-378.
- Sechi T, Miari S, Piras D, Crasta L, Mulas G, Carta A (2009). Genetic variation of goat Y chromosome in the Sardinian population. *Ital. J. Anim. Sci.* 8(2):159-161.
- Silvério VC, Paiva SR, Faria DA, McManus CM, Dergam JA, Oliveira AA, Lôbo RNB, Sousa WH, Mariante AS, Egito AA (2006). Phylogenetic study on the main Brazilian naturalized sheep breeds. In: 8<sup>th</sup> World Congress on Genetics Appl. Livestock Production, Proceedings of 8th World Congress on Genetics Appl. Livestock Production. Belo Horizonte: Instituto Prociência, Brazil.
- Souza CA, Paiva SR, McManus CM, Azevedo HC, Mariante AS, Grattapaglia D (2012). Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 11(2):1217-1229.
- Stahlberger-Saitbekova N, Schläpfer J, Dolf G, Gaillard C (2001). Genetic relationships in Swiss sheep breeds based on microsatellite analysis. *J. Anim. Breed. Genet.* 118(6):379-387.
- Tapio M, Marzanov N, Ozerov M, Inkulov M, Gonzarenko G, Kiselyova T, Murawski M, Viinalass H, Kantanen J (2006). Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and Central Asian areas. *Mol. Biol. Evol.* 23(9):1776-1783.
- Toro MA, Fernández J, Caballero A (2009). Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Livest. Sci.* 120(3):174-195.
- Valouev A, Ichikawa J, Tonthat T (2008). A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. *Gen. Res.* 18(7):1051-1063.
- Vila C, Leonard JA, Götherström A, Marklund S, Sandberg K, Liden K, Wayne R, Ellegren H (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 291(5503):474-477.
- Wood NJ, Phua SH (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim. Genet.* 27(1):25-33.
- Xiao F, Yong F, Ting S, Jin-Fu W (2009). Six Local Sheep Breeds AFLP Analysis of Genetic Diversity in Xinjiang. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine.* China.





## Genetic diversity of locally adapted sheep from Pantanal region of Mato Grosso do Sul

B.A. Crispim<sup>1</sup>, A.B. Grisolia<sup>1</sup>, L.O. Seno<sup>2</sup>, A.A. Egito<sup>3</sup>, F.M. Vargas Junior<sup>2</sup> and M.R. Souza<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil

<sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

Corresponding author: B.A. Crispim  
E-mail: brunocrispim.bio@gmail.com

Genet. Mol. Res. 12 (4): 5458-5466 (2013)

Received August 26, 2013

Accepted October 18, 2013

Published November 11, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.November.11.7>

**ABSTRACT.** Sheep of the Pantaneiro breed and seven other breeds, raised in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, were genotyped using eight microsatellite loci. The aim of the present study was to determine the genetic variability, phylogenetic relationship, and patterns of gene introgression and miscegenation among the animals surveyed, to obtain information about the genetic structure of locally adapted sheep in Mato Grosso do Sul. A total of 195 animals were used for genetic analysis. The Pantaneiro breed had the largest average number of alleles/locus (9.25), and higher allelic richness (6.95), while the Dorper population had the lowest values for these parameters (4.88 and 3.86, respectively). Analysis of genetic distance values and genetic structure between populations made it possible to characterize these animals with regard to distinct genetic groups. Average expected heterozygosity ranged from 0.72 (Pantaneiro) to 0.55 (Dorper), while average observed heterozygosity ranged from 0.63 (White Dorper) to 0.54 (Dorper). On the basis of the statistical parameters evaluated, it

was possible to demonstrate that when compared to other populations, the Pantaneiro breed represented a reservoir of genetic diversity with rare and useful alleles for genetic improvement, emphasizing the importance of preserving the breed.

**Key words:** Genetic resources; Pantaneiro sheep; Genetic variability

## INTRODUCTION

The sheep industry in the State of Mato Grosso do Sul is expanding, and the locally adapted breed (Gomes et al., 2007) known as Pantaneiro sheep (OPT), may be useful for increasing the production chain, since it is highly adapted to the environmental conditions of the region and can be used for rustic genetic material.

In 2007, an exploratory study conducted by researchers from the Universidade ANHANGUERA - UNIDERP, Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), and Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) was initiated, aimed at identifying and conserving the OPT breed found in different locations in the state. Initially the researchers involved acquired about 450 animals, including ewes and rams, from different herds found in the Pantanal region of Mato Grosso do Sul, in regions including Anastácio, Nioaque, Aquidauna, and Pedro Gomes.

The OPT breed has a combination of alleles of wool sheep breeds from the southern region of Brazil and woolless breeds from the northeast region of the country. This fact shows the possibility that these animals may constitute a distinct genetic group (Gomes et al., 2007). The females of these animals have high maternal ability and no reproductive seasonality. Lambs have high productive potential in terms of carcass traits and meat quality. Furthermore, the OPTs provide wool, used in regional craftwork, as a by-product. Currently, OPT is most often found on isolated farms in the region, and lives for years without any kind of artificial selection or genetic improvement, suggesting that these sheep are locally adapted to the region (Vargas Junior et al., 2011).

In general, multilocus molecular genetic markers such as microsatellites are suitable for studies of both genetic variability and paternity tests. In addition, microsatellites provide genome-wide coverage, and are easy to detect. Microsatellites are codominant, highly polymorphic, and have an expected heterozygosity that is commonly greater than 0.7, allowing discrimination between individuals (Regitano and Coutinho, 2001).

Molecular analyses may support both identification of areas of priority for genetic resource conservation programs, and knowledge about the genetic diversity of endangered domestic and wild species (Rosa and Paiva, 2009). Therefore, the establishment of conservation programs using molecular tools is of fundamental importance for the generation of information regarding the genetic diversity patterns of locally adapted groups, allowing them to be used in the productive system, and adding traits of adaptation and rusticity (Barker, 1994).

Research that evaluates genetic variability is of great importance to the generation of information that allows OPT to be characterized. Therefore, the aim of this study was to determine genetic diversity, patterns of gene introgression and occurrence of miscegenation among OPT and other breeds of sheep raised in the State of Mato Grosso do Sul.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals

Blood samples from 195 animals from seven populations of sheep, raised in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil, were collected randomly from different herds. The collection sites and number of animals sampled are described in Table 1.

**Table 1.** Data relative to the population, sampling sites and number of animals.

Population	Sample size	Locality
Bergamácia	30	Retiro dos Leite - Jardim/MS
Pantaneiro	30	Fazenda Experimental UFGD - Dourados/MS
Dorper	30	Cabanha Morena - Caarapó/MS
White Dorper	15	Cabanha Morena - Caarapó/MS
Hampshire Down	30	Fazenda Mate Laranjeira - Ponta Porã/MS
Suffolk	30	Cabanha LCL - Caarapó/MS
Ile de France	30	Fazenda Chancan - Campo Grande/MS

MS = Mato Grosso do Sul.

### Microsatellite loci

Total genomic DNA was extracted from blood tissue using the organic method described by Sambrook et al. (1989) and adapted by Crispim et al. (2012).

PCR were performed using a commercially available panel of eight microsatellite loci as previously described by Souza et al. (2012) (CSRD247, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB304, OarCP49, SPS113, and D5S2). The reactions were performed using a multiplex fluorescent system, with the eight markers included in the same reaction. The PCR were performed in a final volume of 10  $\mu$ L, containing: 3.6  $\mu$ L ultrapure water, 1.5  $\mu$ L 10X PCR buffer, 1.5  $\mu$ L mix of primers, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 0.4  $\mu$ L Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 3.0  $\mu$ L DNA (50-100 ng). The reactions were then placed in a thermocycler (Applied Biosystems).

The thermocycling program consisted of an initial denaturation step at 95°C for 7 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30 s, annealing at 63°C for 90 s and extension at 72°C for 60 s. A final extension step at 72°C for 30 min was performed at the end of the 40 cycles.

After PCR, the amplified products were electrophoresed in a MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare, USA). Accordingly, a solution with TWEEN and molecular weight marker ET-400 (GE Healthcare) was prepared. A total of 0.3  $\mu$ L ROX marker, 7.7  $\mu$ L 0.02X TWEEN and 2  $\mu$ L amplified product were added. The samples were denatured for 3 min at 94°C and placed directly on ice. Sample injection was performed at 3 kV for 80 s and the electrophoretic run performed at 8 kV for 80 min. Genotyping results for allele discrimination were visualized in the Fragment Profiler program version 1.2® (GE Healthcare).

### Statistical analysis

Allele frequency was estimated by direct counting. The parameters of locus diversity were

estimated for all microsatellites, in all populations, using the CERVUS 3.0 program (Kalinowski et al., 2007). The parameters were as follows: expected ( $H_E$ ) and observed heterozygosities ( $H_O$ ), polymorphic information content, and the Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). The FSTAT program was used to calculate allelic richness (AR) and estimates of Wright's F statistics ( $F_{IT}$ ,  $F_{IS}$  and  $F_{ST}$ ). The P value was adjusted using the Bonferroni procedure (Goudet, 2002) with the same statistical package. Population structures were evaluated by analysis of molecular variance (AMOVA) using the ARLEQUIN program (Schneider et al., 2000).

The dendrogram was constructed by cluster analysis using the Neighbor-Net method with the aid of the Sliptree program, based on calculations of Reynold's genetic distances ( $F_{ST}$ ) using FSTAT.

On the basis of allelic frequency of the eight microsatellite loci, the animals were grouped in a given number of populations and probabilistically placed into groups inferred by Bayesian analysis using the Structure program (Pritchard et al., 2000). The tests were performed using an admixture model where the allelic frequencies were correlated. To select the appropriate number of inferred populations, several analyses were conducted with K (number of populations inferred) ranging from 2 to 10, with 300,000 interactions (burn-in period of 3000), with three independent replications for each analysis. The real values of K were inferred from the magnitude of  $\Delta K$  and given as a function of K, with the aid of the Structure Harvester program (Earl and vonHoldt, 2012) following the model proposed by Evanno et al. (2005).

## RESULTS

The genetic parameters observed from the genotyping of the 195 animals of the seven populations analyzed with eight microsatellite loci are described in Table 2. OPT breed showed the highest number of alleles per locus (9.25), and the highest allelic richness (6.95) compared to the other populations of animals in the present study. The Dorper population showed the lowest values (4.88 and 3.86, respectively).

When all the populations were analyzed together, the microsatellite loci HSC, CSRD247 and OarAE129 were found to be in HWE. However, when statistical analysis was performed for each population, White Dorper animals had no markers in HWE. The Pantaneiro breed and Bergamácia and Hampshire Down populations had the highest number of markers in HWE. In relation to other populations, Ile de France showed two loci and the Dorper population only one locus in HWE (Table 2).

**Table 2.** Estimates of genetic variability observed in the seven populations studied based on eight microsatellite loci.

Populations	N	$N_A$	Heterozygosity		AR	$F_{IS}$	Loci in HWE
			Observed	Expected			
Pantaneiro	30	9.25 ± 3.77	0.63 ± 0.03	0.72 ± 0.04	6.95	0.129*	3
Bergamácia	30	5.75 ± 1.67	0.60 ± 0.03	0.63 ± 0.06	4.75	0.062	3
Dorper	30	4.88 ± 3.27	0.54 ± 0.03	0.55 ± 0.09	3.86	0.021	1
White Dorper	15	5.13 ± 2.47	0.70 ± 0.04	0.69 ± 0.05	5.06	0.027	0
Suffolk	30	6.00 ± 2.14	0.66 ± 0.03	0.65 ± 0.07	5.05	0.019	2
Hampshire Down	30	7.38 ± 2.97	0.68 ± 0.03	0.65 ± 0.05	5.88	0.045	3
Ile de France	30	5.25 ± 2.12	0.60 ± 0.03	0.66 ± 0.03	4.62	0.079*	2

N = number of individuals;  $N_A$  = mean number of alleles; AR = allelic richness; HWE = number of loci that showed deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. \*P < 0.05.

The population structure analysis revealed a genetic difference between populations of 13.72% (Table 3), and estimates of differentiation based on  $F_{ST}$  were significant ( $P < 0.001$ ).

**Table 3.** Analysis of molecular variance interpopulation and intrapopulation of the seven sheep populations studied.

Source of variation	d.f.	Variation (%)	FI
Interpopulation	6	13.72	$F_{ST} = 0.13721^*$
Intrapopulation	194	88.33	

d.f. = degrees of freedom; FI = fixation index. \* $P < 0.001$ .

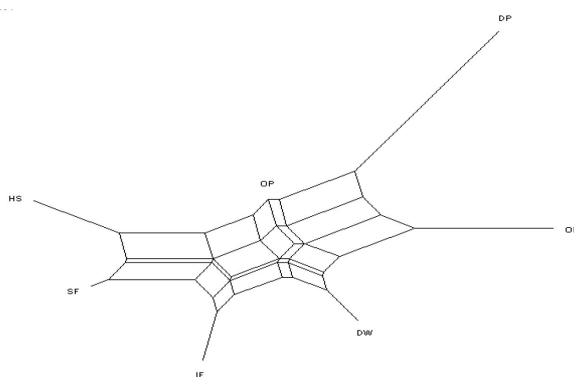
The matrix of genetic differentiation between populations, based on  $F_{ST}$  indices, is shown in Table 4. It can be observed that the highest rates of genetic differentiation were between the Bergamácia and Hampshire Down populations (0.250). On the other hand, the lowest values were between the Suffolk and Hampshire Down populations (0.069). Using population differentiation, it was shown that the OPT breed was genetically closest to animals in the Suffolk population (0.078).

**Table 4.** Pairwise estimation of genetic differentiation among the sheep populations studied.

	OB	DP	DW	HS	IF	OPT	SF
OB	-	-	-	-	-	-	-
DP	0.18140	-	-	-	-	-	-
DW	0.12440	0.19948	-	-	-	-	-
HS	0.25082	0.21992	0.16221	-	-	-	-
IF	0.17938	0.23601	0.09408	0.13918	-	-	-
OPT	0.10757	0.10130	0.08177	0.08359	0.08823	-	-
SF	0.19916	0.24001	0.12801	0.06941	0.08389	0.07853	-

OB = Bergamácia; DP = Dorper; DW = White Dorper; HS = Hampshire Down; IF = Ile de France; OPT = Pantaneiro; SF = Suffolk.

Neighbor-Net method data analysis indicated that the OPT breed occupied an intermediate position in relation to other populations. Suffolk and Hampshire Down populations grouped differently, showing their genetic proximity when compared with other populations. The Dorper population had the greatest distance in relation to other populations (Figure 1).



**Figure 1.** Neighbor-Net dendrogram based on Reynold's genetic distance ( $F_{ST}$ ) from eight microsatellite loci. The graph shows the genetic relationships between the seven sheep populations studied (OPT = Pantaneiro; DP = Dorper; DW = White Dorper; OB = Bergamácia; HS = Hampshire Down; IF = Ile de France, and SF = Suffolk).

Table 5 shows the proportions of each population attributed to the five groups inferred by the Structure program, with minimal variance.

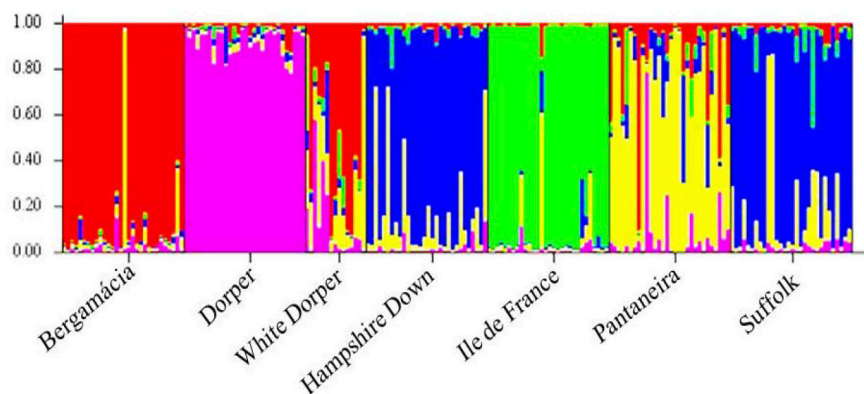
**Table 5.** Number of individuals (N) per population and proportion of association of each population in each of the 5 groups inferred by the program Structure.

Populations	N	Inferred clusters				
		1	2	3	4	5
Bergamácia	30	<b>0.890</b>	0.009	0.015	0.061	0.025
Dorper	30	0.024	0.012	0.020	0.023	<b>0.921</b>
White Dorper	15	<b>0.514</b>	0.071	0.052	0.243	0.120
Hampshire Down	30	0.016	<b>0.023</b>	<b>0.792</b>	0.147	0.022
Ile de France	30	0.012	<b>0.897</b>	0.026	0.048	0.017
Pantaneiro	30	0.152	0.044	0.081	<b>0.646</b>	0.077
Suffolk	30	0.022	0.047	<b>0.756</b>	0.151	0.023

Associations greater than 0.5 are in bold.

It can be seen from Table 5 that clusters 1, 2 and 5 represented the populations of Bergamácia, Ile de France and Dorper, with 89, 89.7 and 92.1%, respectively, correct allocation of individuals in their populations. Cluster 3 represents the populations of Hampshire Down and Suffolk, with a correct allocation rate of 79.2 and 75.6%, respectively. The White Dorper population showed the lowest allocation value (51% in cluster 1) with statistical significance ( $P > 0.05$ ). The highest significant attribution proportion was 64.6% in cluster 4 for the Pantaneiro group.

The genetic structure of populations was analyzed using Bayesian statistics with the aid of the Structure program. The grouping of  $K = 5$  (Figure 2) corresponds to the real  $K$ , according to the methodology proposed by Evanno et al. (2005), where there were complex patterns of miscegenation for all populations analyzed. The diagram showed similarity between populations of Hampshire Down and Suffolk, and between the breeds Bergamácia and White Dorper. In spite of having a lower proportion than the other groups, the Bergamácia and White Dorper breeds seemed to share the same gene pool. There appeared to be miscegenation in the Pantaneiro breed.



**Figure 2.** Individual grouping of 195 sheep from seven different populations analyzed by Bayesian statistical method using the Structure program. Each animal was represented by a vertical line divided into segments classified according to size and color, corresponding to the relative proportion of the genome of the animal concerning the population inferred by the program. Different populations were separated by black lines.

## DISCUSSION

The Pantaneiro breed showed greater allelic richness when compared with the other study populations (Table 2). The introduction of sheep in South America occurred simultaneously with colonization, and the effective population size is in the process of formation. The high levels of diversity found in the different populations studied may be related to the fact that selective pressure, coupled with miscegenation, led to the introgression of genes in the populations. However, animals in the Dorper population, which were subjected to a consolidated process of genetic improvement, showed lower allelic richness and observed heterozygosity.

The results of the present study are consistent with those observed by Gornas et al. (2011) and Álvarez et al. (2012), who also found low variability and  $H_o$  in specialized sheep breeds. Therefore, the Pantaneiro breed may constitute an important reservoir of genetic diversity, and may be useful in breeding programs and genetic management of herds.

The eight microsatellite loci were considered multi-allelic for the Pantaneiro breed (Table 2). Considering the animals genotyped, the population parameters related to average number of alleles (9.25),  $H_o$  (0.63),  $H_e$  (0.72) and AR (6.95) were considerably higher when compared with results from the other populations in study. The population parameters observed in the present study were also higher than those observed in other sheep breeds, both locally adapted, and exotic, from Spain (Calvo et al., 2011), India (Arora et al., 2011), Italy (Lasagna et al., 2011), and Cuba (Álvarez et al., 2012).

Tolone et al. (2012) found very similar results when analyzing five Sicilian sheep breeds with 20 microsatellites (average of 10.95 alleles per locus for the native sheep Pinzirita). Baumung et al. (2006) reported an average of 15 alleles, when 25 microsatellite markers were genotyped in 11 Austrian breeds. Although estimates of the average number of alleles may vary according to each marker under study, it can be inferred that the genotyping method used in the present study revealed that the Pantaneiro population had relatively high levels of genetic diversity. There may be rare alleles in the current population, which can be useful in future breeding programs, if related to resistance characteristics and environmental adaptability.

The higher number of marker loci in HWE found for the Pantaneiro, Bergamácia and Hampshire Down populations may be explained by the fact that these animals are not derived from controlled crosses (breeding programs). However, the White Dorper was the only population that showed no marker in HWE. This result may be due to the small sample population (15 individuals), and due to the population being consolidated with planned genetic crosses established from breeding programs. Several studies using locally adapted or native breeds confirmed that these breeds have more number of loci in HWE when compared to more specialized breeds (McManus et al., 2010; Paiva et al., 2011a; Tolone et al., 2012).

It can be seen from the dendrogram (Figure 1) that populations with possible common ancestry were more closely related, as well as Suffolk, Hampshire Down and Ile de France. This fact can be explained by the sharing of common alleles of the same ancestor of European origin (Southdown) (ARCO, 2013), providing genetic similarity and closeness, as indicated in the graph by the Neighbor-Net method. The Pantaneiro breed was positioned medially in the graph, demonstrating that it is a locally adapted breed, which may show miscegenation with the other populations analyzed, but is genetically distinct.

AMOVA results showed that the variation between populations was high (Yeh, 2000) and significant, with fixation index ( $F_{ST} = 0.13$ ). On the basis of this criterion, it is possible

to infer that each of the populations under study may be considered an independent genetic group. Therefore, the OPT breed may be considered different from the other populations studied, even if there is a degree of miscegenation with other breeds raised in the region (Figure 2 and Table 2).

The number of populations, as well as the population structure generated by the Structure program (Figure 2), also confirmed that the Pantaneiro breed is genetically distinct. Although there is a sharing of alleles with other populations inferred, and the number of markers used was insufficient to distinguish all breeds studied, the present study is the first to characterize the Pantaneiro breed. From the perspective of accreditation of this population as a distinct breed, the present results were very satisfactory, being consistent with the history of the populations analyzed.

The results observed in the matrix of genetic differentiation, and the analysis performed by the Structure program, indicated that Hampshire Down and Suffolk populations have a high degree of similarity (0.06). This can be explained by the formation process of the populations, determined by common ancestry, due to their similar function in the sheep industry and supposed racial admixture (Blackburn et al., 2011). In a meta-analysis performed by Paiva et al. (2011b), association among these populations was also confirmed, grouping them into the same cluster.

According to Table 5, it is possible to observe that in genetically homogeneous breeds or populations, tests for individual allocation are more effective. Possibly, better results would be obtained by increasing the number of markers, enabling the use of these tests for the composition or genetic management of populations of Pantaneiro sheep.

Selected genes over generations among groups of naturalized animals provide greater adaptive value to tropical conditions in comparison to artificially improved breeds. These genes will be useful if the climate change predicted for the coming years is considered. This research demonstrates the importance of exploiting the potential of the genetic diversity found in locally adapted herds. Although exotic breeds are considered to be of high performance, they also have reduced productivity because of their inability to properly adapt to the climatic conditions and breeding and management systems used in Brazil. The introgression of genes between these populations may generate sheep whose overall average productivity and rusticity may be greater than those of their parents.

The seven sheep populations studied may be considered genetically distinct. The breed showed higher genetic variability when compared to the other groups studied. This fact indicates the importance of conserving the Pantaneiro breed, which may possess rare alleles that are economically important to the genetic improvement of sheep.

## ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by FUNDECT, UFGD and CAPES. The authors are also grateful to the veterinary inspector Elton Bock Corrêa (Brazilian Association of Sheep Breeders) and to Dr. Raquel Soares Juliano (Embrapa Pantanal).

## REFERENCES

ARCO (2013). Assistência ao Rebanho de Criadores de Ovinos. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. Available at [<http://www.arcoovinos.com.br>]. Accessed January 10, 2013.



- Arora R, Bhatia S, Mishra BP and Joshi BK (2011). Population structure in Indian sheep ascertained using microsatellite information. *Anim. Genet.* 42: 242-250.
- Álvarez I, Capote J, Traoré A, Fonseca N, et al. (2012). Genetic relationships of the Cuban hair sheep inferred from microsatellite polymorphism. *Small Rumin. Res.* 104: 89-93.
- Barker JSF (1994). A Global Protocol for Determining Genetic Distances Among Domestic Livestock Breeds. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph and Ontario, Canada, 21: 501-508.
- Baumung R, Cubric-Curik V, Schwend K, Achmann R, et al. (2006). Genetic characterization and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J. Anim. Breed. Genet.* 123: 265-271.
- Blackburn HD, Paiva SR, Wildeus S, Getz W, et al. (2011). Genetic structure and diversity among sheep breeds in the United States: identification of the major gene pools. *J. Anim. Sci.* 89: 2336-2348.
- Calvo JH, Alvarez-Rodriguez J, Marcos-Carcavilla A, Serrano M, et al. (2011). Genetic diversity in the *Churra tensina* and *Churra lebrijana* endangered Spanish sheep breeds and relationship with other *Churra* group breeds and Spanish mouflon. *Small Rumin. Res.* 95: 34-39.
- Crispim BA, Silva DBS, Banari AL, Seno LO, et al. (2012). Discriminação alélica em ovinos naturalizados do Pantanal Sul-Matogrossense por meio de marcadores microsatélites. *J. Selva Andina Res. Soc.* 3: 3-13.
- Earl DA and vonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4: 359-361.
- Evanno G, Regnaut S and Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620.
- Gomes WSG, Araújo AR, Caetano AR, Martins CF, et al. (2007). Origem e Diversidade Genética da Ovelha Crioula do Pantanal, Brasil. In: Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Gornas N, Weimann C, El Hussien A and Erhardt G (2011). Genetic characterization of local Sudanese sheep breeds using DNA markers. *Small Rumin. Res.* 95: 27-33.
- Goudet J (2002). FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3.2). Available at [<http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>]. Accessed May 10, 2013.
- Kalinowski ST, Taper ML and Marshall TC (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16: 1099-1106.
- Lasagna E, Bianchi M, Ceccobelli S, Landi V, et al. (2011). Genetic relationships and population structure in three Italian Merino-derived sheep breeds. *Small Rumin. Res.* 96: 111-119.
- McManus C, Paiva SR and Araújo RO (2010). Genetics and breeding of sheep in Brazil. *Rev. Bras. Zootec.* 39: 236-246.
- Paiva SR, Faco O, Faria DA, Lacerda T, et al. (2011a). Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* 43: 1449-1457.
- Paiva SR, Mariante AS and Blackburn HD (2011b). Combining US and Brazilian microsatellite data for a meta-analysis of sheep (*Ovis aries*) breed diversity: facilitating the FAO Global Plan of Action for Conserving Animal Genetic Resources. *J. Hered.* 102: 697-704.
- Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Regitano LCA and Coutinho LL (2001). Introdução à Análise de Marcadores Moleculares. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Embrapa, Brasília, 11-25.
- Rosa AJM and Paiva SR (2009). Marcadores Moleculares e suas Aplicações em Estudos Populacionais de Espécies de Interesse Zootécnico. Planaltina, Embrapa Cerrados, Brasil.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Schneider S, Roessli D and Excoffier L (2000). Arlequin Version 2000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Geneva.
- Souza CA, Paiva SR, McManus CM, Azevedo HC, et al. (2012). Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Ines hair sheep in Brazil. *Genet. Mol. Res.* 11: 1217-1229.
- Tolone M, Mastrangelo S, Rosa AJM and Portolano B (2012). Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Rumin. Res.* 102: 18-25.
- Vargas Junior FM, Longo ML, Seno LO, Pinto GS, et al. (2011). Potencial produtivo de um grupo genético de ovinos nativos Sulmatogrossenses. *Pubvet* 30: 1197.
- Yeh FC (2000). Population Genetics. In: *Forest Conservation Genetics: Principles and Practice* (Young A, Boshier D and Boyle T, eds.). CSIRO Publishing, Collingwood, 21-37.



Contents lists available at ScienceDirect

## Electronic Journal of Biotechnology



# Application of microsatellite markers for breeding and genetic conservation of herds of Pantaneiro sheep



Bruno do Amaral Crispim<sup>a</sup>, Leonardo de Oliveira Seno<sup>b</sup>, Andréa Alves do Egito<sup>c</sup>,  
Fernando Miranda de Vargas Junior<sup>b</sup>, Alexéia Barufatti Grisolia<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>b</sup> Faculdade de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil

<sup>c</sup> Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 10 February 2014

Accepted 30 September 2014

Available online 12 October 2014

## Keywords:

Animal genetic resources

Genetic diversity

Kinship

Locally adapted breed

STR

## ABSTRACT

**Background:** The aim of the present study was to assess the genetic diversity of Pantaneiro sheep, using microsatellite markers, in order to assist maintenance and management plans, enhance mating systems and reduce the inbreeding rate. A total of 127 animals were genotyped at eight microsatellite loci. They belonged to populations from the Experimental Farm of the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) (Dourados/MS/Brazil) and Embrapa Pantanal (Corumbá/MS/Brazil).

**Results:** The population of Pantaneiro sheep from the UFGD exhibited a high mean number of alleles (11.13) and allelic richness (10.66). The polymorphic information content was highly informative in the locus studied, resulting in a mean value of 0.71. Observed heterozygosity was lower than expected for all molecular markers assessed. The analysis of molecular variance showed a differentiation rate of 5.2% between populations.

**Conclusions:** The results of the statistical parameters indicated that populations of Pantaneiro sheep require special attention on herd management, and it's further necessary to implement breeder exchange programs in order to preserve the genetic variability of these populations. Furthermore, the maintenance of those populations in their typical habitats is rather required to allow different responses from the herds to the interactions between genotype and environment.

© 2014 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The genetic group of sheep adapted to the conditions of the Pantanal of the state of Mato Grosso do Sul in Brazil [1] is known as the Pantaneiro sheep. They can be used as an animal genetic resource to improve sheep production for meat and milk in this state. Females of this breed have no reproductive seasonality and are an important role in the performance of their lambs during the period from birth to weaning [2,3]. Lambs have a satisfactory productive potential, in terms of carcass traits and meat quality

[3,4]. In addition, Pantaneiro sheep produce wool, which can be used as feedstock in regional craftwork.

Native Brazilian sheep breeds are characterized by rusticity and adaptability to tropical and subtropical areas within Brazil. Gomes et al. [1] stated that the Pantaneiro sheep exhibit a combination of alleles of wool and woolless sheep breeds from southern and north-eastern regions of Brazil. These animals are phenotypically similar to each other, but differ from other breeds bred in Brazil. Currently, the Pantaneiro sheep is widely diffused in several isolated farms in the state of Mato Grosso do Sul. They live for a long time in Pantanal region and surely faced natural selection mechanism without going through breeding programs. This fact confirms that these sheep are locally adapted [2].

Molecular genetic markers, such as microsatellites, can complement morphological and productive information about genetic resources, contributing to an increase in the efficiency of processes of genetic diversity and genetic purity analysis. In addition, they are able to generate information for the planning of crossings and the selection of genotypes in genetic breeding programs [5]. Microsatellites are suitable for studies of both genetic variability and parentage tests. These markers are co-dominant and frequently have an expected

\* Corresponding author at: Laboratório de Biotecnologia Aplicada a Produção Animal, Universidade Federal da Grande Dourados, Rua João Rosa Góes, 1761 - Vila Progresso. Caixa Postal 322 - CEP: 79.825-070, Dourados, Brazil. Tel.: + 556734102223.

E-mail addresses: brunocrispim.bio@gmail.com (B.A. Crispim),

alexaiagrisolia@ufgd.edu.br (A.B. Grisolia).

Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.



Production and hosting by Elsevier

heterozygosity above 0.7, which enables discrimination between individuals. Due to the specificity of the PCR assays associated with the high polymorphic content of these markers, it is possible to determine the identity of individuals based on estimates derived from allelic frequencies.

Assessments of genetic diversity using microsatellite markers have become an important tool for conservation programs and those involved in the genetic breeding of animal herds in conservation nuclei. The aim of the present study was to assess microsatellite markers, in terms of characterizing and determining genetic diversity for conservation and management, in order to enhance the mating system and reduce consanguinity in populations of Pantaneiro sheep.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Blood samples were collected from 127 animals by jugular venipuncture from each animal using 4.5 mL collection tubes (Vacutainer®) for the genomic DNA extraction, from two conservation nuclei of Pantaneiro Sheep. The conservation nuclei were located on the Experimental Farm of the Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) in the city of Dourados/MS (64 female and 5 male), using a herd formed approximately eight years previously with animals from the ANHANGUERA-UNIDERP Sheep Technological Center in Campo Grande/MS. The other was located at Embrapa Pantanal (47 female and 11 male), using a herd formed approximately 5 years previously, with animals from different places of the Pantanal plain of Corumbá/MS, Brazil.

### 2.2. Microsatellite loci

Genomic DNA was extracted from blood using 300  $\mu$ L of blood which were incubated in microtubules at 60°C with 3  $\mu$ L of proteinase K (20 mg =  $\mu$ L) and 500  $\mu$ L of 20% SDS (sodium dodecyl sulfate); chloroform (800  $\mu$ L) and a protein precipitation solution (350  $\mu$ L) were subsequently added. The microtubules were centrifuged (14,000 rpm) for 10 min and the supernatant transferred to another microtube. One mL of 100% ethanol was added to the pellet and it was centrifuged again, followed by another washing of the precipitate in 70% alcohol. After drying the pellet, 50  $\mu$ L of TE buffer (pH 8.7) with RNase (10 ng =  $\mu$ L) was added. The material was incubated at 37°C for 1 h and stored in a freezer at 20°C. The quantity and purity of the genomic DNA samples was determined using a spectrophotometer (NanoDropND-2000 UV-vis).

PCR reactions were performed for 8 microsatellite loci (CSR247, HSC, OarAE129, MAF214, OarFCB304, OarCP49, SPS113, and D5S2) including those proposed by the Ministry of Agriculture Herds and Provisions of Brazil (MAPA) [6] and markers recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG) [7]. Reactions were performed using a multiplex fluorescent system, with all markers included simultaneously. The PCR was performed in a final volume of 10  $\mu$ L, containing: 3.6  $\mu$ L of ultrapure water; 1.5  $\mu$ L of 10 $\times$  PCR buffer; 1.5  $\mu$ L mix of primers; 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM dNTPs; 0.4  $\mu$ L Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) and 3.0  $\mu$ L of template DNA (50–100 ng). Negative controls were used to monitor the reactions. The PCR were realized in thermocycler (Applied Biosystems®), and the thermal profile used was initial denaturing for 7 min at 95°C, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, annealing at 63°C for 90 s and elongation at 72°C for 60 s. A final extension step was performed at 72°C for 30 min. At the end of the amplification, the samples were stored at 4°C. Denatured amplicons were subjected to capillary electrophoresis in a MegaBACE™ 1000 DNA Analysis System (GE Healthcare, USA). Then, a solution with TWEEN and molecular weight marker ET-400 (GE Healthcare) was prepared. Each sample subjected to electrophoresis was composed of 0.3  $\mu$ L ROXsize standard, 7.7  $\mu$ L TWEEN 20 a 0.1% and

2  $\mu$ L of the amplified product. Samples were denatured for 3 min at 94°C and cooled on ice. Sample injection was performed at 3 kV for 80 s and the electrophoresis run was performed at 8 kV for 80 min. Genotyping results for allele discrimination were visualized in the Fragment Profiler program, version 1.2 (GE Healthcare).

### 2.3. Data analysis

Allele frequency, private alleles and parameters of locus diversity (expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), polymorphic information content (PIC), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) and allelic richness (AR)) were estimated for all microsatellites using the CERVUS 3.0 [8], Microsatellite Toolkit, GenAEx [9] and FSTAT [10] software programs.

Estimates for the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) and population structure were assessed by analysis of molecular variance (AMOVA), using the Arlequin program [11].

The pairwise genetic distances between all individuals were estimated by the logarithm proportion of shared alleles (Dps) [12] using the MICROSAT program [13]. The Neighbor joining method (NJ) [14] was used to build a phylogenetic tree based on the genetic distance matrix, with the aid of the PHYLIP computational package [15] and TreeExplorer 2.1.2.

Based on the results of the genotypes of eight microsatellites, the animals were grouped in a given number of populations and probabilistically placed into groups inferred by Bayesian analysis, using the STRUCTURE program [16]. The tests were performed using an admixture model, in which the allelic frequencies were correlated. The programs were set to distinguish samples from two different populations. In order to select the appropriate number of inferred populations, several analyses were conducted with K (number of populations inferred) ranging from 2 to 5, a total of 300,000 interactions (burn-in period of 3000) and three independent replications for each analysis. The real K values were inferred from the magnitude of  $\Delta K$  and given as a function of K, using the Structure Harvester program [17], according to the model proposed by Evanno et al. [18].

## 3. Results

Table 1 displays the descriptive statistical analysis of the eight microsatellites for the populations of Pantaneiro sheep studied (127 genotyped animals). All loci exhibited polymorphism resulting in a total number of 100 alleles. The mean number of alleles per locus was 12.5 (ranging from 7 to 21 for the SPS113 and OarCP49 markers, respectively). The loci OarAE129 and SPS113 were in the Hardy-Weinberg equilibrium when populations were analyzed together. However, sheep from Pantaneira Corumbá had shown greater number of markers in equilibrium (D5S2, OarFCB304, OarAE129 e MAF214), when compared to those from Pantaneira UFGD (MAF214 e OarCP49).

The polymorphic information content was highly informative for all loci in the studied populations (overall mean of 0.71). The population of Pantaneiro sheep from the UFGD recorded a higher mean number of alleles per locus (11.13) and private alleles (4.50), as well as greater allelic richness (10.66), genetic diversity (0.73) and observed heterozygosity (0.67) than the population from Embrapa Pantanal. Considering that  $F_{IS}$  values are associated with higher homozygosity, the results of the present study indicate that the inbreeding coefficient ( $F_{IS}$ ) was higher for the Embrapa Pantanal population (0.11) than for the UFGD population (0.09) (Table 2). Among the eight analyzed loci, the population from Embrapa Pantanal showed greater number of loci (4) compared to those from UFGD population (2).

The AMOVA revealed differences (5.2%) between the populations of Pantaneiro sheep studied. The estimates of genetic differentiation based on  $F_{ST}$  were significant ( $P < 0.002$ ). The individual dendrogram of both populations was built using the Neighbor joining method, based on

**Table 1**  
Microsatellite genetic variation in populations of Pantaneiro sheep.

	Locus	N	Ho	He	PIC	F <sub>IS</sub>	HWE	F (null)
Pantaneiro sheep (n = 127)	CDR247	13	0.80	0.80	0.76	-0.01	NS	-0.01
	D5S2	9	0.60	0.60	0.56	0.00	NS	-0.01
	HSC	15	0.77	0.85	0.84	0.10	NS	+0.05
	MAF214	9	0.54	0.58	0.81	0.06	NS	+0.02
	OarAE129	12	0.40	0.69	0.72	0.42	***	+0.26
	OarRCP49	21	0.72	0.78	0.76	0.07	NS	+0.04
	OarFCB304	14	0.60	0.73	0.68	0.18	NS	+0.10
	SPS113	7	0.58	0.65	0.60	0.11	***	+0.07
	Mean (SD)	12.5 ± 4.40	0.62 ± 0.13	0.71 ± 0.09	0.71 ± 0.09	0.12 ± 0.09	2	0.06 ± 0.05

Number of alleles per locus (N), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), polymorphic information content (PIC), inbreeding coefficient (F<sub>IS</sub>), Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) and F (null) frequency of null alleles. NS – Not significant. \*\*\* At equilibrium  $P < 0.001$ .

the estimated distance as a function of allelic sharing between all animals. Most of the animals were grouped within their population in the dendrogram, although there were a number of exceptions (Fig. 1).

Table 3 shows the proportions of each population attributed to the two groups inferred by the STRUCTURE program, with minimal variance.

The genetic structure of populations was analyzed using Bayesian statistics and the STRUCTURE program, with increasing numbers of populations inferred by the program itself. The  $K = 2$  (Fig. 2) corresponds to the  $K$  inferred by the Structure Harvester program, according to the methodology proposed by Evanno et al. [18], in which both populations of Pantaneiro sheep were visualized by complex patterns of miscegenation and the similarity between them.

#### 4. Discussion

Data in the present study provides preliminary evidence of the genetic variation of animals belonging to the genetic group of Pantaneiro sheep from two different conservation nuclei in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. The marker analysis indicated that eight loci of microsatellites were considered informative in the analysis of characterization and genetic diversity of Pantaneiro sheep, since they exhibited more than four different alleles per loci [19].

The mean number of alleles per loci was 12.5, which can be considered high when compared with other studies that assessed these markers in ovine breeds [20,21,22]. This finding demonstrates that there is a high variability in the population of Pantaneiro sheep, which can be observed in other locally adapted breeds [23,24], thereby indicating that until now, the population has been exposed to a low artificial selection.

The averages of  $H_o$  (0.62) were lower than that of  $H_e$  (0.71), which indicates a higher quantity of homozygote and increased heterozygosity, reinforcing the need for studies of genetic management in the herd. The microsatellite markers used for the Pantaneiro sheep were considered highly informative, exhibiting a PIC ranging from 0.56 to 0.84 and a mean value of 0.71 when analyzed together [25]. Arora et al. [26], Santos-Silva et al. [27] and Yilmaz and Karaca [28] obtained PIC values similar to those of the

present study, indicating the genetic efficiency of these markers in studies about Pantaneiro sheep genetic diversity.

Among the studied markers, only two showed to be in HWE (OarAE129 and SPS113) when Pantaneiro sheep populations were analyzed together. The marker OarAE129 showed the largest difference between observed and expected heterozygosity. A significant deviation observed for this marker may be explained by unobserved null alleles leading to high  $F_{IS}$  values. Nonetheless, when the same populations were analyzed separately, the Pantaneiro sheep from Embrapa displayed a high number of loci in equilibrium. Probably, this event is related to the different  $F_{IS}$  detected in the herds studied, which could be related to differences on the handling of animals, i.e. Pantaneira Corumbá population may have gone through processes of artificial selection and breeding programs distinct of those faced by UFGD herd (Table 1).

The different levels of inbreeding found between the Pantaneiro sheep populations (UFGD and Embrapa) could be related to the mating system (UFGD offers a continuous replace of breeders while in Embrapa it's nonexistent) adopted in different herds. Considering that the reproductive management of these animals is based on phenotypes (herds are constituted of genetically related individuals) and the fact that there is a small number of breeding males, the utilization of molecular tools based on genotypes could enhance the genetics of herds.

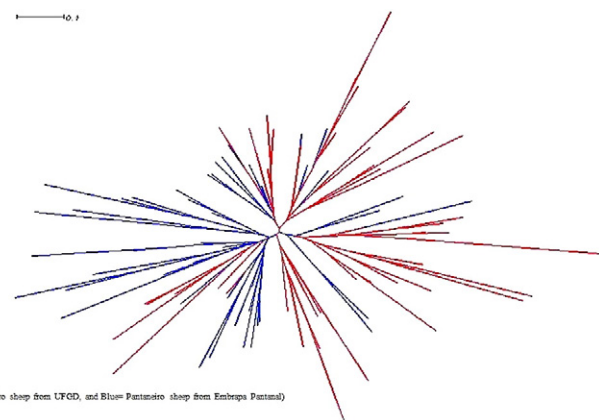
The genetic analysis of both Pantaneiro sheep populations demonstrated heterozygosity, an average number of alleles, private alleles, allelic richness, as well as high genetic diversity (Table 2). This is due to the genetic variability found in herds with few management interventions, as was the case in the herd of the present study. Therefore, it is essential to maintain the stock of genetic resources in order to conserve the diversity in locally adapted herds [29,30,31].

**Table 2**  
Genetic diversity of populations of Pantaneiro sheep.

Populations	N	ANA	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	PA	F <sub>IS</sub>	AR	GD	HWE
UFGD	69	11.13	0.67	0.74	4.50	0.09*	10.66	0.73	2
Embrapa Pantanal	58	8.00	0.57	0.64	1.37	0.11*	7.90	0.64	4

Number of animals (N), average number of alleles (ANA), observed heterozygosity (Ho), expected heterozygosity (He), mean of private alleles (PA), inbreeding coefficient (F<sub>IS</sub>), allelic richness (AR), genetic diversity (GD), loci number in Hardy–Weinberg equilibrium (HWE).

\*  $P < 0.003$ .



**Fig. 1.** Individual phylogenetic dendrogram, based on the Neighbor joining method, with the populations of Pantaneiro sheep.

**Table 3**

Number of individuals (N) per population and proportion of association of each population in each of 5 groups inferred by the program Structure. Associations greater than 0.5 are in bold.

Populations	Inferred clusters		N
	1	2	
UFGD	0.360	<b>0.640</b>	69
Embrapa Pantanal	<b>0.682</b>	0.318	58

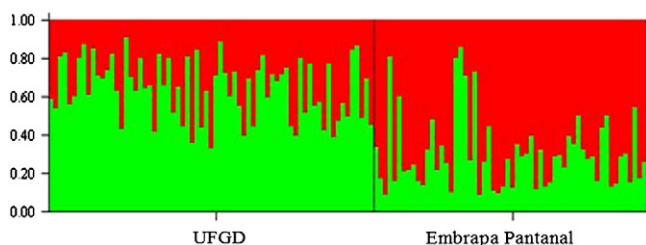
Similar data have been reported by Baumung et al. [20] and Tolone et al. [32] when studying naturalized breeds.

Animals from the UFGD population exhibited higher values for genetic diversity, the mean number of alleles and allelic richness than the Embrapa population. This result confirms the formation and management of two conservation nuclei. The UFGD herd was formed from different herds. Mating exchanges from different areas of the Pantanal region are common. Conversely, the Embrapa herd contained a small number of males and was isolated for a long time. Therefore, new males are needed in order to minimize the inbreeding coefficient between populations. Furthermore, the maintenance of those populations in their typical habitats (UFGD – Região de Cerrado/Mata Atlântica e EMBRAPA – Região do Pantanal) is rather required to allow different responses from the herds to the interactions between genotype and environment.

The findings reported above could be associated with the differentiation results of the populations analyzed, where a significant level of genetic variation (i.e. 5.2%) was observed ( $P < 0.002$ ; AMOVA) between Pantaneiro sheep populations. In addition, a recent evolutive process, caused by genetic derivatives and geographical distance, could be included as a cause of this genetic differentiation.

Based on the individual phylogenetic dendrogram from individuals of both populations, it was possible to observe that most of the animals belonging to the same population were grouped in the same cluster, although some animals did not follow this pattern (Fig. 1). Santos-Silva et al. [27] studied 6 Portuguese native breeds (Algarvia, Badana, Galega Bragançana, Galega Mirandesa, Mondgueira and Churra da Terra Quente) and observed that animals from the same population shared the same cluster through the utilization of microsatellites markers. This result could be used to assist management programs for genetic resources aiming to increase genetic variability.

The number of populations, as well as the population structure generated by the STRUCTURE program (Fig. 2), also confirmed that both populations are similar and have a common cluster pattern that shares alleles with few differences. This may be due to genetic derivatives and different management and selection processes. On Table 3 it is possible to observe that in genetically homogeneous populations, tests for individual allocation are more effective. Possibly, better results would be obtained by increasing the number of markers, enabling the use of these tests for the genetic management of populations of Pantaneiro sheep.



**Fig. 2.** Individual grouping of 127 Pantaneiro sheep populations from the UFGD and Embrapa, analyzed by the Bayesian statistical method using the STRUCTURE program. Each animal was represented by a vertical line divided into segments classified by size and color, corresponding to the relative proportion of the genome of the animal concerning each group.

In conclusion, the results of the present study indicate that attention should be given to the genetic management of Pantaneiro sheep herds. The population of Embrapa Pantanal has a lower allelic richness and high  $F_{IS}$  value indicating a high level of inbreeding. These results are due to the inexistence of a reproductive management and exchange or introduction of new individuals. The UFGD population had lower inbreeding coefficient and superior results of genetic diversity and richness, the management of this herd needs to be taken care of so that these values do not decline over the years. Furthermore, we suggest genotype analyzes including Pantaneiro herds from distinct conservation sites. It is suggested that studies should be conducted in order to implement a genetic management of these valuable genetic resources by inserting in this context exchange between different breeding herds that have different origins. These measures will assist maintenance and improve the genetic base of these animal groups, enabling the conservation of herds with a high genetic diversity in the region.

### Conflict of interest

No conflict of interest among the authors.

### Financial support

Agency/Institution: FUNDECT/UFGD/CAPES; Program: PPP and UNIVERSAL FUNDECT/CAPES for providing the scholarship; Project number: FUNDECT/CNPq No 08/2009 – PPP/FUNDECT No 14/2009 – Universal.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the following: Elton Bock Corrêa, inspector of ARCO (Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos) for the logistic access to sheep farmers; Dr. Raquel Soares Juliano for providing animals from the Embrapa Pantanal and Ms. Marcio Rodrigues de Souza, of the Experimental Farm at the UFGD, for his help during sample collection.

### Author contribution

Proposed the theoretical frame: ABG, LOS; Conceived and designed the experiments: ABG, FMVJ; Software development: AAE; Contributed reagents/materials/analysis tools: LOS, FMVJ; Wrote the paper: BAC, ABG; Performed the experiments: BAC, ABG; Analyzed the data: AAE, BAC.

### References

- [1] Gomes WSG, Araújo AR, Caetano AR, Martins CF, Vargas Junior FM, McManus C, et al. Origem e Diversidade Genética da Ovelha Crioula do Pantanal, Brasil. Simposio de Recursos Genéticos para América Latina y El Caribe. Chapingo, México: Universidad Autónoma Chapingo; 2007.
- [2] Vargas Junior FM, Longo ML, Seno LO, Pinto GS, Barbosa-Ferreira M, De Oliveira DP. Potencial produtivo de um grupamento genético de ovinos nativos Sul-mato-grossenses. Pubvet 2011;177:1197.
- [3] Oliveira DP, De Oliveira CAL, Martins EN, De Vargas Junior FM, Seno LO, Pinto GS, et al. Parâmetros genéticos para características de desempenho em ovinos naturalizados Sul-Mato-Grossenses. Semina: Cienc Agrar 2014;35:963–72. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2014v35n2p963>.
- [4] De Lima MC, De Vargas Junior FM, Martins CF, Pinto GS, Nubiato KEZ, Fernandes ARM. Características de carcaça de cordeiros nativos de Mato Grosso do Sul terminados em confinamento. Rev Agrar 2012;5:384–92.
- [5] Faleiro FG. Marcadores genético moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina-DF: Embrapa Cerrados; 2007.
- [6] MAPA. Instrução Normativa No. 74 de 20 de Outubro de 2004. Pecuária e Abastecimento, Brasília: Ministério da Agricultura; 2004.
- [7] ISAG. Applied genetics in sheep and goats workshop. 32th international conference on animal genetics. Edinburgh: ISAG; 2010 [Available from Internet: [http://www.isag.us/Docs/Applied\\_GeneticsSheepGoats\\_CT.pdf](http://www.isag.us/Docs/Applied_GeneticsSheepGoats_CT.pdf)]. [cited January, 2014].

- [8] Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol Ecol* 2007;16:1099–106. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>.
- [9] Peakall R, Smouse PE. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 2012;28:2537–9. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- [10] Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate f-statistics. *J Hered* 1995;86:485–6.
- [11] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin version 2000: A software for population genetics data analysis. Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva; 2000.
- [12] Bowcock AM, Ruiz-Linares A, Tomfohrde J, Minch E, Kidd JR, Cavalli-Sforza LL. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 1994;368:455–7. <http://dx.doi.org/10.1038/368455a0>.
- [13] Minch E, Ruiz-Linares A, Goldstein DB, Feldman MW, Cavalli-Sforza LL. Microsat2: A computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. Stanford, CA: Department of Genetics, Stanford University; 1998.
- [14] Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 1987;4:406–25.
- [15] Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny inference package. Seattle, WA: University of Washington; 2002.
- [16] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000;155:945–59.
- [17] Earl DA, Von Holdt BM. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 2012;4:359–61. <http://dx.doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>.
- [18] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol Ecol* 2005;14:2611–20. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- [19] Barker JSF. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. Proceedings of the 5th world congress on genetics applied to livestock production, 21. Ontario, Canada: Guelph; 1994. p. 501–8.
- [20] Baumung R, Cubric-Curik V, Schwend K, Achmann R, Solkner J. Genetic characterization and breed assignment in Austrian sheep breeds using microsatellite marker information. *J Anim Breed Genet* 2006;123:265–71. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0388.2006.00583.x>.
- [21] D'Angelo F, Albenzio M, Sevi A, Ciampolini R, Cecchi F, Ciani E, et al. Genetic variability of the Gentile di Puglia sheep breed based on microsatellite polymorphism. *J Anim Sci* 2009;87:1205–9. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1224>.
- [22] Calvo JH, Alvarez-Rodriguez J, Marcos-Carcavilla A, Serrano M, Sanz A. Genetic diversity in the *Churra tensina* and *Churra lebrijana* endangered Spanish sheep breeds and relationship with other Churra group breeds and Spanish mouflon. *Small Rumin Res* 2011;95:34–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.09.003>.
- [23] Paiva SR, Mariante AS, Blackburn HD. Combining US and Brazilian Microsatellite data for a meta-analysis of sheep (*Ovis aries*) breed diversity: Facilitating the FAO global plan of action for conserving animal genetic resources. *J Hered* 2011;102:697–704. <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esr101>.
- [24] Souza CA, Paiva SR, McManus CM, Azevedo HC, Mariante AS, Grattapaglia D. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genet Mol Res* 2012;11:1217–29. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.May.8.4>.
- [25] Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980;32:314–31.
- [26] Arora R, Bhatia S, Mishra BP, Joshi BK. Population structure in Indian sheep ascertained using microsatellite information. *Anim Genet* 2011;42:242–50. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02147.x>.
- [27] Santos-Silva F, Ivo RS, Sousa MCO, Carolino MI, Ginja C, Gama LT. Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Rumin Res* 2008;78:32–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.04.006>.
- [28] Yilmaz O, Karaca O. Karya Koyunlarda Mikrosatellit İřaretleyicilerle Babalık Testi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2012;18:807–13.
- [29] Mariante AS, Egito AA, Albuquerque MSM, Paiva SR, Ramos AF. Managing genetic diversity and society needs. *Rev Bras Zootec* 2008;37:127–36. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982008001300016>.
- [30] Dalvit C, De Marchi M, Zanetti E, Cassandro M. Genetic variation and population structure of Italian native sheep breeds undergoing in situ conservation. *J Anim Sci* 2009;87:3837–44. <http://dx.doi.org/10.2527/jas.2008-1682>.
- [31] McClean L, Waterman L, Roberts C. Genetic analysis of three populations of barbados blackbelly sheep at microsatellite loci. *J Agric Sci Technol* 2011;1:1187–91.
- [32] Tolone M, Mastrangelo S, Rosa AJM, Portolano B. Genetic diversity and population structure of Sicilian sheep breeds using microsatellite markers. *Small Rumin Res* 2012;102:18–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.09.010>.