

ALZIRA REGINA SILVA DE DEUS

Marcadores moleculares para caracterização da estrutura populacional, diversidade genética e relação de parentesco em ovino Santa Inês

TERESINA-PI

2020

ALZIRA REGINA SILVA DE DEUS

Marcadores moleculares para caracterização da estrutura populacional, diversidade genética e relação de parentesco em ovino Santa Inês

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Piauí como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal para obtenção do título de “Mestre em Ciência Animal”.

Orientador: Dr. José Lindenberg Rocha Sarmento

TERESINA-PI

2020

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico

S586m Silva de Deus, Alzira Regina.

Marcadores moleculares para caracterização da estrutura populacional, diversidade genética e relação de parentesco em ovino Santa Inês. / Alzira Regina Silva de Deus. – 2020.
120 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

Orientação: Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmento.

1. Conservação de recursos genéticos. 2. Matriz de parentesco.
3. Melhoramento genético. I. Título.

CDD 636.39

MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERIZAÇÃO DA
ESTRUTURA POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E RELAÇÕES
DE PARENTESCO EM OVINOS SANTA INÊS

ALZIRA REGINA SILVA DE DEUS

Dissertação aprovada em: 04/03/2020

Banca Examinadora:


Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento (Presidente) / DZO/CCA/UFPI


Prof. Dr. Natanael Pereira da Silva Santos (Interno) / CPCE/UFPI


Prof. Dr. Fábio Barros Brito (Interno) / CCN/UFPI


Pesquisador Dr. Geice Ribeiro da Silva (Externo) / NENHUMA

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora, que me abençoam e me dão coragem para continuar diante de todas as dificuldades.

A Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA/UFPI),

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Maria Sandra Silva de Deus e ao meu pai, José de Deus Filho, por todo amor, compreensão, paciência, apoio e por estarem sempre presente, mostrando-me o caminho certo a seguir, além de não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Todas as minhas conquistas são para vocês. Muito obrigada por tudo!

Ao meu irmão, Rodrigo Leonel Silva de Deus e minha irmã, Dara Vitória Silva de Deus, pelo incentivo, apoio, amor e amizade incondicional. A minha cunhada, Léia Rodrigues Lima de Deus, pela amizade e carinho. A minha sobrinha e afilhada, Lis Raquel Lima de Deus, que me mostrou o amor mais puro e sincero, fazendo-me esquecer de todos os problemas com apenas uma ligação. Muito obrigada por seu amor.

À minha avó, Alzira da Rocha Sales, que desde pequena sempre me amou incondicionalmente e me apoiou em todas as minhas escolhas, sempre lutando para transformar meus sonhos em realidade. Obrigada por ser sempre meu maior exemplo. A você todo o meu amor e agradecimento.

A meu namorado Johny Wysllas de Freitas Oliveira, por todo amor, compreensão e companheirismo, pois não conseguiria chegar até aqui sem todo apoio que me deu, acreditando em mim até quando eu não mais acreditava. Muito obrigada por tudo. Te amo para sempre

Aos meus avós, tios, padrinhos, madrinhas, primos e demais familiares, por toda a paciência e incentivo.

A meu orientador, José Lindenberg Rocha Sarmiento pela paciência, atenção e dedicação para orientação nesse trabalho.

Agradeço a Banca Examinadora pelo aceite ao convite em contribuir com a realização deste trabalho.

A todos que, mesmo não estando citados aqui, contribuíram e torceram pela conclusão desta etapa. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS.....	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1. A RAÇA SANTA INÊS	15
2.2. ESTRUTURA POPULACIONAL	16
2.3. RELAÇÕES DE PARENTESCO.....	17
2.4. MARCADORES MOLECULARES.....	18
2.5. MARCADORES MICROSSATÉLITE	19
2.6. MARCADOR SNPs.....	20
3. REFERÊNCIAS	22
CAPITULO I – ESTRUTURA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE REBANHOS OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS NO MEIO-NORTE DO BRASIL	25
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
MATERIAL BIOLÓGICO E ISOLAMENTO DO DNA GENÔMICO	29
AMPLIFICAÇÃO DE MICROSSATÉLITES.....	30
CONTROLE DE QUALIDADE E ANÁLISE DOS DADOS	30
RESULTADOS.....	34
DESEMPENHO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES EM OVINOS	34
DIVERSIDADE E ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DOS REBANHOS OVINOS	35
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS	41
FIGURAS E TABELAS	47
CAPÍTULO II - EFICÁCIA DE DIFERENTES PAINÉIS DE MICROSSATÉLITE PARA ESTIMAR PARENTESCO EM OVINOS SANTA INÊS.....	53
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. <i>ESTRUTURA POPULACIONAL.....</i>	<i>58</i>

2.2. COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E EXTRAÇÃO DE DNA	59
2.3. AMPLIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	59
2.4. ANÁLISE DOS DADOS DOS MICROSSATÉLITES	62
2.5. ANÁLISE DOS DADOS DE SNPs	65
3. RESULTADOS.....	66
3.1. ANÁLISE GERAL DOS DADOS.....	66
3.2. ANÁLISE DE PARENTESCO COM MICROSSATÉLITE.....	67
3.3. COMPARAÇÃO DAS ESTIMATIVAS DE R ENTRE SNPs E MICROSSATÉLITE	71
4. DISCUSSÃO	73
5. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
ANEXOS.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Ovinos da raça Santa Inês. Fonte: ARCO.....16

CAPITULO I

Figura 1 - Estimativa do fluxo genético entre os rebanhos de ovinos da raça Santa Inês, usando como base os estimadores D’Jost (A), G_{ST} (B) e Nm (C) usando a função divmigrate do pacote R diveRsity. Faz1 (José de Freitas, Piauí), Faz 2 (Santa Inês, Maranhão), Faz 3 (José de Freitas, Piauí), Faz 4 (Floriano, PI), Faz 5 (Campo Maior, Piauí), Faz 6 (Campo Maior, Piauí). Quanto mais espesso e mais escuro as setas, maior a proporção relativa.....43

Figura 2 - Análise Bayesiana de agrupamento gerado no programa Structure (A), análise de coordenadas principais, PCoA (B) e dendrograma gerado a partir da distância de Nei usando o método de agrupamento UPGMA (correlação cofenética igual a 85 %) (C). Faz 1 (José de Freitas, Piauí), Faz 2 (Santa Inês, Maranhão), Faz 3 (José de Freitas, Piauí), Faz 4 (Floriano, PI), Faz 5 (Campo Maior, Piauí), Faz 6 (Campo Maior, Piauí). O melhor K estimado pelo delta de Evanno foi igual a 11.....44

CAPITULO II

Figura 1 - Número de pares de indivíduos que se apresentaram em cada categoria de relacionamento. MI: Meio irmãos; NR: não relacionados; IC: irmãos completo; PF: pai-filho...77

Figura 2 - Valores de parentesco para pares de indivíduos em cada categoria de relacionamento usando painéis contendo 10, 12, 15 e 19 marcadores microssatélite.....78

Figura 3 - Distribuições dos valores de parentesco para cada painel de marcadores SNPs e microssatélite. Painel SNP (47.069 SNPs), painel 1(10), painel 2 (12), painel 3 (15), painel 3 (19).....79

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** - *Locus*, temperatura de anelamento (T_a), concentração do cloreto de magnésio ($MgCl_2$) utilizado na PCR, tamanho de alelos alcançado nas PCR e as referências.....33
- Tabela 2** -Número de alelos (A), Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e), Conteúdo de informação polimórfica (PIC), Capacidade de discriminação (DC), probabilidade de identidade (PI), Probabilidade de exclusão quando os pais são desconhecidos (PE), Índice de endogamia (FIS), p-valor do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (pHWE), frequência de alelos nulos (nulo), índices de diferenciação genética (FST, RST, Dest), RST permutado (pRST), p-valor do teste para tamanho do alelo ($RST > pRST$), probabilidade a posteriori para o teste de seleção calculado no programa Bayescan.....39
- Tabela 3** -Análise do perfil de variabilidade genética das Fazenda 1 (José de Freitas, Piauí), Fazenda 2 (Santa Inês, Maranhão), Fazenda 3 (José de Freitas, Piauí), Fazenda 4 (Floriano, PI), Fazenda 5 (Campo Maior, Piauí), Fazenda 6 (Campo Maior, Piauí). Riqueza alélica (A_r), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice de endogamia (FIS), frequência de alelos nulos (Nulos) e Riqueza alélica privada ($PvAr$).....41
- Tabela 4** - Teste Wicoxon sign-rank para o excesso de heterozigotos em seis rebanhos da raça Santa Inês. Fazenda1(José de Freitas, Piauí), Fazenda 2(Santa Inês, Maranhão), Fazenda 3(José de Freitas, Piauí), Fazenda 4(Floriano, Piauí), Fazenda 5(Campo Maior, Piauí) e Fazenda 6(Campo Maior, Piauí). Número de *loci* polimórficos (L), Média do número de indivíduos amostrados por *locus*, heterozigosidade esperada no cenário em que os rebanhos estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, modelo de mutação de infinitos alelos (IAM), modelo de mutações aos passos (SMM), modelo de mutações em duas fases (TPM), heterozigosidade no cenário em que há equilíbrio de mutação-deriva (He_q), número de *loci* com excesso de heterozigosidade, ou seja, $He > He_q$ (LHex).....46

CAPÍTULO II

- Tabela 1** - Relação dos marcadores de microssatélite e parâmetros experimentais utilizados (temperatura de anelamento, concentração do cloreto de magnésio, número de ciclos do termociclador e variação dos tamanhos dos alelos) para ovinos da raça Santa Inês.....70
- Tabela 2** - Lista dos marcadores utilizados nos quatro diferentes painéis de microssatélite. Com o painel 1 contendo 10 marcadores, o painel 2 com 12 marcadores, o painel 3 com 15 marcadores e o painel 4 com 19.....73
- Tabela 3** - Médias e variância das estimativas de parentesco e correlação entre os 7 estimadores na POP 1.....76
- Tabela 4** - Correlação de Pearson entre as matrizes de parentesco gerada com SNP e pelos diferentes painéis de marcadores microssatélite.....80

LISTA DE ABREVIATURAS OU SÍMBOLOS

Ar	Riqueza Alélica
ARCO	Associação Brasileira de Criadores de Ovinos
CPI	Probabilidade combinada de identidade
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations - Organização Mundial das Nações Unidas Alimento e Agricultura
Fis	Índice de endogamia
HE	Heterozigosidade Esperada
HO	Heterozigosidade Observada
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IAM	<i>Infinite Allele Model</i>
IBD	Idênticos por Descendência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISAG	Sociedade Internacional de Genética Animal
MCMC	Cadeia de Markov de Monte Carlo
MoDAD	<i>Measurement of Domestic Animal Diversity</i>
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia de polimerase
PE	Probabilidade de exclusão
PI	Probabilidade de identidade
PIC	Conteúdo de Informação Polimórfica
<i>r</i>	Coefficiente de parentesco
SMM	<i>Stepwise Mutation Model</i>
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de Nucleotídeo Único)
STR	<i>Short Tandem Repeats</i> - seqüências de repetições em tandem
TPM	Two Phase Model

RESUMO

DEUS, Alzira Regina Silva. **Marcadores moleculares para caracterização da estrutura populacional, diversidade genética e relação de parentesco em ovino Santa Inês.**2020. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

Objetivou-se com esse estudo caracterizar a estrutura populacional, a diversidade genética e estimar as relações de parentesco em rebanhos de ovino Santa Inês criados no Meio-Norte brasileiro, através da utilização de marcadores moleculares. Para tanto, coletou-se sangue de 257 ovinos Santa Inês de seis diferentes populações nos estados do Piauí e Maranhão. O DNA extraído foi qualificado por eletroforese em gel de agarose. Para análises com microssatélite, foram realizadas PCRs a partir de 20 *loci* recomendados pela FAO. As amostras amplificadas foram genotipadas por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelação em nitrato de prata. As análises foram realizadas em diversos programas estatísticos para caracterização populacional, diversidade genética e estimação das relações de parentesco. Para as análises com SNP, o painel Ovine SNP50BeadChip foi utilizado para genotipagem dos indivíduos, sendo utilizado 47.069 SNPs para gerar a matriz de parentesco. As análises de controle de qualidade foram realizadas através do programa PREGSF90 da família de programas BLUPF90. No Capítulo 1, foram estimados parâmetros populacionais para análise da estrutura populacional e diversidade genética. Todos os *loci* apresentaram-se altamente polimórficos e com alto poder de discriminação, mostrando-se importantes para esse estudo. Os marcadores demonstraram alto potencial para inferir parentesco, apresentando probabilidade de exclusão maior que 0,74. Cinco dos seis rebanhos apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. O nível de diversidade genética apresentou uma média de $0,89 \pm 0,2$, mostrando que os rebanhos possuem alta variabilidade genética. Foram detectados indícios de gargalo e erosão genética, indicando que as populações estudadas apresentavam moderada diferenciação genética, com ocorrência de migração entre as fazendas. No Capítulo 2, estimou-se as relações de parentesco utilizando marcadores microssatélite e SNP. Para tanto, foram geradas matrizes de parentesco genômico dos indivíduos estudado. Com os marcadores microssatélite, a relação foi estimada através do programa coancestry pelo estimador DyadML em diferentes painéis utilizando 10, 12, 15 e 19 *loci*. Todos os painéis foram capazes de estimar a relação e inferir quatro categorias de parentesco, sendo irmãos completo (IC), meio irmãos (MI), pai-filho (PF) e não relacionada (NR). Contudo, à medida que diminuiu o número de marcadores aumentou a variação em torno dos valores de parentesco que é esperado para cada categoria. A matriz de parentesco gerada pelo marcador SNP apresentou valores de parentesco variando de 0 a 0,66, com média de 0,04, corroborando com os valores encontrados nos microssatélites. Além disso, a matriz de parentesco SNP apresentou-se altamente correlacionada com as matrizes geradas nos quatro painéis de microssatélite. Os resultados encontrados indicam que rebanhos Santa Inês presente na região Meio-Norte do Brasil apresenta alta variabilidade genética com moderada estruturação populacional. As estimativas de parentesco realizadas através de microssatélites foram capazes de estimar a relação entre indivíduos com confiança de 95%, indicando a aplicabilidade desse marcador para estimarem parentesco. Assim, metodologias como essas podem ser inseridas em programa de melhoramento e conservação de recursos genéticos, oferecendo ganho tanto para a espécie como para os produtores.

Palavras-chaves: conservação de recursos genéticos, matriz de parentesco, melhoramento genético, microssatélite, SNP

ABSTRACT

DEUS, Alzira Regina Silva. **Molecular markers to characterization of populational structure, genetic diversity and relatedness in Santa Ines sheeps.** 2020. Dissertation (Master of Philosophy in Animal Science) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

The focus of this study was characterizing the populational structure, genetic diversity and relatedness in flock of sheep Santa Ines living in Brazilian Middle-North, through molecular markers utilization. In order, blood was collected of 257 santa ines sheep in six different populations present in states Piauí and Maranhão. From the blood, the DNA was extracted and qualified by agarose electrophoresis gel. In addition, with extract DNA was realized essay with microsatellites, utilizing PCRs of recommend 20 *loci* by FAO. The samples were genotyping by polyacrylamide electrophoresis gel and revealed in silver nitrate. The analysis of data was made in several programs according to the purpose. To analyze of SNP, the panel Ovine SNP500 BreadChip was utilized to genotyper of individuals, generating a relatedness matrix using 47.069 SNP data. The analysis of quality control was realized through the program PREGSF90 of the program family BLUPF90. The Chapter 1 estimated populational parameters to analysis populational structure and genetic diversity. The analyze resulted in all *loci* shown highly polymorphic and high power of discrimination, the results were important to this study. The markers showed high potential to relatedness inference with exclusion probability superior 0.74. Five of six flocks demonstrated deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. The genetic diversity level had mean of 0.89 ± 0.2 , demonstrating the flock have high genetic variability. With data was detected evidences of bottlenecks and genetic eruption, indicating that populations present in this study have moderate genetic differentiation with migrations occurs between farms. In Chapter 2, was estimate the relatedness using microsatellite markers and SNP. In order, was created genomic kinship matrix of individuals. Based markers microsatellite data, the relation was estimated by coancestry program with estimator DyadML in different panels utilizing 10, 12, 15 and 19 *loci*. Based on results was analyzed that all panels were capable to estimate the relatedness and inference of four categories of kinship, being full-siblings (FS), half-siblings (HS), Parents-offspring (PO) and unrelated (UR). However, the reducing of markers numbers increased the variation around relatedness values in each category. The relationship matrix generated by SNP markers present variant values of 0 until 0.66, with mean of 0.04, corroborating with microsatellite values. Furthermore, the SNP kinship matrix have elevated correlation with the matrices of four microsatellite panels. The findings indicate the Santa ines flocks living in Middle-North region of Brazil present high genetic variability with moderate populational structure. The estimative of relatedness through microsatellite are able to determinate the relations between individuals with 95% of assurance, indicating the applicability of these markers to relatedness estimative. Thus, these methodologies can be insert in an improvement program and genetic resources conservation, offering benefits to the specie and producers.

Keywords: genetic resources conservation, relatedness matrix, improvement genetic, microsatellite, SNP.

1. INTRODUÇÃO GERAL

De acordo com o último censo realizado pelo IBGE, o Brasil conta com um rebanho efetivo de ovino de 18.606.767 cabeças, deste, 12.058.840 encontra-se na região Nordeste. O Piauí conta com 1.615.224 cabeças (IBGE, 2017), o que gera uma das maiores fontes de rendas para pequenos e grandes produtores, fazendo parte do contexto sociocultural do homem do campo. Devido a esse fato, vem aumentando o interesse da utilização desses animais em programas de melhoramento genético. Entretanto, existe pouco conhecimento do material genético desses rebanhos, além da falta de informações nos rebanhos de conservação, o que dificulta seu uso em programas de melhoramento para obter, com maior acurácia, animais que apresentem características superiores e de maior interesse para os produtores. Além disso, erros de pedigree são comuns na maioria das criações, causando prejuízos no melhoramento e conservação de recursos genéticos (McMANUS et al., 2019).

Visando potencializar os programas de melhoramento genético e o maior controle das relações de parentesco em rebanhos de conservação ou em criatórios com baixo nível de escrituração zootécnica, principalmente quando aos controles de pedigree, é imprescindível identificar os fatores que interferem na eficiência da seleção e no progresso genético, assim como na manutenção da variabilidade genética. Nesse contexto, o conhecimento das relações de parentesco em uma população se torna importante não só como guia para as intervenções genéticas, mas também para o monitoramento da diversidade e controle de acasalamentos entre indivíduos aparentados que geram endogamia.

A genética quantitativa clássica utiliza informações sobre o parentesco entre os indivíduos derivados de pedigree. A acurácia com que os parâmetros genéticos e populacionais são estimados pode ser limitada pela exatidão e integridade com que os pedigrees são montados. Entretanto, mesmo quando o pedigree tem perfeito relacionamento entre indivíduos de uma população, o valor previsto de parentesco pode variar devido à segregação e recombinação dos genes (AGUIAR et al., 2015). Além disso, parte dos rebanhos nordestinos tem pouca ou nenhuma informação de pedigree, principalmente em rebanhos de pequenos produtores, que formam a maioria dos criadores (REGO NETO, 2017).

O surgimento dos marcadores moleculares tem contribuído de forma significativa para aumentar a acurácia na predição dos valores genéticos, pois utiliza informações diretas do DNA, fornecendo assim as informações reais de parentesco entre os indivíduos. Além disso, a

utilização da genética molecular produz resultados mais rápidos e a sua produção é de baixo custo (REZENDE, 2012).

A escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado em determinado estudo depende, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infra-estrutura disponível, dos recursos financeiros, da disponibilidade de recursos humanos e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada. Em geral, para as análises de variabilidade intra-populacional, certificação de origem, teste de paternidade, entre outros, espera-se que o marcador molecular possua alto conteúdo informativo, sendo capaz de discriminar diferentes alelos em um *locus*, amostrar o genoma em vários *loci* ao mesmo tempo (capacidade multiplex) e detectar polimorfismo no maior número possível de *locus*, em uma única reação (STÄDELE; VIGILANT, 2016).

Marcadores de microssatélites vêm sendo comumente utilizado para análise parentesco, especialmente por apresentarem algumas vantagens tais como: está distribuído por todo genoma, ser multialélico, altamente polimórfico, ter natureza codominante, possui marcadores neutros, ser transferível entre espécies taxonomicamente próximas, além das novas tecnologias permitirem análises fáceis, eficiente e de baixo custo (ROCHA et al., 2018).

Outro marcador que também se mostra interessante é SNP (Single Nucleotide Polymorphism - polimorfismo de base única). Os SNPs são atualmente muito utilizados para mapear de maneira eficiente as características mendelianas, uma vez que estão espalhados por todo o genoma e apresentam alta variabilidade genética (KIJAS et al., 2009). Sendo assim, os SNP também podem ser usados para conhecimento das relações de parentesco sem a utilização de pedigree (PETERSON et al., 2012).

Portanto, tem-se como objetivo, a caracterização da estrutura populacional e diversidade genética e estimação das relações de parentesco em rebanhos de ovino Santa Inês presentes no Nordeste brasileiro, através da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélite.

A dissertação está estruturada com base nas normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPI estabelecidas na Resolução 001/03-CCMCA. A estrutura é apresentada da seguinte forma: Parte introdutória, constituída pela Introdução geral e Revisão de Literatura, em que consta a descrição da proposta geral do trabalho e tópicos de grande relevância pertinentes ao tema da pesquisa; Capítulo I, referente ao artigo —Estrutura e diversidade genética de rebanhos ovinos da Raça Santa Inês no Meio-Norte do Brasil, elaborado com base nas normas da revista Scientia Agricola (ISSN 1678-992X); e Capítulo II, constituído pelo artigo — Estimativa de parentesco em ovinos Santa Inês utilizando marcadores moleculares, elaborado

com base nas normas da revista *Small Ruminant Research* (ISSN 0921-4488). Ao final, são apresentadas as Considerações Finais.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A raça Santa Inês

A raça Santa Inês apresenta-se para a ovinocultura de corte como uma alternativa na produção de carne para quase todas as regiões do Brasil, mais notadamente nas regiões semiáridas. Geralmente os animais apresentam uma excelente qualidade de pele, um bom desenvolvimento ponderal e alta resistência a parasitas gastrointestinais, o que a coloca em posição estratégica como uma reserva de diversidade genética factível de uso em programas de melhoramento, por meio da seleção. Para alguns autores a raça Santa Inês é a raça com maior aceitação nos últimos anos pelos criadores de ovinos de corte (McMANUS et al., 2013; REZENDE TEIXEIRA NETO et al., 2016).

Os animais da raça Santa Inês são caracterizados por apresentarem grande porte, com potencial para crescimento, com padrão de pelagem incluindo o branco, vermelho, preto e malhado (**Figura 1**). Em condições normais de pastejo e manejo alimentar, o peso da fêmea adulta pode variar entre 40 e 60 kg e os machos podem atingir até 120 kg. As fêmeas apresentam baixa prolificidade, boa habilidade materna e boa produção de leite, características que contribuem para um bom desempenho de suas crias (SOUSA et al., 2003; ARCO, 2018).



Figura 1- Ovinos da raça Santa Inês. Fonte: ARCO.

Embora o Santa Inês tenha despertado o interesse dos criadores, principalmente, em função do seu porte, da velocidade de crescimento e da alta adaptabilidade aos trópicos quando comparada a outras raças deslanadas, a seleção vem sendo realizada, com maior intensidade, na padronização da raça, considerando na maioria das vezes apenas características morfológicas sem se preocupar com desempenho produtivo e reprodutivo (REGO NETO et al., 2014). Do ponto de vista biológico, a raça Santa Inês é um material genético novo e, de certa forma, ainda pouco conhecido, necessitando assim de melhoria genética quanto à qualidade da carcaça, eficiência reprodutiva, habilidade materna e resistência a endoparasitas (BIAGIOTTI et al., 2016), além da necessidade de mais estudos relacionados a melhoramento e conservação de recursos genético, uma vez que esses estudos são limitados.

2.2. Estrutura Populacional

Uma população, do ponto de vista genético, compreende um conjunto de genes que se formam ao longo do tempo e que depende de muitos processos, dentre eles: seleção, mutação migração e deriva genética (FALCONER, 1987). O estudo da estrutura populacional é um importante fator para analisar a variabilidade genética inter e intrapopulacional, obtida pela taxa de consanguinidade.

O conhecimento da estrutura populacional de uma raça é de grande importância em função da necessidade de se monitorar a diversidade genética, bem como para o controle de acasalamentos entre indivíduos aparentados, visto que, a perda da variabilidade genética possa comprometer o progresso genético futuro em características de importância econômica (OLIVEIRA et al., 2011). Estudo da estrutura genética de uma raça permite conhecer como os genes estão sendo conduzidos ao longo das gerações, proporcionando informações sobre o número de genes que lhe deram origem e estimando a participação deles na população atual (AMARAL et al., 2019).

O uso das informações de pedigree no estudo da estrutura genética de uma população tem sido feito para maioria das espécies, tais como bovino (GUTIÉRREZ et al., 2003) caprinos (BARROS et al., 2011) e ovinos (RODRIGUES et al., 2009; REGO NETO et al., 2014). Entretanto, a avaliação de uma população através de dados genealógicos muitas vezes é prejudicada pela escassez e qualidade desse tipo de informação.

Com os avanços da genética molecular a avaliação da estrutura genética de populações foi facilitada, pois os marcadores moleculares fornecem informações valiosas para o monitoramento

da seleção artificial, podendo ser usados também na identificação de animais ou conjunto de animais que devem ser mantidos em processo de reprodução, para evitar que exista a perda da diversidade genética. Além disso, esta informação pode ser utilizada para evitar o acasalamento entre animais altamente endogâmicos (DEASSIS et al., 2009).

Uma população pode ser conhecida através de análises de estrutura genética de populações, onde através de informações geradas por marcadores moleculares, podendo ser calculado parâmetros, como o conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), análise de variância molecular (AMOVA) além das estatísticas FST, RST e Dest, que em conjunto, descrevem a distribuição da diversidade genética e permitem inferir sobre a existência de estruturação na população.

O PIC é uma medida de informatividade relacionada à heterozigosidade esperada e é calculada a partir das frequências alélicas (BOTSTEIN et al. 1980; HEARNE et al. 1992). A heterozigosidade esperada é calculada usando uma fórmula imparcial a partir de frequências alélicas, assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (NEI, 1987), sendo uma medida útil de informatividade de um *locus: loci* com heterozigosidade esperada de 0,5 ou menos geralmente não são muito úteis para análises de parentesco em larga escala (McMANUS et al., 2011). A heterozigosidade observada é a proporção de indivíduos heterozigotos nas amostras da população. O equilíbrio de Hardy-Weinberg descreve as frequências esperadas de genótipos em uma população sob acasalamento aleatório. A AMOVA investiga o nível de diferenciação genética presente entre as populações. O RST e o FST e incorpora a informação do tamanho do alelo (SLATKIN, 1995). Já o Dest é um parâmetro de diferenciação real que se baseia na proporção de alelos que são únicos na subpopulação (JOST, 2008).

2.3. Relações de parentesco

Parentesco pode ser definido como relação genética entre dois indivíduos, ou seja, dois indivíduos quaisquer são parentes porque têm, pelo menos, um ancestral comum, seja pai ou mãe, avós, tios, dentre outros (WANG, 2002). O parentesco pode ser direto, quando um indivíduo é descendente de outro, ou colateral, quando dois indivíduos apresentam uma ancestral em comum na genealogia de ambos.

Há um interesse do ponto de vista do melhoramento animal em se conhecer o grau de parentesco entre dois ou mais indivíduos, especialmente quando há escassez de dados de

pedigree, uma vez que indivíduos aparentados apresentam mais alelos em comum do que indivíduos não relacionados, podendo assim estimar o valor genético de um com base em informações de seu ancestral cuja informação foi armazenada (BLOUIN, 2003).

Conhecimento de parentesco pode ser o ponto inicial para o planejamento de programas de melhoramento, sendo útil na estimativa de parâmetros genéticos que influenciam o desempenho de progenitores (RITLAND, 2002), sendo também importante em programas de conservação genética para evitar perdas de material genético a parti de acasalamentos aleatórios.

A relação de parentesco é calculada pelo coeficiente de parentesco (r), que calcula a probabilidade de dois indivíduos apresentarem genes idênticos pelo fato de terem um ancestral comum, ou seja, mede a proporção de alelos entre dois indivíduos que são idênticos por descendência (IBD) (LYNCH; WALSH, 1998; WANG, 2011). Diversos programas estatísticos já foram criados com o objetivo de estimar o coeficiente de parentesco baseados em dados moleculares (OLIEHOEK et al., 2006). Entre eles podem ser citados o COANCESTRY, CERVUS, COLONY, diversos pacotes presente no software R, dentre outros. Esses programas estimam o parentesco através de modelos estatísticos, que utilizam informações genéticas derivadas de marcadores moleculares. Esses estimadores podem utilizar tanto métodos de momentos como métodos de máxima verossimilhança. As análises dependem da precisão dos estimadores e não existe um estimador universal para qualquer situação. Sendo assim, saber a qualidade da informação genética é de suma importância para a realização de análises confiáveis, bem como realização previa de simulações para definir qual melhor estimador para cada tipo de dado estudado (OLIEHOEK et al., 2006).

2.4. Marcadores moleculares

Marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas (polimorfismo de proteína), ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não. A sequência de nucleotídeos e sua função são, em geral, desconhecidas. Contudo, se o comportamento de um dado marcador molecular obedecer às leis de herança de Mendel, ele é definido como marcador genético. Portanto, é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser DNA, ou produto da transcrição e tradução de uma sequência de DNA, não implica que este se constitua em um marcador genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta capaz de detectar variações genéticas no DNA. Esses marcadores são numerosos e distribuídos por todo o genoma, possuem herança mendeliana, geralmente expressam caráter codominante e muitas vezes são multialélicos (YANG et al., 2013).

Uma das técnicas mais importantes, desenvolvidas para estudos de marcadores moleculares é a PCR (Reação em Cadeia de polimerase), que consiste em uma reação em cadeia por ação da enzima DNA polimerase que copia os fragmentos de DNA, desde que exposta a uma fita de DNA molde, desoxirribonucleotídeos e oligonucleotídeos usados como iniciadores pela enzima polimerase (MEDEIROS et al., 2006). Segundo Mullis; Faloona (1987), um grande número de abordagens para a geração de novos marcadores moleculares baseados nessa técnica foram detalhados, principalmente, devido à sua aparente simplicidade e sucesso. Portanto, o uso de iniciadores aleatórios superou a limitação do conhecimento prévio da sequência e facilitou o desenvolvimento de marcadores genéticos para uma grande variedade de finalidades.

Os marcadores moleculares têm sido utilizados em análises genéticas em várias situações, como por exemplo, na caracterização de raças, na identificação de clones, no fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos. Os marcadores podem diferir nas características importantes como, na abundância genômica, nível de polimorfismo detectável e informação genética, especificidade dos *loci*, reprodutibilidade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Vários tipos de marcadores moleculares são capazes de detectar o polimorfismo genético diretamente do DNA, entre eles, destaca-se a classe conhecida como microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), ou ainda STR (Short Tandem Repeats), por serem bastante polimórficos, ou seja, possuem grande habilidade para detectar diferenças entre indivíduos (FALEIRO, 2007).

2.5. Marcadores microssatélite

Os marcadores microssatélites apresentam alta sensibilidade, elevada capacidade de discriminação entre indivíduos, alto polimorfismo, heterozigose elevada e praticidade em rotinas laboratoriais. Estas características importantes tornaram este marcador útil para a realização de testes de parentesco, genética forense, caracterização genética e análise de diversidade genética (GAO et al., 2007).

Além disso, o elevado polimorfismo e ubiquidade dentro do genoma tornam os microssatélites marcadores genéticos muito informativos. Esse marcador apresentam herança Mendeliana e interação alélica do tipo codominante, tendo sido considerados ferramentas importantes aos programas de melhoramento por apresentar informações necessárias para estimar níveis de diferenciação populacional, fluxo gênico e tamanho efetivo de populações (GUICHOUX et al., 2011).

Desta forma, são utilizados extensivamente para estimar o parentesco e endogamia em diferentes espécies, além do que, são recomendados pela Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG), por serem abundantes e informativos, fáceis de usar e geradores de resultados satisfatórios (ADAMOV et al., 2011).

Os microssatélites apresentam algumas vantagens tais como a necessidade de pouca quantidade de amostra biológica, o fato de não se restringir a um único tipo de amostra, (podendo usar, inclusive, material de animais mortos) e a presença de novas tecnologias que permitam uma análise fácil, rápida e eficiente. Essas são algumas das razões pelas quais estes marcadores têm sido amplamente utilizados na avaliação da estrutura genética de várias populações animais (VIGILANT, 2016).

A Food Agriculture Organization (FAO) e a International Society of Animal Genetics (ISAG) estabeleceram, em 1995, um grupo de consultores com o objetivo de elaborar uma série de recomendações técnicas e diretrizes para avaliação da diversidade genética de raças de animais domésticos, e por meio do projeto chamado Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD) foi selecionada uma lista de *loci* de microssatélites que podem ser utilizados para estudos da diversidade genética e caracterização de raças de ovinos, caprinos, suínos, bovinos e aves (FAO, 2004).

2.6. Marcador SNPs

Os SNPs são polimorfismo de base única que atualmente são muito utilizados para mapear de maneira eficiente as características mendelianas, detecção de QTLs, construção de bibliotecas de genes e para a seleção genômica ampla como um método para acelerar o ganho genético (KIJAS et al., 2009). Este marcador apresenta característica codominante estando espalhados por todo o genoma e apresentam alta variabilidade genética. Atualmente, os SNPs são bastante utilizados para análise de diversidade genética, estrutura populacional, análises de parentesco, bem como estão bem inseridos em programas de melhoramento genético animal (SUN et al., 2016).

Estudos com SNPs podem ser úteis para o conhecimento das relações de parentesco em diferentes rebanhos sem a utilização de pedigree (PETERSON et al., 2012). A ISAG já adotou uso de painéis de SNP para testes de parentesco desde 2013, demonstrando inúmeras razões para seu uso, incluindo baixas taxas de erros de genotipagem e alto poder informativo de valores genômico (HARNEY et al., 2018). Porém, esse tipo de marcador é menos informativo por apresentarem dois alelos por *locus*, gerando assim à necessidade de grande quantidade de SNPs, aumentando assim a dificuldade de utilização dessa técnica (REGO NETO, 2017).

3. REFERÊNCIAS

- ADAMOV, N. et al. Microsatellite markers for pedigree verification in cattle. **Journal of Animal Science**, v.1, p.9-15, 2011
- AGUIAR, A. L. Caracterização de um Rebanho da Raça Ovina Somalis Brasileira com Base em Análise de Pedigree. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA ZOOTEC, 2015 Fortaleza – CE, **Anais**. Fortaleza: ZOOTEC, 2015.
- AMARAL, R. et al. Inbreeding depression and genetic variability in nellore breed. **Archives of Veterinary Science**, v. 24, n. 3, 2019.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE OVINOS – ARCO, 2018. Padrões raciais. Disponível em: <<http://www.arcoovinos.com.br/index.php/mn-srgo/mn-padroesraciais/40-santaines/>> Acesso em: 25 de Novembro de 2019).
- BARROS, E.A. et al. Estrutura populacional e variabilidade genética da raça Marota. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p.543-552, 2011.
- BIAGIOTTI, D. **Associação e seleção genômica ampla em ovinos Santa Inês para características relacionadas a resistência à endoparasitas**. Teresina: Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, 73 p. Tese de Doutorado, 2016.
- BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, p. 503–511, 2003.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- DEASSIS, J. B. et al. Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, p. 1519-1524, 2009.
- FALCONER, D.S. **Introdução à Genética Quantitativa**. Trad. de M.A. Silva e J.C.Silva. Viçosa, MG: UFV, Impr. Univ, 279 p.1987.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Measurement of Domestic Animal diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers**. Rome, 58f. 2004.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cernagen, 1998. 220p.
- GAO, L.L. et al. Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20 p.82-93, 2007.
- GUICHOUX, E. et al. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 4, p. 591-611, 2011.

GUTIÉRREZ, J. P. et al. Pedigree analysis of eight Spanish beef cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 35, n. 1, p. 43, 2003.

HARNEY, E. et al. Transcriptome based SNP discovery and validation for parentage assignment in hatchery progeny of the European abalone *Haliotis tuberculata*. **Aquaculture**, v. 491, p. 105-113, 2018.

HEARNE, C. M.; GHOSH, S.; TODD, J. A. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics**, v. 8, n. 8, p. 288-294, 1992.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da pecuária municipal, 2017**. Disponível: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acessado em 19/12/2019.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, 17(18), 4015–4026, 2008.

KIJAS, J. W. et al. A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds. **PloS one**, v. 4, n. 3, 2009.

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of Quantitative Traits**. Sunderland, MA: Sinauer, 1998.

MCMANUS, C. et al. Avaliação ultrasonográfica da qualidade de carcaça de ovinos Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 8-16, 2013.

McMANUS, C. et al. Pedigree analysis of Brazilian Morada Nova hair sheep. **Small Ruminant Research**, v. 170, p. 37-42, 2019.

McMANUS, C. et al. The challenge of sheep farming in the tropics: aspects related to heat tolerance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, p. 107-120, 2011.

MEDEIROS, C.F.L. et al. Uso de microssatélites em estudos de biologia da conservação. **Floresta e Ambiente**, v.13, p. 25-36, 2006.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p.335-350, 1987.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. Columbia university press, 1987.

OLIEHOEK, P.A. et al. Estimating relatedness between individuals in general populations with a focus on their use in conservation programs. **Genetics**, v. 173. p. 483–496, 2006.

OLIVEIRA, P. S. et al. Estrutura populacional de rebanho fechado da raça Nelore da linhagem Lemgruber. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 639-647, 2011.

PETERSON, B. K., et al. Double digest RADseq: An inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. **PLoS ONE**, v.7, e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>, 2012.

REGO NETO, A. A. et al. Estrutura e distribuição geográfica do rebanho de ovinos Santa Inês no estado do Piauí. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.** v. 15, p. 272-280. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402014000200004>, 2014.

REGO NETO, A.A. **Estrutura genética e associação genômica ampla para características de tamanho corporal em ovinos da raça Santa Inês**. 2017. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal), Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

REZENDE TEIXEIRA NETO, M. et al. Descrição do crescimento de ovinos Santa Inês utilizando modelos não-lineares selecionados por análise multivariada. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 1, 2016.

REZENDE, F. M. Incorporation of genetic marker information in beef cattle breeding programs. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 12, n. 4, p. 5172-5173, 2012.

RITLAND, K. Extensions of models for the estimation of mating systems using independent *loci*. **Heredity**, London, v.88, p.221-228, 2002.

ROCHA, L. et al. Painel SRT para teste de paternidade em caprinos. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v.12, 2018.

RODRIGUES, D.S. et al. Estrutura populacional de um rebanho da Raça Morada nova como contribuição para a conservação. **Ciência Animal**, v.19, n.1, p.103-110, 2009.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995.

SOUSA, W.H. et al. Ovinos Santa Inês: estado de arte e perspectivas In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 2, 2003, João Pessoa. **Anais**. João Pessoa: SINCORTE, 2003.

STÄDELE, V.; L. VIGILANT. Strategies for determining kinship in wild populations using genetic data. **Ecology and Evolution**, v.6, p.6107–6120. doi:10.1002/ece3.2346, 2016.

SUN, M. et al. On the use of dense SNP marker data for the identification of distant relative pairs. **Theoretical Population Biology**, v.107, p. 14-25, 2016.

WANG, J. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. **Genetics**, v. 160, p. 1203–1215, 2002.

WANG, J. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, n. 1, p. 141-145, 2011.

YANG, W. et al. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, p. 2, 2013.

CAPITULO I – Estrutura e diversidade genética de rebanhos ovinos da Raça Santa Inês no Meio-Norte do Brasil

***Elaborado segundo normas da revista Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS) (ISSN 1011-2367).**

1 **Estrutura e diversidade genética de rebanhos ovinos da Raça Santa Inês no Meio-Norte**
2 **do Brasil**

3 Alzira Regina Silva de *Deus*¹, Geice Ribeiro *Silva*², Luciano Silva *Sena*², Fábio Barros
4 *Britto*³, Débora Araújo de *Carvalho*¹, Jorge Victor Gomes de *Freitas*⁴, and José Lindenberg
5 Rocha *Sarmiento*^{5*}

6
7 *** Autor Correspondete: José Lindenberg Rocha Sarmiento**

8 Tel: +55-89-9-9977-4911, E-mail: sarmiento@ufpi.edu.br

9 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade
10 Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550,
11 Teresina, PI, Brasil.

12 ²Doutor em Ciência Animal

13 ³Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí,
14 Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI,
15 Brasil.

16 ⁴Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus
17 Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

18 ⁵Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí,
19 Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI,
20 Brasil.

21

22 **ORCID**

23 Alzira Regina Silva de *Deus* <https://orcid.org/0000-0001-7594-3204>

24 Geice Ribeiro *Silva* <https://orcid.org/0000-0003-0378-1079>

25 Luciano Silva *Sena* <https://orcid.org/0000-0003-0054-6655>

26 Fábio Barros *Britto* <https://orcid.org/0000-0002-5705-5374>

27 Débora Araújo de *Carvalho* <https://orcid.org/0000-0001-5913-3471>

28 Jorge Victor Gomes de *Freitas* <https://orcid.org/0000-0002-3214-7125>

29 José Lindenberg Rocha *Sarmiento* <https://orcid.org/0000-0002-4215-1515>

30 **Título do manuscrito:** Estrutura e diversidade genética de rebanhos ovinos da Raça Santa
31 Inês no Meio-Norte do Brasil

32 **Resumo**

33 **Objetivo:** avaliar a estrutura genética e a diversidade de seis rebanhos ovinos Santa Inês da
34 sub-região Centro-Norte do Brasil.

35 **Métodos:** Um painel de 20 locos microssatélites altamente polimórficos e informativos foi
36 selecionado e amplificado. Os seguintes parâmetros foram obtidos: média geral do número de
37 alelos = 15,4; heterozigosidade esperada (He) = 0,89; conteúdo de informação do
38 polimorfismo (PIC) = 0,88; capacidade discriminatória = 0,95; probabilidade combinada de
39 identidade = $1,50 \times 10^{-34}$; e probabilidade de exclusão = 1,00.

40 **Resultados:** Os rebanhos com os graus mais baixo e mais alto de variabilidade genética
41 foram as Fazendas 6 (He = 0,70, PIC = 0,653 e riqueza alélica (Ar) = 3,76) e 1 (He = 0,89,
42 PIC = 0,882 e Ar = 4,39), respectivamente. Sinais de gargalo genético foram observados em
43 todos os lotes, bem como diferenciação genética moderada, com $F_{ST} = 0,053$, $R_{ST} = 0,096$ e
44 $Dest = 0,169$. A taxa de migração em todos os bandos foi alta, com uma tendência em direção
45 à Fazenda 1. Esse achado refutou a subestrutura apresentada na análise bayesiana de mistura,
46 corroborando a matriz observada na análise de componentes principais e na análise de
47 agrupamento.

48 **Conclusão:** Os resultados demonstraram estruturação moderada e alta diversidade genética
49 nos rebanhos. No entanto, é necessário revisar as estratégias de manejo, pois foram
50 observados sinais de gargalo e erosão genética.

51 **Palavras-chave:** Conservação, Melhoramento genético, Variabilidade genética, Ovelhas
52 capilares, Microssatélites

53 INTRODUÇÃO

54

55 Distribuída por todo o Brasil, a ovinocultura está mais concentrada nas regiões
56 Nordeste e Sul, com foco principal na produção de carne (Viana, 2008; IBGE, 2017). Apesar
57 do potencial, a produção de carne ovina no país ainda está abaixo da demanda, o que obriga o
58 mercado a reforçar os estoques com a importação do produto (Viana et al., 2015).

59 De praxe, para que a ovinocultura tenha um bom desempenho, é necessário selecionar
60 animais com características que possibilitem boa adaptabilidade e reprodutibilidade. Dessa
61 forma, a raça Santa Inês se encontra como uma das mais relevantes, apresentando animais
62 com porte elevado, quando comparado com as demais raças ovinas brasileiras, que
63 apresentam boa taxa de crescimento corporal, alcançando pesos entre 40 e 60 kg, além de
64 baixa susceptibilidade a parasitas gastrointestinais, quando comparada a outras raças nativas
65 (Jucá et al., 2016).

66 Apesar de seu potencial produtivo, a raça Santa Inês corre sérios riscos de perda de
67 variabilidade genética e, por consequência, perda das principais características que a
68 credenciam. A FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e outras
69 instituições de renome apontam que as práticas de acasalamentos desordenados sem controle
70 zootécnico eficiente podem causar erosão ou diluição genética, o que, por sua vez, pode
71 comprometer todo o desempenho do rebanho (McManus et al., 2014; Gaouar et al., 2017).
72 Por isso, instituições de pesquisa têm se preocupado em desenvolver estratégias de
73 conservação genética através do conhecimento da estrutura populacional, com foco em
74 preservar as principais características da raça Santa Inês.

75 Para tanto, marcadores genéticos, como os microssatélites, têm sido importantes
76 aliados em programas de conservação e melhoramento genético, pois apresentam boa

77 distribuição no genoma, alto polimorfismo, multialelismo, sendo altamente informativos e
78 potencialmente heterólogos, o que torna seu uso mais acessível (Câmara et al., 2017).

79 Por meio deste estudo, objetivou-se verificar a estrutura e diversidade genética de
80 rebanhos de ovinos da raça Santa Inês, com intuito de subsidiar informações para auxiliar as
81 entidades interessadas na tomada de decisões relativas a programas de conservação e
82 melhoramento de recursos genéticos.

83 **MATERIAL E MÉTODOS**

84 Os experimentos foram realizados de acordo com os regulamentos para
85 experimentação com animais vivos estabelecidos pelo protocolo da Comissão de Ética no Uso
86 de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, com número 337/17.

87 **Material biológico e isolamento do DNA genômico**

88 Foram coletadas amostras de sangue periférico de 257 ovinos da raça Santa Inês
89 provenientes de seis fazendas oriundas dos estados do Piauí (PI) e Maranhão (MA),
90 localizados na sub-região Meio-Norte do Brasil. O total de 135 amostras foram obtidas da
91 fazenda com identificação Fazenda 1 (Município José de Freitas – PI), 52 da Fazenda 2
92 (Município Santa Inês – MA), 27 da Fazenda 3 (José de Freitas - PI), 19 da Fazenda 4
93 (Município Floriano – PI), 18 da Fazenda 5 (Município Campo Maior – PI) e seis da Fazenda
94 6 (Campo Maior – PI). O material biológico foi armazenado a -20°C, em tubos a vácuo
95 contendo 1 % do anticoagulante EDTA.

96 O DNA genômico foi extraído e purificado usando o kit comercial da Qiagen,
97 conforme recomendações do fabricante. Após a extração, o material foi visualizado em gel de
98 agarose a 0,5 % e corado em brometo de etídeo, a fim de verificar a integridade do DNA.

99 **Amplificação de microssatélites**

100 Foram selecionados 20 *loci* microssatélites da lista recomendada pela FAO (FAO,
101 2011). Previamente, as reações foram testadas e otimizadas em um volume total de 16 μ L,
102 chegando-se ao seguinte perfil: adicionou-se pelo menos 2,5 mM dNTPs, 1 X de tampão Tris-
103 HCl/KCl, 1,0–2,0 mM MgCl₂ (conforme Tabela 1), 1,25 μ M de cada *primer*, 1 unidade de
104 Taq DNA Polimerase, água deionizada e 3 μ l de DNA extraído (3 ng/ μ l). A programação
105 adotada no termociclador (*Applied amplifications by life technologies*) foi de 94°C por 5 min,
106 seguido por 30 a 35 ciclos de 94°C por 45 s para desnaturação, 50 a 62°C por 45 s para
107 anelamento, 72°C por 50 s para extensão. Após os ciclos realizou-se uma extensão final de
108 72°C por 7 min (Tabela 1). Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de
109 poliacrilamida não-desnaturante a 6 %, corados em solução de nitrato de prata (0,0015 g/ml)
110 com formaldeído (0,4 % v/v) e revelados por NaOH (1,5 mg/ml) com formaldeído (0,4 %
111 v/v), modificado de Benbouza et al. (2006). Os fragmentos foram registrados em uma
112 planilha, a fim de se obter uma base de dados de frequência alélica.

113 **Controle de qualidade e Análise dos dados**

114 A fim de detectar a possível presença de alelos nulos, alelos dropout e erros de scoring
115 por stutters, usou-se o software Microchecker v.2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Para
116 verificar o nível de influência dos alelos nulos nas estimativas de diferenciação genética, foi
117 utilizado também o programa FreeNA, que calcula a distância genética e o FST com e sem a
118 correção de ENA (Chapuis e Estoup, 2007). Através do programa Bayescan v. 2.1 (Foll e
119 Gaggiotti, 2008), usando o método de inferência Bayesiana, foi calculado a probabilidade dos
120 *loci* estarem sobre algum processo de seleção. Foram realizadas várias corridas prévias de
121 forma a se ajustar as estimativas dentro da faixa de taxa de aceitação de 0,25 a 0,45, conforme
122 recomendado pelo manual. Para isso, foram adotados os seguintes parâmetros: probabilidade

123 *a priori* 10:1, para o modelo neutro, 20 corridas piloto consistindo de 5.000 repetições cada,
124 seguido por 100.000 iterações, com descarte das 50.000 iniciais. Conforme sugerido pelo
125 manual, usando a interpretação de Jefferys's, *loci* com probabilidade *a posteriori* acima de
126 0,76 foram considerados sob algum processo de seleção.

127 Para verificar o perfil de variabilidade genética, os parâmetros Heterozigosidade
128 Observada (H_o), Heterozigosidade Esperada (H_e) e número de alelos (A) foram calculados
129 usando o pacote R *diveRsity* (Keenan et al., 2013), sendo que a riqueza alélica (AR) e a
130 riqueza alélica privada ($PvAR$) foram geradas usando o programa *HpRare* (Kalinowski,
131 2005). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi estimado usando o programa *Cervus*
132 (Kalinowski et al., 2007). Para verificar o poder dos marcadores de avaliar o parentesco entre
133 rebanhos, a probabilidade de exclusão (PE), a probabilidade de identidade (PI) e a
134 probabilidade combinada de identidade (CPI) foram geradas usando o programa *Genalex*
135 (Peakall e Smouse, 2006). A capacidade de discriminação foi estimada usando o programa
136 *FORSTAT* (Ristow e D'amato, 2017). O teste para o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg
137 (HWE) e desequilíbrio de ligação foi realizado usando o pacote R *Genepop* (Rousset, 2008).
138 Posteriormente, a correção de Bonferroni foi implementada, a fim de evitar estimativas
139 erroneamente significativas ($p < 0,05$).

140 Para a análise de diferenciação genética entre os rebanhos, foram avaliados os
141 parâmetros F_{ST} , R_{ST} e $Dest$, estimados pelo programa *Spagedi* (Hardy e Vekemans, 2002) e
142 pelo pacote R *diveRsity*. O R_{ST} é um análogo do F_{ST} , que incorpora a informação do tamanho
143 do alelo. Já o $Dest$ é um parâmetro de diferenciação real que se baseia na proporção de alelos
144 que são únicos na subpopulação (Jost, 2008).

145 Usando o teste de permutação de tamanho do alelo, por meio do programa SPAGeDI,
146 foi verificado ainda o nível de marcadores que se adequam ao modelo de mutação SMM
147 ($R_{ST} > pR_{ST}$, em que o pR_{ST} equivale à média de R_{ST} após a permutação de 10.000 iterações).

148 Para verificar a relação entre os rebanhos, foi conduzida a análise de agrupamento
149 Bayesiano, adotando como parâmetro o modelo *admixture*, implementado pelo algoritmo
150 baseado nos métodos de cadeia de Markov de Monte Carlo (MCMC), estimados por meio do
151 programa STRUCTURE v.2.3.2 (Pritchard et al., 2000). Para sua execução, foi empregado
152 descarte das 5×10^5 primeiras iterações com a utilização de 1×10^6 iterações restantes,
153 gerados em cinco execuções para cada K, com simulação variando de 1 a 20. Para estimar o
154 valor de K que melhor se ajusta aos dados, foi empregada a estimativa de ΔK , proposta por
155 Evanno et al. (2005), usando o aplicativo da web STRUCTURE HARVESTER v.0.6.1
156 (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Para calcular a média das cinco réplicas
157 do melhor K e gerar um gráfico barplot final que ilustre de forma mais clara o arranjo entre os
158 genótipos, usou-se o pacote R Pophelper v.2.2.9.

159 Por meio dos pacotes R Poppr, adegenet, Ape, Polysat e Ggplot2, foi construído ainda
160 um dendrograma baseado na distância de Nei, implementado pelo algoritmo de agrupamento
161 Neighbour-Joining. Com os mesmos pacotes, a fim de verificar o perfil de distribuição dos
162 genótipos em plano 2D, foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA) baseada
163 numa matriz de compartilhamento de alelos.

164 Para avaliar se houve efeito de gargalo genético populacional, foi realizado o teste de
165 Wilcoxonsing-rank utilizando o programa Bottleneck v.2.1.02 (Piry et al., 1999). Geralmente,
166 esse efeito faz com que a heterozigosidade na condição de HWE seja maior do que quando
167 em equilíbrio mutação-deriva. Para a execução, as análises foram conduzidas considerando

168 que os marcadores atendessem a modelos mutacionais que têm como finalidade determinar o
169 número de alelos esperados, tendo como base a heterozigosidade observada. Para tanto, foram
170 utilizados três modelos: o modelo SMM (Stepwise Mutation Model) (Slatkin, 1995), que
171 assume que quando existe uma mutação em um *locus*, este ganha ou perde uma repetição; o
172 modelo IAM (Infinite Allele Model) (Wright, 1931), em que cada mutação cria
173 aleatoriamente um novo alelo; e o modelo TPM (Two Phase Model) (Di Rienzo et al.,1994),
174 que assume que mutações podem ocorrer gradualmente ou por passos. Para o TPM, os
175 parâmetros adotados tiveram valor de variância entre múltiplos passos igual a 12,95 % de
176 mutação de único passo e 5 % de mutação de múltiplos passos, como sugerido pelos
177 desenvolvedores do programa.

178 A fim de verificar de forma bidirecional a distribuição do fluxo genético entre os
179 rebanhos, usando como base os estimadores F_{ST} , G_{ST} , D de Jost e N_m , foram construídos
180 gráficos network implementados pelo pacote R *diveRsity* por meio da função *divmigrate*.

181 **RESULTADOS**

182

183 **Desempenho dos marcadores microssatélites em ovinos**

184 Dos 20 *loci* microssatélites utilizados, o programa Microchecker apontou indícios de
185 presença de alelos nulos para nove alelos. No entanto, apenas um *locus* foi descartado das
186 análises por apresentar frequência acima de 0,20. Alelos nulos com frequência inferior a este
187 valor não comprometem avaliações populacionais e foram mantidos neste trabalho (DAKIN;
188 AVISE, 2004). Ao empregar o programa FreeNa, não foi verificada diferença estatística
189 significativa ($P > 0,05$) entre os parâmetros de diferenciação genética global de Weir (1996)
190 antes ($F_{ST} = 0,052$) e depois ($F_{ST} = 0,049$) da correção ENA (Tabela 2).

191 Todos os marcadores desviaram-se do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com 65% deles
192 apresentando significância quanto ao déficit de heterozigotos ($P < 0,001$) e nenhum
193 apresentando significância para o excesso de heterozigotos. Sessenta e seis por cento das
194 combinações entres os *loci* par-a-par apresentaram-se não significativas para o desequilíbrio
195 de ligação, sugerindo que, estatisticamente, maior parte dos *loci* não está associada (Tabela2).

196 Com exceção do *loci* CSRM60, todos os demais 19 *loci* foram polimórficos, sendo
197 que o *pool* de todas as amostras geraram 308 alelos no total, com variação de 9 (ILSTS11) a
198 36 (INRABERN172) e média de 15,4 alelos. Metade dos *loci* apresentaram-se neutros e os
199 demais apresentaram evidências da ação de seleção, com grau de magnitude indo de forte
200 (0,91 a 0,97) a decisivo (0,99 a 1,00), conforme observa-se na Tabela 2. Ao considerar na
201 avaliação todos os ovinos da amostragem, os marcadores apresentaram alto desempenho,
202 demonstraram-se altamente polimórficos e com alto poder de discriminação entre os
203 indivíduos, com PIC e DC médio (Tabela 2) de, respectivamente, $0,88 \pm 0,05$ e $0,95 \pm 0,02$,
204 com valor mínimo de 0,72 e 0,90 (ILST11) e máximo de 0,93 e 0,98 (BM1818).

205 Ao avaliar a capacidade dos vinte marcadores de inferir o parentesco, considerando os
206 257 ovinos analisados, observaram-se valores de PI entre 0,0085 (CSR247) e 0,0944
207 (ILSTS11) e de PE entre 0,740 (ILSTS11) e 0,969 (CSR247). Os valores combinados de PI
208 e PE foram, respectivamente, de $1,5 \times 10^{-34}$ e 1,000 (Tabela 2).

209 O nível de diversidade genética (H_e) dos marcadores variou de 0,76 (ILST11, $H_o =$
210 0,55) a 0,93 (CSR247, $H_o = 0,90$), com média de $0,89 \pm 0,21$ ($H_o = 0,78 \pm 0,04$), conforme
211 Tabela 2.

212 **Diversidade e estruturação genética dos rebanhos ovinos**

213 Todos os rebanhos apresentaram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Com
214 exceção do rebanho da Fazenda 6, todos os demais apresentaram significância para o déficit
215 de heterozigotos, sem excesso significativo de heterozigoto ($p > 0,05$). Ao adotar como
216 aceitáveis as frequências com valores até 0,20, os rebanhos que apresentaram maior número
217 de marcadores com indícios de alelos nulos foram aqueles das Fazendas 2 e 3 (Tabela 3).
218 Pesquisas apontam que valores abaixo de 0,20 não comprometem as inferências relacionadas
219 a estudos populacionais (Dakin e Avise, 2004).

220 O rebanho da Fazenda 1 foi o que apresentou o maior grau de diversidade genética (A_r
221 = 4,69, $H_e = 0,89$, $PIC = 0,882$), sendo que o menor foi o da Fazenda 6 ($A_r = 3,76$, $H_e = 0,70$,
222 $PIC = 0,65$). Os rebanhos que apresentaram os maiores valores de riqueza alélica privada
223 foram aqueles das Fazendas 1 e 2, com, respectivamente, 21 e 13 alelos (Tabela 3).

224 Ao realizar o teste de permutação global de tamanho do alelo, observou-se alguma
225 influência do modelo de mutação SMM entre os marcadores microsatélites aqui utilizados. O
226 RST (0,096) foi significativamente maior que pRST (0,038) (p -valor = 0,005), o que sugere a
227 influência da mutação na diferenciação genética entre alguns rebanhos. Porém, considerando
228 os *loci* em separado, a maioria não atendeu a essa condição, indicando, nesse caso, que os

229 microssatélites podem também estar atendendo a modelos de mutações de múltiplos passos
230 como o modelo IAM, refletindo que o fluxo genético também pode estar contribuindo em
231 alguma parcela para a distinção entre os rebanhos.

232 No geral, o padrão de estruturação dos rebanhos apresentou grau de magnitude
233 moderado, com $F_{ST}=0,053$, R_{ST} (um análogo do F_{ST} , que adota o padrão de mutação SMM
234 entre os ovinos) com valor de 0,096 e $Dest$, que adota nos cálculos os alelos privados, com
235 valor de 0,169 (Quadro 1). Isso pode também ser reflexo do alto fluxo ocorrido entre os
236 rebanhos, observando-se alto índice de migração relativa em direção, principalmente na
237 Fazenda 1 (Figura 1), com nível de confiança do bootstrap acima de 0,82 (Não disponível).

238 Depois de várias simulações usando o método de agrupamento bayesiano
239 implementado no programa STRUCTURE, estatisticamente, o K mais provável detectado foi
240 igual a 11, que contribuiu para que o rebanho da Fazenda 1 se subdividisse geneticamente em
241 seis grupos distintos, o que corroborou com os altos índices de diversidade genética (H_e , PIC
242 e A_r). Quando foram avaliadas as outras simulações, foi verificado que o rebanho oriundo do
243 estado do Maranhão começou a se diferenciar a partir do $K = 3$. Em compensação, a partir do
244 $K = 4$, os rebanhos das Fazendas 1 e 5 começaram a se distanciar dos demais, compartilhando
245 genótipos em comum. Nesse momento, os rebanhos das Fazendas 4 e 3 compartilharam maior
246 parte dos alelos, o que corrobora com o dendrograma montado sobre algoritmo UPGMA (o
247 nível de confiança dos nós apresentou-se acima de 72%, com correlação cofenética igual
248 0,84) e com o PCoA, apesar de o rebanho da Fazenda 6 ter destoadado da comparação (Figura
249 2).

250 Considerando os modelos de mutação SMM, houve evidência de deriva genética somente no
251 rebanho da Faz 1. No modelo TPM, houve evidência de deriva genética nos rebanhos da Faz

252 1, Faz 4 e Faz 6. Porém, ao propor que todos os marcadores estão sobre influência do modelo
253 de mutação IAM, observou-se o contrário, ou seja, que todas as populações estavam com
254 indícios de gargalo genético.

255 **DISCUSSÃO**

256 Ao avaliar o desempenho dos marcadores na raça Santa Inês, foi possível observar que
257 a presença de alelos nulos em alguns dos *loci* não foi suficiente para alterar significativamente
258 a estruturação populacional, sendo que se pôde observar alto grau de polimorfismo, com
259 presença de altos valores referentes ao número de alelos (A), PIC, Ho e He, sendo superior ao
260 obtido por Petrolí et al.(2014) (Ho = 0,34, He = 0,63, A = 7,45) e Souza et al.(2012) (Ho =
261 0,68, He = 0,745, A = 10, PIC = 0,712) na mesma raça. O mesmo ocorreu ao comparar com
262 raças como Morada Nova (A = 5,4, Ho = 0,533, He = 0,596, PIC = 0,586) e Ovelha
263 Pantaneira (A = 12,5, Ho = 0,62, He = 0,71, PIC = 0,71) (Crispim et al., 2014; Ferreira et al.,
264 2014).

265 Porém, o grau de polimorfismo observado no presente estudo foi inferior ao observado
266 na raça Savak-Akkaraman (A = 23,7, Ho = 0,56, He = 0,81) (Ozmen e Kul; Gok, 2020). Isto é
267 justificado, já que esta raça é tradicional da Turquia e tem alguma semelhança com as raças
268 pré-históricas, além disso, a raça Savak-Akkaraman, durante séculos, vem sendo criada por
269 tribos locais acompanhando inclusive a cultura nômade, e isso pode ter garantido a
270 conservação e a variabilidade da maior parte de seus genes. Pela sua natureza miscigenada,
271 dentre as diversas raças brasileiras, a Santa Inês costuma apresentar os maiores índices de
272 variabilidade genética (Paiva et al., 2011).

273 Em um cenário de acasalamentos aleatórios, assim como observado por Qanbari et al.
274 (2007) e Yilmaz (2016) nas raças Afshari e Kivircik, respectivamente, os marcadores aqui

275 utilizados demonstraram potencial para avaliação de parentesco. Houve uma probabilidade
276 quase nula de encontrar dois indivíduos não-parentes com o mesmo genótipo entre os
277 rebanhos, principalmente ao combinar os marcadores ($PI = 1,5 \times 10^{-34}$). No geral, a
278 probabilidade de exclusão foi alta ($> 0,74$) culminando em 100 % ao combinar os marcadores.
279 Segundo alguns estudos, o mínimo requerido de CPE (Combinação de probabilidade de
280 exclusão) para a identificação de um parental real é de 0,9999 (Pity et al. 1999; Sherman et al.
281 2004; Qanbari et al., 2007; Van Eenennaam et al. 2007; Yilmaz, 2016), o que torna a
282 utilização dos marcadores aqui utilizados viáveis para a avaliação de parentesco.

283 Nenhum dos rebanhos manteve a frequência alélica relativa constante ($pHWE < 0,001$).
284 Como esperado, com exceção do rebanho de Campo Maior, todos os demais apresentaram um
285 déficit significativo ($p < 0,05$) de heterozigotos, provavelmente em função do efeito Wahlund
286 (Ozmen et al., 2020), que, nesse caso, pode ter sido intensificado pelas práticas de
287 acasalamento não-aleatório e seleção dirigida, refletidas nos níveis de endogamia (F_{IS})
288 apresentadas dentro de cada rebanho. Isso também pode ter causado gargalos genéticos, sendo
289 observado principalmente quando foi adotado o cenário em que todos os marcadores
290 obedeciam ao modelo IAM de mutação, apesar de não ter sido observado o mesmo nos
291 modelos TPM e SMM. Apesar disso, os três modelos apresentaram consenso de gargalo
292 genético, na Fazenda 1. Esses resultados foram diferentes do observado por Selvam e
293 Kathiravan (2019) e por Radha et al. (2011) nas raças indianas, Madras Red, Mecheri e
294 Kilakharsal, nos quais não houve presença de gargalo genético em nenhum dos modelos de
295 mutação.

296 Neste estudo, o alto índice de diversidade genética apresentado nos rebanhos deve-se,
297 provavelmente, em parte, ao fato da sua origem miscigenada e a práticas de acasalamentos
298 não-aleatórios adotados pelos criadores com matrizes de rebanhos mais produtivos, de forma

299 a maximizar o vigor genético. Isso pode ter corroborado com a estreita diferenciação
300 observada, inclusive entre os rebanhos ($F_{ST} = 0,053$ e $R_{ST} = 0,09$), bem como com o alto fluxo
301 estimado apresentado entre as populações, com as maiores migrações sendo observadas em
302 direção ao rebanho da Fazenda 1 e também pela presença aparente de vários subgrupos
303 genéticos ilustrados.

304 Também, vale ressaltar o papel das mutações na diferenciação entre as populações,
305 uma vez que alguns genes ligados aos microssatélites podem estar sendo submetidos à seleção
306 artificial (Crispim et al., 2014). Isto justificaria os resultados apresentados na análise de
307 neutralidades dos marcadores, em que parte dos *loci* apresentou algum efeito da seleção de
308 algumas mutações de prováveis microssatélites ligados a genes de produção.

309 Apesar de ter sido o rebanho com maior grau de diversidade genética confirmado, a
310 Fazenda 1 foi a que apresentou o maior número de alelos privados, sinalizando para o início
311 de uma possível erosão ou diluição genética (Allendorf, 1986, Zhang et al., 2018). Já o
312 rebanho da Fazenda 6, apresentou o menor valor, mesmo tendo a diversidade genética mais
313 baixa, o que indica que já tenha ocorrido maior perda de alelos, apesar de o número amostral
314 baixo poder ter comprometido os resultados obtidos para a referida fazenda.

315 Devido a sua capacidade produtiva e flexibilidade adaptativa, a criação da raça Santa
316 Inês vem sendo bastante difundida no Brasil, porém, instituições como a Embrapa vêm
317 apontando para o perigo da erosão genética, uma vez que são comuns práticas desordenadas
318 de acasalamento nos plantéis, principalmente para se alcançar em curto prazo, um nível de
319 produção adequado ao mercado. As consequências mais prováveis são o aumento da
320 endogamia, perda de fertilidade e de resistência a doenças, e a ocorrência frequente de
321 doenças genéticas recessivas.

322 O nível de diferenciação entre os rebanhos da sub-região Meio-Norte do Brasil foi
323 similar ao observado no estudo realizado por Souza et al. (2012) com a raça Santa Inês, ao
324 analisarem indivíduos oriundos de fazendas localizadas nas regiões Centro-Oeste e Nordeste
325 do país ($F_{ST} = 0,058$). Isto mostra, no geral, que as práticas de criação adotadas no país estão
326 ocasionando a formação de moderada estruturação entre as populações.

327 A provável explicação para a distinção ocorrida entre os genótipos das Fazendas 1 e 3,
328 observados no dendrograma e no PCoA, pode estar ligada aos acasalamentos com genótipos
329 distintos, o que corrobora com o observado no programa STRUCTURE, que demonstrou a
330 participação de vários clusters para o arranjo estrutural dos rebanhos. Esta também pode ser a
331 explicação mais plausível para a maior variabilidade genética encontrada na Fazenda 1,
332 contribuindo inclusive para o maior distanciamento da Fazenda 6.

333 **CONCLUSÃO**

334 Verificou-se alta variabilidade genética entre os rebanhos da raça Santa Inês na região
335 Meio-Norte do Brasil, com moderada estruturação populacional. Observou-se ainda algum
336 efeito de seleção de prováveis microssatélites ligados a genes de produção. Portanto, é
337 necessário revisar as estratégias de manejo, uma vez que foram detectados indícios de gargalo
338 e erosão genética, podendo ser atribuídos principalmente aos acasalamentos direcionados, à
339 seleção artificial e cruzamento.

340 **CONFLITO DE INTERESSES**

341 Certificamos que não há conflito de interesses com nenhuma organização financeira
342 em relação ao material discutido no manuscrito.

343

344 AGRADecIMENTOS

345 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
346 Tecnológico (CNPq), que concedeu a bolsa ao primeiro autor. Agradecemos também a
347 coordenação do Treinamento de Pessoal de Educação Superior Qualificado (CAPES) e da
348 Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo apoio.

349 REFERÊNCIAS

350 Allendorf, F. W. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo*
351 *Biology*, 5(2): 181-190.

352 Benbouza, H.; Jacquemin, J. M.; Baudoin, J. P.; Mergeai, G. 2006. Optimization of a reliable,
353 fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels.
354 *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 10: 77-81.

355 Câmara, T. S.; Nunes, J. F.; Diniz, F. M.; Silva, G. R.; de Araujo, A. M. 2017. Genetic
356 diversity and relatedness between Canindé and British Alpine goat breeds in Northeastern
357 Brazil accessed by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 16 (1):
358 gmr16019569

359 Chapuis, M. P.; Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population
360 differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.

361 Crispim, B. D. A.; Seno, L. D. O.; Egito, A. A. D.; Vargas Junior, F. M. D.; Grisolia, A. B.
362 2014. Application of microsatellite markers for breeding and genetic conservation of herds of
363 Pantaneiro sheep. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17: 317-321.

- 364 Dakin, E. E.; Avise, J. C.; 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93:
365 504-509.
- 366 Di Rienzo, A.; Peterson, A. C.; Garza, J. C.; Valdes, A. M.; Slatkin, M.; Freimer, N. B. 1994.
367 Mutational processes of simple-sequence repeat *loci* in human populations. *Proceedings of the*
368 *National Academy of Sciences*, 91: 3166-3170.
- 369 Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J, 2005. Detecting the number of clusters of individuals
370 using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14:, 2611-2620.
- 371 Ferreira, J. S. B.; Paiva, S. R.; Silva, E. C.; McManus, C. M.; Caetano, A. R.; Façanha, D. A.
372 E.; Sousa, M. A. N. 2014. Genetic diversity and population structure of different varieties of
373 Morada Nova hair sheep from Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 13 (2): 2480-2490
- 374 Foll, M.; Gaggiotti, O. 2008. A genome-scan method to identify selected *loci* appropriate for
375 both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. *Genetics*, 180: 977-993.
- 376 Food and Agriculture Organization. 2011. Molecular genetic characterization of animal
377 genetic resources.
- 378 Gaouar, S. B. S.; Lafri, M.; Djaout, A.; El-Bouyahiaoui, R.; Bouri, A.; Bouchatal, A.; Da
379 Silva, A. B. 2017. Genome-wide analysis highlights genetic dilution in Algerian sheep.
380 *Heredity*, 118: 293-301.
- 381 Hardy, O. J.; Vekemans, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial
382 genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, 2: 618-620.

- 383 IBGE, 2017. Produção Pecuária municipal.
384 http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf. (accessed 29
385 december 2019).
- 386 Jost, L. O. U. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*,
387 17: 4015-4026.
- 388 Jucá, A.; Faveri, J. C.; Melo Filho, G. M.; de Lisboa Ribeiro Filho, A.; Azevedo, H. C.;
389 Muniz, E. N.; Pinto, L. F. B. 2016. Effects of birth type and family on the variation of carcass
390 and meat traits in Santa Ines sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 48: 435-443.
- 391 Kalinowski, S. T. 2005. hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on
392 measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5: 187-189.
- 393 Kalinowski, S. T.; Taper, M. L.; Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program
394 CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment.
395 *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.
- 396 Keenan, K.; McGinnity, P.; Cross, T. F.; Crozier, W. W.; Prodöhl, P. A. 2013. diveRsity: An
397 R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their
398 associated errors. *Methods in Ecology and Evolution*, 4: 782-788.
- 399 McManus, C.; Hermuche, P.; Paiva, S. R.; Moraes, J. C. F.; de Melo, C. B.; Mendes, C. 2014.
400 Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and
401 environmental factors as risk classification for conservation. *Brazilian Journal of Science and
402 Technology*, 1: 3.
- 403 Ozmen, O.; Kul, S.; Gok, T. 2020. Determination of genetic diversity of the Akkaraman sheep
404 breed from Turkey. *Small Ruminant Research*, 182: 37-45.

- 405 Paiva, S. R.; Mariante, A. D. S.; Blackburn, H. D. 2011. Combining US and Brazilian
406 microsatellite data for a meta-analysis of sheep (Ovisaries) breed diversity: facilitating the
407 FAO global plan of action for conserving animal genetic resources. *Journal of Heredity*, 102:
408 697-704.
- 409 Peakall, R. O. D.; Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population
410 genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- 411 Petroli, C. D.; Paiva, S. R.; do Prado Paim, T.; McManus, C. M. 2014. Association of
412 microsatellite markers with production traits in Santa Inês and crossbred sheep. *Archives of*
413 *Veterinary Science*, 19.
- 414 Piry, S.; Luikart, G.; Cornuet, J. M. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting
415 recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of*
416 *Heredity*, 90: 502-503.
- 417 Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using
418 multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- 419 Qanbari, S.; Eskandari Nasab, M. P.; Osfoori, R.; HaghNazari, A. 2007. Power of
420 microsatellite markers for analysis of genetic variation and parentage verification in sheep.
421 *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10: 1632-1638.
- 422 Radha, P.; Sivaselvam, S. N.; Kumarasamy, P.; Kumanan, K. 2011. Genetic diversity and
423 bottleneck analysis of Kilakarsal sheep by microsatellite markers. *Indian Journal of*
424 *Biotechnology*, 10: 52-52.

- 425 Ristow, P. G.; D'Amato, M. E., 2017. Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): A
426 streamlined workflow for forensic statistics. *Forensic Science International: Genetics*
427 *Supplement Series*, 6: e52-e54.
- 428 Rousset, F. 2008. Acomplete re-implementation of the GENEPOP software for software for
429 teaching and research. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103–106.
- 430 Selvam, R.; Kathiravan, P. 2019. Genetic diversity and bottleneck analysis of sheep based on
431 microsatellite markers. *Indian Journal of Small Ruminants (The)*, 25: 13-18.
- 432 Sherman, G. B.; Kachman, S. D.; Hungerford, L. L.; Rupp, G. P.; Fox, C. P.; Brown, M. D.;
433 Holm, T. R. 2004. Impact of candidate sire number and sire relatedness on DNA
434 polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous
435 parentage. *Animal Genetics*, 35: 220-226.
- 436 Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele
437 frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- 438 Souza, C. A.; Paiva, S. R.; McManus, C. M; Azevedo, H. C.; Mariante, A. S.; Grattapaglia, D.
439 2012. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of
440 Santa Inês hair sheep in Brazil. *Genetics and Molecular Research*, 11 (2): 1217-1229.
- 441 Van Eenennaam, A. L.; Weaber, R. L.; Drake, D. J.; Penedo, M. C. T.; Quaas, R. L.; Garrick,
442 D. J.; Pollak, E. J. 2007. DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large,
443 commercial cattle ranch setting. *Journal of Animal Science*, 85: 3159-3169.
- 444 Van Oosterhout, C.; Hutchinson, W. F.; Wills, D. P.; Shipley, P. 2004. MICRO-CHECKER:
445 software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular*
446 *Ecology Notes*, 4: 535-538.

- 447 Viana, J. G. A. 2008. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. *Revista Ovinos*,
448 4: 44-47.
- 449 Viana, J. G. A.; de Moraes, M. R. E.; Dorneles, J. P. 2015. Dinâmica das importações de
450 carne ovina no Brasil: análise dos componentes temporais. *Semina: Ciências Agrárias*, 36:
451 2223-2233.
- 452 Weir, B. S.; Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population
453 structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- 454 Weir, B. S.; Ott, J. 1997. Genetic data analysis II. *Trends in Genetics*, 13: 379.
- 455 Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, 16: 97.
- 456 Yilmaz, O. 2016. Power of different microsatellite panels for paternity analysis in sheep.
457 *Animal Science Papers and Reports*, 34: 155-164.
- 458 Zhang, M.; Peng, W. F.; Hu, X. J.; Zhao, Y. X.; Lv, F. H.; Yang, J. 2018. Global genomic
459 diversity and conservation priorities for domestic animals are associated with the economies
460 of their regions of origin. *Scientific Reports*, 8: 1-12.
- 461

462 **FIGURAS E TABELAS**

463 **Tabela 1** - *Locus*, temperatura de anelamento (T_a), concentração do cloreto de magnésio
 464 ($MgCl_2$) utilizado na PCR, tamanho de alelos alcançado nas PCR e as referências.

Marcadores	Primer sequence Forward Reverse	Temp. (°C)	MgCl (mM)	Ciclos	Varição (pb)
MAF065	F: AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG R: CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	60	1,3	30	100-158
MAF209	F: GATCACAAAAAGTTGGATACAACCGTG R: TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG	62	1,3	30	100-154
BM6526	F: CATGCCAAACAATATCCAGC R: TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	55	1,3	30	140-180
OarFCB304	F: CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG R: CGCTGTGTCAACTGGGTCAGGG	55	1	30	160-198
CSRM60	F: AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA R: AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	55	1,5	30	060-092
CSSM66	F: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA R: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	55	1,5	30	12-208
ILSTS11	F: GCT TGC TAC ATG GAA AGT GC R: CTA AAA TGC AGA GCC CTA CC	55	1,5	30	254-294
INRA23	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	58	1	30	190-296
ETH10	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R: CCTCCAGCCCACCTTCTCTTCTC	57	1,5	30	200-242
BM8125	F: CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG R: GGGGGTTAGACTTCAACATACG	57	1,3	30	108-132
MM12	F: CAAGACAGGTGTTTCAATCT R: ATCGACTCTGGGGATGATGT	54	1,3	30	100-144
BM1329	F: TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC R: AACACCGCAGCTTCATCC	53	1,5	30	146-180
BM1818	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	55	1,5	30	248-298
INRA063	F: ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC R: AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	58	1,5	30	150-184
ILSTS87	F: AGCAGACATGATGACTCAGC R: CTGCCTCTTTTCTTGAGAG	55	1,5	30	140-182
INRABERN172	F: CCACTTCCCTGTATCCTCCT R: GGTGCTCCCATTGTGTAGAC	56	2	35	132-192
CSR247	F: GGACTTGCCAGAACTCTGCAAT R: CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG	50	1,5	35	200-264
TGLA122	F: CCCTCCTCCAGGTAATCAGC R: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	52	1,5	30	136-182
ETH225	F: GATCACCTTGCCACTATTTCTT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	50	2	35	130-162
OarFCB48	F: GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC R: GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	58	1,5	30	138-170

465

466

467 **Tabela 2** - Número de alelos (A), Heterozigosidade observada (HO), Heterozigosidade esperada, Conteúdo de informação polimórfica (PIC), Capacidade de discriminação
 468 (DC), probabilidade de identidade (PI), Probabilidade de exclusão quando os pais são desconhecidos (PE), Índice de endogamia (FIS), p-valor do teste de equilíbrio de Hardy-
 469 Weinberg (pHWE), frequência de alelos nulos (nulo), índices de diferenciação genética (F_{ST} , R_{ST} , Dest), R_{ST} permutado (pR_{ST}), p-valor do teste para tamanho do alelo
 470 ($R_{ST} > pR_{ST}$), probabilidade a *posteriori* para o teste de seleção calculado no programa Bayescan.

Locus	A	HO	HE	PIC	DC	PI	PE	F_{IS}	pHWE			Nulo	F_{ST}	Dest	R_{ST}	pR_{ST}	p-valor ($R_{ST} > pR_{ST}$)	Bayescan prob
									Prob	Def	Exc							
MAF065	19	0,910	0,920	0,918	0,939	0,011	0,959	-0,0522	0,000	0,324	0,684	0,005	0,088	0,640	0,168	0,086	0,090	0,974 ± 0,003
MAF209	15	0,870	0,930	0,921	0,967	0,010	0,962	0,0454	0,000	0,000	1,000	0,029	0,028	0,336	0,063	0,027	0,113	0,045 ± 0,004
BM6526	13	0,830	0,900	0,891	0,971	0,018	0,935	0,0587	0,000	0,000	1,000	0,036	0,031	0,202	0,041	0,032	0,319	0,044 ± 0,003
OarFCB304	18	0,930	0,910	0,907	0,936	0,014	0,951	-0,0711	0,000	0,059	0,941	-0,009	0,073	0,402	0,145	0,070	0,129	0,954 ± 0,003
CSRM60	14	0,000	0,900	0,896	0,908	0,017	0,939	1	0,000	0,000	1,000	0,475	0,213	0,765	0,320	0,203	0,169	1,000 ± 0,000
CSSM66	10	0,660	0,880	0,874	0,966	0,025	0,914	0,2262	0,000	0,000	1,000	0,120	0,058	0,385	0,024	0,056	0,759	0,032 ± 0,003
ILSTS11	9	0,550	0,760	0,721	0,896	0,094	0,740	0,2248	0,000	0,000	1,000	0,120	0,102	0,184	0,143	0,080	0,164	1,000 ± 0,000
INRA023	17	0,920	0,880	0,872	0,940	0,025	0,915	-0,0453	0,000	0,000	1,000	-0,020	0,007	0,119	0,018	0,007	0,177	0,995 ± 0,001
ETH10	13	0,860	0,880	0,871	0,962	0,024	0,921	-0,0094	0,000	0,078	0,922	0,009	0,044	0,350	0,109	0,041	0,024	0,065 ± 0,003
BM8125	12	0,850	0,890	0,880	0,962	0,022	0,923	0,0117	0,000	0,000	1,000	0,019	0,046	0,298	0,059	0,045	0,308	0,029 ± 0,001
MM12	10	0,610	0,800	0,782	0,933	0,057	0,836	0,2275	0,000	0,000	1,000	0,103	0,014	0,050	0,023	0,012	0,262	0,924 ± 0,012
BM1329	10	0,680	0,830	0,815	0,953	0,044	0,866	0,0885	0,000	0,000	1,000	0,082	0,148	0,399	0,230	0,125	0,158	0,044 ± 0,002
BM1818	22	0,900	0,930	0,925	0,981	0,009	0,966	0,0341	0,000	0,256	0,744	0,014	-0,004	-0,103	0,009	-0,004	0,108	1,000 ± 0,000
INRA063	12	0,830	0,890	0,880	0,965	0,022	0,925	0,0305	0,000	0,001	1,000	0,030	0,054	0,294	0,159	0,052	0,055	0,052 ± 0,003
ILSTS087	12	0,900	0,890	0,882	0,970	0,021	0,926	-0,005	0,000	0,702	0,298	-0,004	-0,002	-0,064	0,006	-0,002	0,213	1,000 ± 0,000
INRABERN172	36	0,880	0,910	0,903	0,976	0,015	0,949	0,0092	0,000	0,009	0,991	0,017	0,044	0,330	0,100	0,038	0,076	0,025 ± 0,002
CSRD247	29	0,900	0,930	0,929	0,983	0,009	0,969	0,0219	0,000	0,018	0,983	0,016	0,020	0,152	0,000	0,015	0,725	0,981 ± 0,005
TGLA122	12	0,860	0,900	0,891	0,958	0,019	0,934	0,0262	0,000	0,001	0,999	0,022	0,034	0,260	0,077	0,032	0,115	0,066 ± 0,004
ETH225	14	0,860	0,900	0,891	0,969	0,018	0,937	0,0245	0,000	0,117	0,883	0,021	0,033	0,263	0,118	0,033	0,026	0,051 ± 0,002
OarFCP48	11	0,870	0,890	0,882	0,955	0,022	0,924	0,0211	0,000	0,653	0,347	0,012	0,011	0,118	0,060	0,011	0,033	0,998 ± 0,002
Média	308	0,780	0,890	0,877	0,954	1,5E-34	1,000	0,0851					0,053	0,169	0,096	0,038	0,005	

471 **Tabela 3** - Análise do perfil de variabilidade genética de rebanhos de ovinos da raça Santa
 472 Inês criados na sub-região Meio-Norte do Brasil.

Parâmetros	Fazenda 1	Fazenda 2	Fazenda 3	Fazenda 4	Fazenda 5	Fazenda 6
Ar	4,690	3,990	4,190	4,190	4,170	3,760
Ho	0,810	0,730	0,790	0,750	0,760	0,750
He	0,890	0,790	0,810	0,810	0,800	0,700
PIC	0,882	0,832	0,791	0,785	0,777	0,653
F_{IS}	0,088	0,066	0,029	0,078	0,052	-0,072
Prob	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
HWE Def	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,103
Exc	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,897
Nulos	6	6	4	7	4	Nf
PvAr	20,924	13,474	12,512	10,495	11,087	9,538

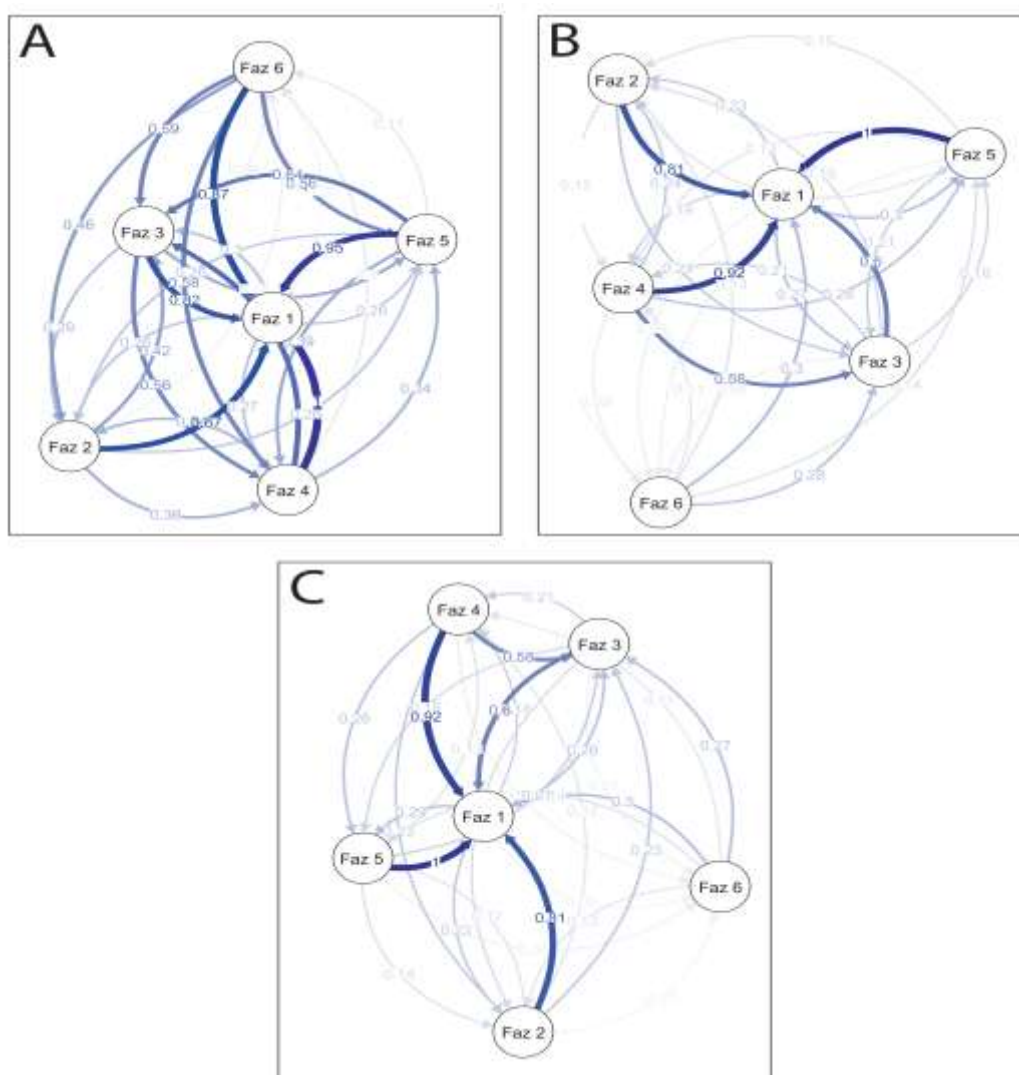
473 Fazenda 1 (José de Freitas, Piauí), Fazenda 2 (Santa Inês, Maranhão), Fazenda 3 (José de Freitas, Piauí),
 474 Fazenda 4 (Floriano, PI), Fazenda 5 (Campo Maior, Piauí), Fazenda 6 (Campo Maior, Piauí). Riqueza alélica
 475 (Ar), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica
 476 (PIC), índice de endogamia (F_{IS}), frequência de alelos nulos (Nulos) e Riqueza alélica privada (PvAr)..HWE –
 477 Equilíbrio de Hardy-Weinberg; Nf – não foi feito.

478 **Quadro 1.** Teste Wilcoxon sign-rank para o excesso de heterozigotos em seis rebanhos da raça Santa Inês criados na sub-região Meio-Norte do
479 Brasil.

População	L	N (\pm SE)	He (\pm SE)	Teste Wilcoxon sign-rank											
				IAM				TPM				SMM			
				Heq	Obs LHexc	Exp LHexc	p-valor	Heq	Obs LHexc	Exp LHexc	p-valor	Heq	Obs LHexc	Exp LHexc	p-valor
Fazenda 1	20	117,250 \pm 9,391	0,895 \pm 0,026	0,756 \pm 0,072	20	12	0,000	0,864 \pm 0,042	18	12	0,000	0,876 \pm 0,038	17	12	0,001
Fazenda 2	20	44,050 \pm 5,206	0,794 \pm 0,166	0,719 \pm 0,140	17	12	0,001	0,809 \pm 0,119	13	12	0,273	0,819 \pm 0,117	12	12	0,594
Fazenda 3	20	24,300 \pm 2,080	0,830 \pm 0,100	0,776 \pm 0,117	16	12	0,000	0,837 \pm 0,099	13	12	0,493	0,844 \pm 0,096	11	12	0,663
Fazenda 4	20	17,250 \pm 1,333	0,833 \pm 0,104	0,770 \pm 0,137	19	12	0,000	0,822 \pm 0,120	14	12	0,027	0,827 \pm 0,119	12	12	0,115
Fazenda 5	20	16,300 \pm 1,455	0,827 \pm 0,122	0,773 \pm 0,137	18	12	0,000	0,823 \pm 0,120	12	12	0,226	0,828 \pm 0,119	11	12	0,406
Fazenda 6	20	5,250 \pm 0,910	0,774 \pm 0,164	0,766 \pm 0,149	15	11	0,024	0,766 \pm 0,149	13	13	0,045	0,769 \pm 0,149	13	13	0,062

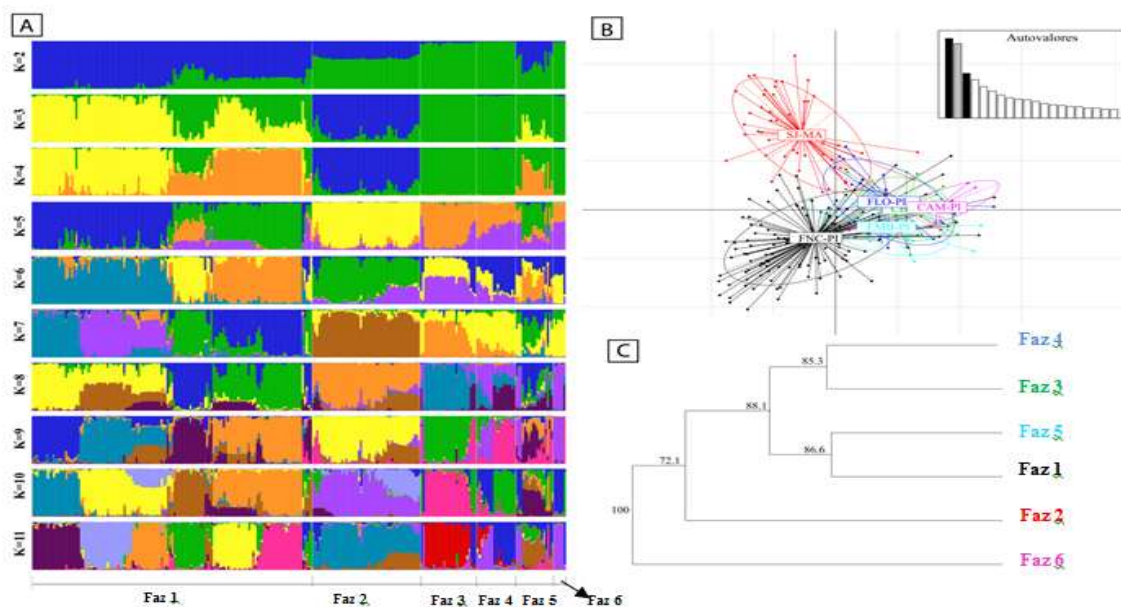
480 Fazenda1(José de Freitas, Piauí), Fazenda 2(Santa Inês, Maranhão), Fazenda 3(José de Freitas, Piauí), Fazenda 4(Floriano, Piauí), Fazenda 5(Campo Maior, Piauí) e Fazenda
481 6(Campo Maior, Piauí). Número de *loci* polimórficos (L). Média do número de indivíduos amostrados por *locus* (N). Erro padrão (SE), heterozigosidade esperada no cenário
482 em que os rebanhos estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (He), modelo de mutação de infinitos alelos (IAM), modelo de mutações aos passos (SMM), modelo de
483 mutações em duas fases (TPM), heterozigosidade no cenário em que há equilíbrio de mutação-deriva (Heq), número de *loci* com excesso de heterozigosidade, ou seja, He
484 >Heq (LHex).

485



486

487 **Figura 1** - Estimativa do fluxo genético entre rebanhos de ovinos da raça Santa Inês, usando
 488 como base os estimadores D' Jost (A), G_{ST} (B) e N_m (C) com a função `divmigrate` do pacote R
 489 `diveRsity`. Faz1 (José de Freitas, Piauí), Faz 2 (Santa Inês, Maranhão), Faz 3 (José de Freitas,
 490 Piauí), Faz 4 (Floriano, PI), Faz 5 (Campo Maior, Piauí), Faz 6 (Campo Maior, Piauí). Quanto
 491 mais espessa e mais escuras as setas, maior a proporção relativa.



492

493 **Figura 2** - Análise Bayesiana de agrupamento gerado no programa STRUCTURE (A),
 494 análise de coordenadas principais PCoA (B) e dendrograma gerado a partir da distância de
 495 Nei usando o método de agrupamento UPGMA (correlação cofenética igual a 85 %) (C). Faz
 496 1 (José de Freitas, Piauí), Faz 2 (Santa Inês, Maranhão), Faz 3 (José de Freitas, Piauí), Faz 4
 497 (Floriano, PI), Faz 5 (Campo Maior, Piauí), Faz 6 (Campo Maior, Piauí).

CAPÍTULO II - Eficácia de diferentes painéis de microssatélite para estimar parentesco em ovinos Santa Inês

1 **Eficácia de diferentes painéis de microssatélite para estimar parentesco em ovinos Santa**
 2 **Inês**

3 Alzira Regina Silva de Deus^a, Geice Ribeiro Silva^b, Luciano Silva Sena^b, Fábio Barros Britto^c,
 4 Débora Araújo de Carvalho^a, Jorge Victor Gomes de Freitas^d, José Lindenberg Rocha Sarmiento^e

5 ^aPrograma de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí,
 6 Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

7 ^bDoutor em Ciência Animal

8 ^cDepartamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário
 9 Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

10 ^dMedicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário Ministro
 11 Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

12 ^eDepartamento de Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, Campus Universitário
 13 Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

14 *Autor correspondente <alziraregina@hotmail.com>; <sarmiento@ufpi.edu.br>

15 **Highlights**

- 16 • Estimadores de verossimilhança foram mais adequados para estimar relações de
- 17 parentesco
- 18 • Rebanhos pertencentes à região Meio Norte do Brasil apresentam muitos indivíduos
- 19 aparentados
- 20 • Marcadores microssatélite são viáveis para estimar parentesco em ovinos Santa Inês
- 21 • Painéis com reduzido número de microssatélites apresentam acurácia semelhante à painel
- 22 SNP para análise de parentesco

23 **RESUMO**

24 A criação de ovinos tem se expandido e tem contribuído para o desenvolvimento agropecuário,
 25 principalmente no ramo da produção de carne. Contudo, a ovinocultura está vulnerável à perda

26 de características importantes devido a acasalamentos sem o devido controle de pedigree
27 realizados pelos criadores. Dessa forma, visando contribuir com programas de melhoramento e
28 conservação de recursos genéticos, bem como fornecer informações acuradas para rebanhos com
29 baixo nível de controle de pedigrees, objetivou-se avaliar e comparar painéis de marcadores
30 microssatélites e testar sua eficiência utilizando como base um painel denso de SNPs (54 mil
31 marcadores) na determinação de parentesco de ovinos da raça Santa Inês. Foram recolhidas
32 informações de 257 ovinos de seis fazendas do Piauí e Maranhão para extração de DNA. O
33 programa Coancestry foi utilizado para definir o estimador que mais se adequava aos dados. O
34 pacote estatístico RELATED no R foi utilizado para calcular as estimativas de parentesco. O
35 painel Ovine SNP50 BeadChip da Illumina foi utilizado para genotipar os animais e a matriz de
36 parentesco G foi obtida no software PREGSF90. Utilizou-se 4 painéis microssatélite, contendo
37 10,12, 15 e 19 loci. A comparação entre os parentescos obtidos com SNPs e microssatélites, com
38 os painéis diferentes, foi realizada a partir de análises descritivas e de correlação de Pearson
39 entre os valores de parentesco estimados com ambos os marcadores. Foi possível estimar
40 relações entre pares de irmãos completos, meio irmãos, pai-filho e não relacionados nos quatro
41 painéis de microssatélite, porém painéis com menos de 15 marcadores apresentaram menor
42 eficiência. A maioria dos pares de indivíduos apresentou-se na categoria de não relacionados e
43 meio irmãos. Nas seis fazendas estudadas muitos dos pares de indivíduos apresentaram algum grau
44 de parentesco, indicando que está acontecendo muitos acasalamentos entre indivíduos
45 aparentados. Os resultados demonstraram que os painéis de microssatélite estimaram parentesco
46 altamente correlacionado com os estimados com o painel SNP, com valores de correlação acima

47 de 0,89, indicando que um reduzido número de microssatélites é capaz de estimar as relações de
48 parentesco muito próximas as estimadas com SNPs.

49 **Palavras-chave:** coancestry, conservação de recursos genéticos, endogamia, estimadores de
50 parentesco, melhoramento genético, Microssatélites.

51 **1. Introdução**

52 A espécie ovina está presente em praticamente todos os continentes, contando com rebanho
53 mundial de 1,2 bilhão de cabeças (FAOSTAT, 2018). No Brasil, a ovinocultura está em
54 expansão e, segundo o último censo agropecuário, o rebanho brasileiro possui aproximadamente
55 18 milhões de cabeça (IBGE, 2017). O principal fator desse crescimento é o aumento na
56 produção de carne, que atualmente é estimado em 120 mil toneladas por ano, tornando a criação
57 de ovinos mais uma alternativa de investimento no meio agropecuário (Gois et al., 2018).
58 Contudo, ainda é necessário importação da carne ovina para suprir a demanda interna.

59 A raça Santa Inês apresenta características que contribuem para resultados positivos da
60 ovinocultura no país, tais como: adaptação ao clima; bom potencial de crescimento; boa
61 produção de leite; grande porte, com média de peso para machos de 80 a 120 Kg e para as
62 fêmeas de 60 a 90 Kg; excelente qualidade de carne e baixo teor de gordura. Estes fatores
63 despertaram interesses de criadores por proporcionarem lucros significativos (Alves et al., 2016;
64 ARCO, 2019).

65 Apesar dos números expressivos na produção de ovinos Santa Inês, ainda não há algum
66 programa efetivo de melhoramento genético e conservação da diversidade genética para esta raça
67 (Rego Neto et al., 2018). Além disso, problemas como erros de pedigree e seleção baseada

68 apenas em informações fenotípicas tornam esta raça vulnerável à perda de características
69 importantes, tanto para a sua conservação como para o aumento em seu desempenho a partir de
70 programas de melhoramento genético (Sena et al., 2016; Amorim et al., 2018).

71 Um fato que pode auxiliar no manejo genético, em rebanhos com controle de pedigree
72 deficitário, é o conhecimento das relações de parentesco, que podem ser obtidas através da
73 utilização de marcadores genéticos a partir do cálculo das frequências alélicas apresentadas por
74 cada indivíduo, levando em consideração que alelos de indivíduos aparentados são idênticos por
75 descendência (IBD) (Thompson, 2013).

76 Estudos têm mostrados que marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) são uma
77 ferramenta poderosa para análise de parentesco (Bolormaa et al., 2008; Panetto et al., 2017).
78 Estando presente em presente em todo o genoma, os SNPs apresentam alto poder informativo
79 para predição de valores genômicos e tem baixas taxas de mutações e de erros de genotipagem
80 (Tokarska et al., 2009; Yu et al., 2015). Todavia, devido a sua natureza bialélica, para análises de
81 parentesco é requerido um grande número de SNPs (Morin et al., 2004; Kling et al., 2012),
82 aumentando assim os custos e dificuldades técnicas para sua utilização.

83 Nesse sentido, os microssatélites são também requisitados para análises de parentesco por
84 sua fácil utilização e alto polimorfismo. Caracterizam-se por serem sequências simples de um a
85 seis pares de bases repetidas em *tandem* ao longo do DNA. Esse marcador é bem distribuído no
86 genoma e sua natureza codominante facilita seu uso para estudos de populações, sendo uma
87 ferramenta eficiente para estimar relações de parentesco (Wang et al., 2017).

88 Diante disso, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o poder de diferentes números de
89 marcadores microssatélites, comparados a um painel de alta densidade de SNPs, para inferir

90 relações de parentesco em ovinos da raça Santa Inês, a fim de auxiliar em programas de
91 conservação de recurso genético e melhoramento animal em rebanhos com baixo nível de
92 controle de pedigree.

93 **2. Material e Métodos**

94 Os experimentos foram realizados de acordo com os regulamentos para experimentação
95 com animais vivos estabelecidos pelo protocolo da Comissão de Ética no Uso de Animais
96 (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, com número 337/17.

97 *2.1. Estrutura populacional*

98 Foram coletadas informações de 257 animais pertencentes a seis diferentes fazendas
99 localizadas na sub-região Meio-Norte do Brasil, que contempla os estados do Piauí (PI) e
100 Maranhão (MA). As análises foram realizadas utilizando todos os indivíduos como sendo uma
101 população (POP 1) e como populações separadas de acordo com a origem dos indivíduos. Sendo
102 assim: 135 indivíduos da POP 2 e 27 da POP 4 eram oriundos do município de José de Freitas-
103 PI; 52 indivíduos oriundos do município de Santa Inês-MA (POP 3); 19 de Floriano-PI (POP 5);
104 e 18 indivíduos das população 6 (POP 6) e 6 da população 7 (POP 7) oriundos de Campo Maior-
105 PI. Todos os animais eram registrados junto à Associação Brasileira de Criadores de Ovinos
106 (ARCO) ou pertencentes ao núcleo de conservação de ovinos da Embrapa Meio-Norte (Campo
107 Maior, Piauí).

108 2.2. Coleta de material biológico e Extração de DNA

109 Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular em tubos para coleta de
110 sangue (Vacutainer®) de 4.5mL, contendo anticoagulante EDTA. As amostras foram mantidas
111 sob refrigeração até a realização da extração do DNA.

112 Para a realização da extração de DNA, foram utilizados 300µL de sangue de cada
113 indivíduo. O método de extração de DNA seguiu o protocolo do Kit *DNeasy Blood & Tissue* da
114 QIAGEN.

115 A qualidade do DNA extraído foi verificada após corrida de eletroforese em gel de
116 agarose 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio e a visualização ocorreu em um
117 transiluminador UV. A concentração do DNA também foi verificada por comparação com o
118 padrão *Lambda* DNA em concentrações conhecidas. O DNA obtido após extração foi estocado
119 em freezer a -20°C até serem executados os demais procedimentos. Todos os ensaios foram
120 realizados no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Zootecnia da UFPI.

121 2.3. Amplificação e genotipagem de marcadores microssatélites

122 Foram utilizados vinte *loci* (Tabela 1) recomendados pela FAO (Food and Agricultural
123 Organization) para amplificação do DNA utilizando a técnica de Reação em Cadeia da
124 Polimerase (PCR). As reações foram executadas em um volume total de 16 µl, contendo: 2,5
125 mM dNTPs, 1 X de tampão Tris-HCl/KCl, 1,0– 2,0 mM MgCl₂, 1,25 µM de cada *primer*, 1
126 unidade de Taq DNA Polimerase, água deionizada e 3 µl de DNA extraído (3 ng/µl). Todas as
127 amplificações foram corridas em termociclador PCR 2720, usando ciclos e temperaturas
128 descritos na Tabela 1. A programação adotada no termociclador foi de 94°C por 5 min, seguido
129 por 30 a 35 ciclos de 94°C por 45 s para denaturação, 50 a 62°C por 45 s para anelamento, 72°C

130 por 50 s para extensão, seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 min. Os produtos de
131 amplificação foram visualizados em gel de poliacrilamida não-desnaturante a 6 %, corados em
132 solução de nitrato de prata (1,5 mg/ml) com formaldeído (0,4 % v/v) e revelados por NaOH
133 (0,015 g/ml) com formaldeído (0,4 % v/v), modificado de Benbouza et al. (2006). Os fragmentos
134 foram registrados em uma planilha, a fim de se obter uma base de dados de frequência alélica.

135 **Tabela 1** - *Locus*, sequencia direta e reversa, temperatura de anelamento (Ta), concentração do
 136 cloreto de magnésio (MgCl₂) utilizado na PCR, tamanho de alelos alcançado nas PCR e as
 137 referências.

Marcadores	Primer sequence		Temp. (°C)	MgCl (mM)	Ciclos	Variação (pb)
	Forward	Reverse				
MAF065	F: AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG	R: CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG	60	1,3	30	100-158
MAF209	F: GATCACAAAAAGTTGGATACAACCGTG	R: TCATGCACTTAAGTATGTAGGATGCTG	62	1,3	30	100-154
BM6526	F: CATGCCAAACAATATCCAGC	R: TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	55	1,3	30	140-180
OarFCB304	F: CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG	R: CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG	55	1	30	160-198
CSRM60	F: AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA	R: AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	55	1,5	30	060-092
CSSM66	F: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	R: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	55	1,5	30	12-208
ILSTS11	F: GCT TGC TAC ATG GAA AGT GC	R: CTA AAA TGC AGA GCC CTA CC	55	1,5	30	254-294
INRA23	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	R: TAACTACAGGGTGTAGATGAACTC	58	1	30	190-296
ETH10	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	R: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	57	1,5	30	200-242
BM8125	F: CTCTATCTGTGAAAAGGTGGG	R: GGGGGTTAGACTTCAACATACG	57	1,3	30	108-132
MM12	F: CAAGACAGGTGTTTCAATCT	R: ATCGACTCTGGGGATGATGT	54	1,3	30	100-144
BM1329	F: TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC	R: AACACCGCAGCTTCATCC	53	1,5	30	146-180
BM1818	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG	R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	55	1,5	30	248-298
INRA063	F: ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC	R: AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	58	1,5	30	150-184
ILSTS87	F: AGCAGACATGATGACTCAGC	R: CTGCCTCTTTTCTTGAGAG	55	1,5	30	140-182
INRABERN172	F: CCACTTCCCTGTATCCTCCT	R: GGTGCTCCCATTGTGTAGAC	56	2	35	132-192
CSR247	F: GGAAGTGGCCAGAACTCTGCAAT	R: CACTGTGGTTTGTATTAGTCAGG	50	1,5	35	200-264
TGLA122	F: CCCTCCTCCAGGTAATCAGC	R: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC	52	1,5	30	136-182
ETH225	F: GATCACCTTGCCACTATTTCTT	R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	50	2	35	130-162
OarFCB48	F: GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC	R: GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	58	1,5	30	138-170

138 2.4. Análise dos dados dos microssatélites

139 Inicialmente, o programa MicroChecker v. 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) foi
140 utilizado para verificar possíveis erros de genotipagem e a possível presença de alelos nulos. O
141 programa Cervus v.3.0.3 (Marshall et al., 1998) foi utilizado para calcular as frequências alélicas
142 em cada *locus* e o conteúdo de informação polimórfica (PIC). O PIC é uma medida de
143 informatividade relacionada à heterozigosidade esperada e, da mesma forma, é calculada a partir
144 das frequências alélicas (Botstein et al., 1980), onde valores superiores a 0,5 são considerados
145 muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores
146 a 0,25, pouco informativos.

147 Para estimar parentesco utilizando marcadores moleculares, o coeficiente de parentesco
148 (r) pode ser calculado a partir de dados de genotipagem e frequência alélica. O coeficiente de
149 parentesco mede a proporção esperada de alelos compartilhados entre pares de indivíduos
150 idênticos por descendência (IBD) (Blouin, 2003). Sabendo que existem inúmeros estimadores de
151 parentesco e que não existe um estimador universal para todos os tipos de dados, utilizou-se o
152 programa COANCESTRY versão 1.0.1 (Wang, 2011) para propor o melhor estimador de
153 parentesco entre o estimador de probabilidade triádica (TrioML) (Wang, 2007), Wang (Wang,
154 2002), LynchLi (Lynch, 1988; Li et al., 1993), LynchRd (Lynch and Ritland, 1999), Ritland
155 (Ritland, 1996), QuellerGt (Queller and Goodnight, 1989), e o estimador de probabilidade
156 diádica (DyadML) (Milligan, 2003; Wang, 2007).

157 Todos esses estimadores inferem o parentesco assumindo indivíduos consanguíneos,
158 possíveis erros de genotipagem e presença de alelos nulos. Para tanto, pares de indivíduos
159 haplóide-haplóide ($\Delta_1=0$) ou diplóide-haplóide ($\Delta_2=2$) assumem quatro grupos de parentesco a

160 partir da fórmula: $r = \Delta_1/2 + \Delta_2$. Os grupos de parentesco assumem valores de parentesco de 0,0
161 para indivíduos não relacionados (NR), 0,25 para indivíduos meio irmãos (MI), 0,5 para
162 indivíduos que são irmãos completos (IC), ou seja, apresentam pai e mãe em comum e 0,5, para
163 relação pai-filho (PF) (Wang, 2006). Embora resultem na mesma relação de 0,5, os padrões de
164 compartilhamento de alelos IBD são diferentes entre os relacionamentos PF e IC, sendo que uma
165 díade de PF deve compartilhar pelo menos um alelo em um local, ou seja, a variação da relação
166 entre *loci* é menor para PF, enquanto uma díade de IC pode compartilhar 0, 1 ou 2 alelos.

167 Dessa forma, inicialmente realizamos simulação com os dados de genótipo e frequências
168 alélicas de todos os indivíduos. A seleção do estimador se deu com base em um *True value* =1,
169 onde o estimador que mais se aproximar desse valor é considerado o melhor para o contexto da
170 população proposta. A confiança dos valores obtidos é de 95% (Wang, 2011).

171 Após saber o melhor estimador de parentesco, o pacote RELATED (Pew et al., 2015) do
172 R foi utilizado para criar gráfico com os valores de parentesco dos 257 animais genotipados, bem
173 como do parentesco para as diferentes fazendas analisadas. O pacote RELATED consiste em um
174 pacote que estima a relação de parentesco usando as mesmas abordagens disponíveis no
175 COANCESTRY, sendo possível realizar análises de marcadores moleculares codominantes
176 como o microssatélite. Para tanto, inicialmente os dados foram inseridos no R pela função
177 readgenotypedata. A função familysim foi então utilizada para gerar os pares de indivíduos para
178 cada grau de parentesco. Em seguida, utilizou-se a função coancestry para realizar as estimativas
179 pontuais de parentesco usando o estimador DyadML, que se mostrou melhor nas análises
180 realizadas no programa coancestry. Por fim, foram gerados os gráficos para visualização dos
181 valores de parentesco para cada grau de relação esperada.

182 Todas essas análises foram realizadas em painéis contendo 10, 12, 15 e 19 *loci*
 183 microssatélite (Tabela 2). Os marcadores de cada painel foram selecionados com base nos
 184 resultados do conteúdo de informação polimórfica e possível presença de alelos nulos, sendo
 185 mantidos nos painéis de menor tamanho apenas os marcadores que apresentaram melhores
 186 resultados nestes quesitos. O desempenho de cada painel nas estimativas de parentesco foi
 187 avaliado graficamente e, além disso, comparou-se as médias de todos os valores de parentesco
 188 gerado nos quatro painéis.

189 **Tabela 2** - Lista dos marcadores utilizados nos quatro diferentes painéis de microssatélite. Com
 190 o Painel 1 contendo 10 marcadores, o Painel 2 com 12 marcadores, o Painel 3 com 15
 191 marcadores e o Painel 4 com 19.

Painel 1	Painel 2	Painel 3	Painel 4
MAF065	MAF065	MAF065	MAF065
BM6526	BM6526	BM6526	MAF209
INRA23	INRA23	OarFCB304	BM6526
ETH10	ETH10	INRA23	OarFCB304
BM8125	BM8125	ETH10	CSSM66
BM1818	BM1818	BM8125	ILSTS11
ILSTS87	ILSTS87	BM1818	INRA23
INRABERN172	INRABERN172	ILSTS87	ETH10
CSRD247	CSRD247	INRABERN172	BM8125
OarFCP48	TGLA122	CSRD247	MM12
	ETH225	TGLA122	BM1329
	OarFCP48	ETH225	BM1818
		OarFCP48	INRA063
		INRA063	ILSTS87
		OarFCP48	INRABERN172
			CSRD247
			TGLA122
			ETH225
			OarFCP48

192 2.5. Análise dos dados de SNPs

193 Para análise do parentesco com os marcadores SNPs foi criada a matriz G (matriz de
 194 parentesco genômico) com os mesmos 257 indivíduos analisados com microsatélite. Para tanto,
 195 utilizou-se o painel Ovine SNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA). Este painel
 196 contém 54.241 SNPs uniformemente espaçados nos cromossomos do genoma ovino.
 197 Inicialmente, foi realizado o controle de qualidade dos SNPs utilizado o software PREGSF90
 198 (Misztal et al., 2018), que removeu marcadores que apresentaram *Call rate* menor que 0,9, ou
 199 seja, com taxa de genotipagem menor que 90%, marcadores monomórficos, SNPs que se
 200 encontravam em posição desconhecida, ou localizados em DNA mitocondrial e nos
 201 cromossomos sexuais, SNPs com Frequência Alélica Menor que 0,01 (MAF – *Minor Allele*
 202 *Frequency*) e que desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE, $p < 10^{-6}$). Após o controle
 203 de qualidade, restaram para análise de parentesco 47.069 SNPs.

204 A matriz G foi montada de acordo com Van Raden (2008), seguindo o seguinte modelo:

$$\mathbf{G} = \frac{\mathbf{ZDZ}'}{2 \sum_{i=1}^m p_i(1 - p_i)}$$

205 Onde: \mathbf{Z} =matriz que relaciona os genótipos de cada *locus*

206 \mathbf{D} =matriz diagonal de pesos para variâncias de SNPs

207 p_i = frequência do alelo menos frequente (*minorallelefrequency*) do SNP *i*.

208 Para verificar o parentesco real gerado com os dados de SNP e microsatélite e inferir o
 209 desempenho de cada painel, criou-se gráficos de distribuição dos valores de parentesco estimado
 210 com os SNPs e com os quatro painéis de microsatélite. Realizou-se o cálculo de correlação de

211 Pearson entre os parentescos estimados com os SNPs e com os diferentes painéis de
212 microssatélite para medir a associação entre os valores estimados entre as diferentes abordagens.

213 **3. Resultados**

214 *3.1. Análise Geral dos dados*

215 Observou-se presença de alelos nulos, a partir de estimativas que levam em consideração
216 o equilíbrio de Hardy-Weinberg e deficiência em heterozigotos (Brookfield, 1996) em 10
217 marcadores quando analisados todos os 257 indivíduos. Entretanto, quando as análises foram
218 realizadas nas diferentes fazendas o número de marcadores com presença de alelos nulos
219 diminuiu. Não foi possível estimar a presença de alelos nulos na POP 7 devido ao seu baixo
220 tamanho amostral. O *locus* CSRM60 apresentou alelos nulos em todas as populações com uma
221 frequência maior que 0,4, enquanto que o ETH225 apresentou alelos nulos apenas quando
222 presente em todos os indivíduos. Além disso, em todas as análises, com exceção do *locus*
223 CSRM60, as frequências de alelos nulos foram menores que 0,2, que segundo Dakin and Avise
224 (2004), frequências de alelos nulos menores que 0,2 não interferem na qualidade do marcador
225 para análise de parentesco. Desta forma, apenas o marcador CSRM60 foi excluído para análise
226 de parentesco por apresentar frequência de alelos nulos alta ($> 0,2$).

227 As análises de desempenho dos marcadores indicaram que todos se desviaram do
228 equilíbrio de Hardy-Weinberg. O número de alelos variou de 9 no *locus* ILSTS11 a 36 no *locus*
229 INRABERN172, sendo que todas as amostras geraram 308 alelos no total. Todos os marcadores
230 demonstraram-se altamente polimórficos, com valores de PIC mínimo de 0,72 (ILST11),
231 máximo 0,93 (BM1818) e média de $0,88 \pm 0,05$. A heterozigosidade esperada (H_e) variou de

232 0,76 (ILST11) a 0,93 (CSR247) e média de $0,89 \pm 0,21$. Já a heterozigosidade observada (H_o)
233 mostrou-se 0,0 no *locus* CSRM60) e de 0,930 no *locus* OarFCB304 com média de $0,78 \pm 0,04$.

234 3.2. Análise de parentesco com microssatélite

235 Utilizando o Painel 4, a simulação de todos os indivíduos indicou os estimadores TrioML
236 e DyadML como melhores para análise do parentesco real, com média de 0,34 e 0,35
237 respectivamente, estando mais próximo do *true value* de 1. Além disso, esses dois estimadores
238 apresentaram-se altamente correlacionados (0,99). O estimador que apresentou média mais baixa
239 para relação de parentesco foi o Ritland (0,31), apresentando também o menor coeficiente de
240 correlação com o estimador DyadML (Tabela 3). As simulações com os indivíduos separados
241 por fazendas também apontaram o DyadML como melhor estimador, seguido do TrioML.

242 **Tabela 3** - Médias e variância das estimativas de parentesco e correlação entre os 7 estimadores
 243 na POP 1 de ovinos Santa Inês

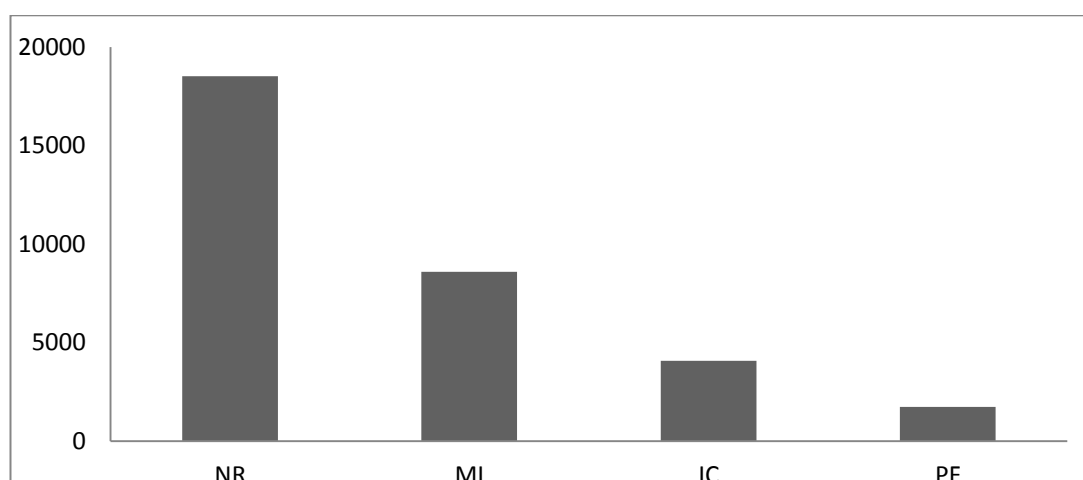
	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
Média	0,34	0,32	0,32	0,32	0,31	0,32	0,35
Variância	0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,03	0,03
Correlação	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML
TrioML	1						
Wang	0,97	1					
LynchLi	0,98	0,98	1				
LynchRd	0,91	0,90	0,90	1			
Ritland	0,87	0,84	0,85	0,94	1		
QuellerGt	0,98	0,97	0,99	0,90	0,86	1	
DyadML	0,99	0,97	0,98	0,92	0,87	0,98	1

244

245 Quando utilizado o Painel 4 na POP 1, os pares de indivíduos foram agrupados em quatro
 246 categorias de acordo com os valores de parentesco médio, sendo pares de meio irmãos (MI) $r=$
 247 0,25, não relacionados (NR) $r= 0,0$, irmãos completos (IC) $r=0,5$ e pai-filho (PF) $r = 0,5$. A
 248 relação pareada mínima foi de 0, a máxima de 0,81 e a média de 0,35.

249 Indivíduos pertencentes ao grupo IC ($r = 0,23-0,81$) ou MI ($r = 0,04-0,51$) apresentaram
 250 valores de r mais variados, enquanto que indivíduos não relacionados ($r = 0,0-0,22$) e pai-filho (r
 251 $= 0,5-0,76$) mostraram valores de r próximo ao esperado. A maioria das relações entre os pares
 252 de indivíduos apresentou-se na categoria de não relacionados e meio irmão. Além disso, boa
 253 parte apresentou-se como irmãos completos. Contudo, pares de pai e filho foram menos
 254 evidentes (Figura 1). Informações semelhantes foram observadas quando se analisou as
 255 populações separadamente, tendo um aumento no número de pares de indivíduos que eram
 256 irmãos completos. Esse resultado sugere que boa parte dos indivíduos está intimamente

257 relacionada e que estão acontecendo muitos acasalamentos entre indivíduos com ancestrais em
258 comuns, o que pode levar esses rebanhos a terem perdas genéticas por consequência da
259 endogamia.



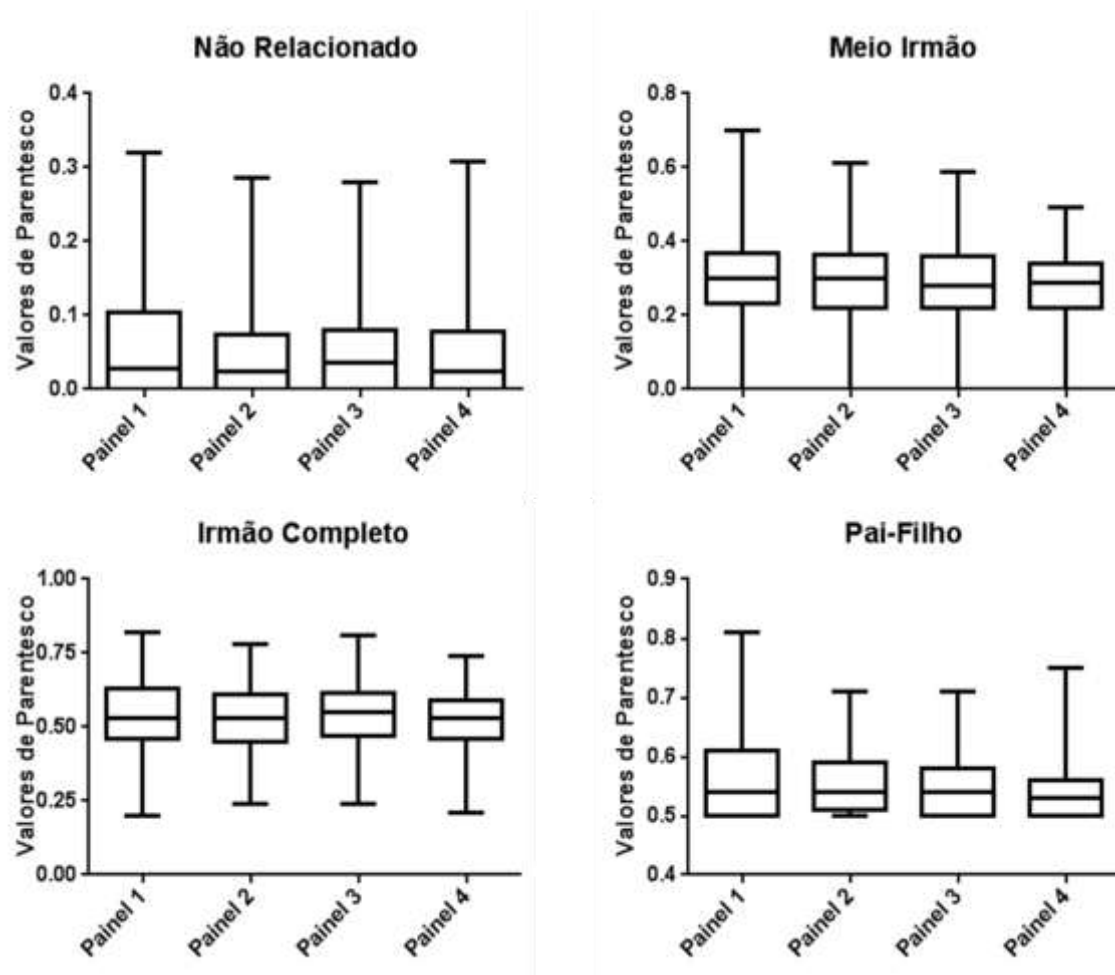
260

261 **Figura 1-** Número de pares de indivíduos que se apresentaram em cada categoria de
262 relacionamento. MI: Meio irmãos; NR: não relacionados; IC: irmãos completos; PF: pai-filho.

263 Ao se analisar diferentes painéis de microssatélite (10, 12, 15 e 19 *loci*) para as mesmas
264 análises de parentesco com os 257 indivíduos genotipados, observou-se que todos os quatro
265 foram capazes de estimar os grau de parentesco, entretanto, o Painel com 10 marcadores não
266 demonstrou nível de confiança elevado. Os parentescos estimados com uso do Painel 1
267 apresentaram maior variação em torno dos valores de parentesco esperados, enquanto os painéis
268 2, 3 e 4 apresentaram valores de r mais próximo do esperado para cada grau de parentesco
269 (Figura 2).

270 Os parentescos genômicos médios foram similares nos quatro painéis testados, sendo de
271 0,08 para o Painel 1, 0,07 para o Painel 2, 0,07 para o Painel 3 e 0,06 para o Painel 4. Esses

272 valores eram esperados, pois a grande maioria dos pares de indivíduos apresentaram-se como
 273 não relacionados. Isso mostra que um reduzido número de marcadores de microssatélite pode
 274 reproduzir resultados confiáveis, uma vez que um painel com 12 marcadores microssatélites
 275 evidenciou resultados semelhantes a um painel com 19 marcadores (Figura 2).



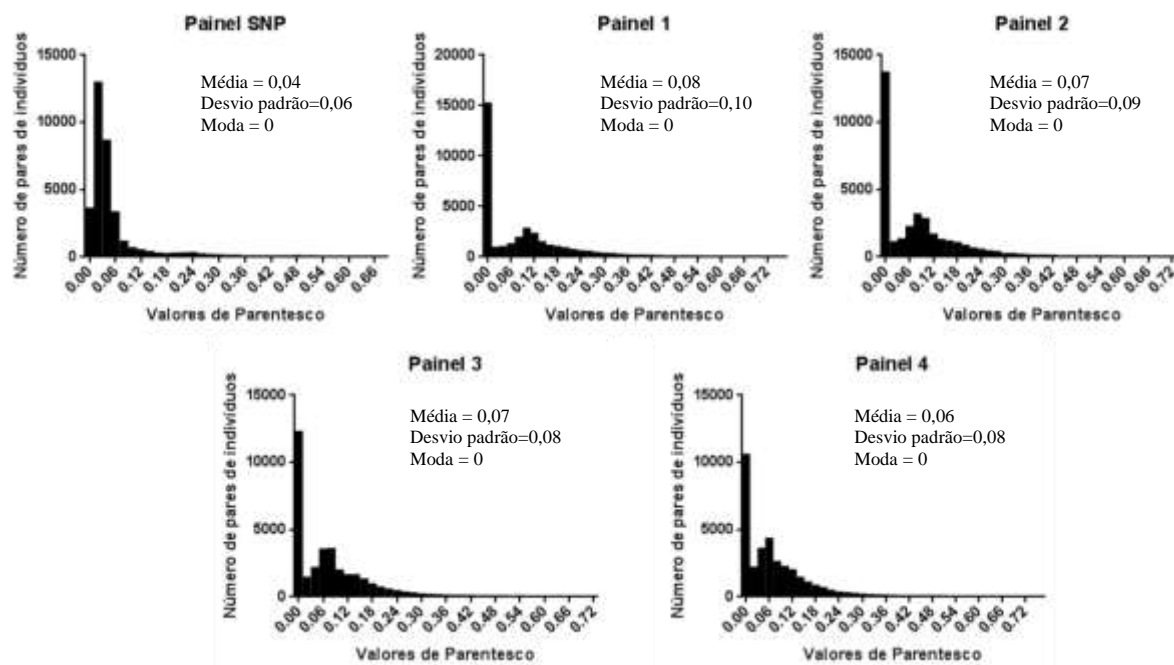
276

277 **Figura 2-** Valores de parentesco para pares de indivíduos em cada categoria de relacionamento
 278 usando painéis contendo 10, 12, 15 e 19 marcadores microssatélite.

279 *3.3. Comparação das estimativas de r entre SNPs e microssatélite*

280 A matriz do parentesco genômico gerada pelo painel SNP apresentou valores de r
 281 variando de 0 a 0,66, com média de 0,04. Esses valores foram semelhantes aos observados com
 282 os painéis microssatélite.

283 Comparações entre microssatélites e SNPs para uso em estudos de parentesco são
 284 limitadas principalmente em ovinos. Por essa razão, comparou-se a estimativa de parentesco
 285 utilizando um Painel SNP contendo 47.069 SNPs com painéis contendo 10 (Painel 1), 12 (Painel
 286 2), 15 (Painel 3) e 19 (Painel 4) marcadores microssatélites, de forma a verificar a variação nos
 287 parentesco estimados (Figura 3).



288

289 **Figura 3-** Distribuições dos valores de parentesco para cada painel de marcadores SNPs e
 290 microssatélite. Painel SNP (47.069 SNPs), Painel 1(10), Painel 2 (12), Painel 3 (15) e Painel 4
 291 (19).

292 No painel de SNPs, a maioria dos pares de indivíduos apresentou valores de r próximo a
 293 0,04, enquanto que nos painéis com microssatélites a maioria dos indivíduos se concentrou em
 294 zero. Além disso, à medida que o número de marcadores microssatélite aumentou, o número de
 295 indivíduos com $r = 0$ diminuiu e aumentou a frequência de parentescos com valores entre 0,06 a
 296 0,08, assim como no Painel SNP. A média dos valores de parentesco do Painel 1 (0,08) foi a que
 297 mais se distanciou da média do Painel SNP (0,04), assim como o desvio padrão, enquanto que a
 298 média que mais se aproximou dos SNPs foi a do Painel 4 (0,06). Já a moda foi igual em todos os
 299 painéis de microssatélites, indicando que o valor mais frequente foi zero (Figura 3).

300 No geral, as estimativas de parentesco geradas estavam próximas entre o Painel SNP e os
 301 painéis de microssatélites, pois as matrizes de parentesco se mostraram altamente
 302 correlacionadas (Tabela 4). Como se esperava, a menor correlação obtida foi entre os
 303 parentescos estimados com o Painel SNP e o Painel 1 (0,89) e a maior correlação obtida entre os
 304 parentescos entre o painel SNP e o Painel 4 (0,94).

305 **Tabela 4:** Correlação de Pearson entre as matrizes de parentesco gerada com SNP e pelos
 306 diferentes painéis de marcadores microssatélite.

Painel de Microssatélites	Correlação com Painel de SNPs
Painel 1	0,89
Painel 2	0,92
Painel 3	0,92
Painel 4	0,94

307 4. Discussão

308 Ao avaliar o desempenho dos marcadores, foi possível observar que apenas o *locus*
309 CSRM60 apresentou frequência de alelos nulos maiores que 0,2, enquanto que todos os outros
310 apresentaram frequência que não interferiram na qualidade do marcador para análise de
311 parentesco (Dakin and Avise, 2004). Isto pode ser confirmado pelos resultados do grau de
312 polimorfismo e dos valores referentes ao número de alelos, que se mostraram altos para os
313 dezenove marcadores microssatélites. Esses resultados são esperados para *loci* de
314 microssatélites, uma vez que é comum a constatação de alto polimorfismo em diferentes
315 espécies, tal como já foi observado por Al-Atiyat (2015) em ovinos australianos e por Agung et
316 al. (2019) em bovinos.

317 A partir dos resultados da simulação, foi observado que os estimadores que obtiveram
318 valores de média mais alto foram o TrioML e o DyadML, sendo ambos estimadores de
319 verossimilhança. O TrioML é um estimador de verossimilhança triádico que usa um terceiro
320 indivíduo (Z) como controle na estimativa de r entre dois indivíduos focais (X e Y), reduzindo
321 assim a chance de genes idênticos por estado (IIS) serem erroneamente inferidos como idênticos
322 por descendência (IBD) (Wang, 2007). O DyadML é um estimador de verossimilhança diádico
323 que leva em consideração diferentes condições de amostragem, como o número de *loci*
324 amostrados, número de alelos segregantes e frequências alélicas (Milligan, 2003). Todavia, o
325 estimador Ritland depende muito da relação real entre os indivíduos, bem como apresenta forte
326 dependência da real informação genética, sendo assim, mais sensíveis a erros de genotipagem
327 (Ritland, 1996).

328 Tanto nas análises com as fazendas separadas como utilizando todos os indivíduos como
329 uma população, boa parte dos pares de indivíduos apresentou algum grau de parentesco. Esses
330 resultados comprovam que essas populações têm uma grande quantidade de indivíduos com um
331 pai ou mãe em comum. Esse tipo de parentesco é comum em rebanhos ovinos, pelo fato dos
332 criadores utilizarem um ou poucos reprodutores por longos períodos de tempo, favorecendo
333 assim, essa estrutura familiar (Tino et al., 2020). Isso pode causar alguns efeitos a médio e longo
334 prazo, tais como perda de informações genéticas, que podem prejudicar a conservação e
335 aumentar a homozigose. Sendo assim, é importante o monitoramento cuidadoso dessas
336 populações para ter controle mais efetivo da endogamia.

337 O conhecimento do grau de parentesco entre dois indivíduos em uma população é de
338 suma importância para diferentes tipos de estudos, tais como: estudos de conservação da espécie,
339 melhoramento e predição de valor genético em populações com pouca ou nenhuma informação
340 de pedigree, mas que têm um parente próximo com registros conhecidos. A raça Santa Inês vem
341 sofrendo com acasalamentos e cruzamentos ao acaso que levam à perda de variabilidade
342 genética, bem como perdas da qualidade do rebanho (Santos et al., 2016). Além disso, erros de
343 pedigree, causados principalmente por falhas nos registros das coberturas a campo, são bastante
344 comuns em rebanhos ovinos dessa raça (Oliveira et al., 2012). Nesse contexto, considera-se
345 também a dificuldade de utilização de programas que auxiliam a seleção e conservação de
346 recursos genéticos, onde a maioria apresenta grande dificuldade de execução, exigindo altos
347 custos.

348 Neste estudo, painéis contendo acima de doze microssatélites foram capazes de estimar a
349 relação de parentesco com 95% de confiabilidade, indicando que um número baixo de

350 marcadores pode fornecer resultados acurados. Esses resultados corroboram com o estudo de
351 Yilmaz (2016) que testou sete painéis de microssatélite para teste de paternidade em ovinos e
352 obteve melhor resultado em um painel com doze marcadores. Outros estudos também já
353 demonstraram que pequenos conjuntos de microssatélites foram capazes de predizer valores de
354 parentesco tão precisos quanto utilizando painéis com grandes quantidades de SNP (Yu et al.,
355 2015). Contudo, análises desse tipo ainda são raras para ovinos, sendo quase inexistentes para
356 ovinos Santa Inês.

357 Inúmeros estudos utilizam o marcador SNP para construir relações de parentesco
358 (Bolormaa et al., 2008; Santure et al., 2010; Harlizius et al., 2011; Lopes et al., 2013). Esse
359 marcador apresenta vantagens de ter uma ampla cobertura no genoma, estando presente em
360 regiões codificantes e não codificantes (Brumfield et al.,2003), além da genotipagem conter uma
361 baixa taxa de erro. Porém, os SNPs são bialélicos e apresentam baixa taxa de heterozigosidade
362 (Kaiser et al., 2017). Por essa razão, é recomendado um número maior de SNPs quando se
363 pretende realizar análises de parentesco (Glaubitz et al., 2003; Santure et al., 2010).

364 A grande quantidade de dados gerados ao utilizar SNPs pode ser um fator limitante por
365 aumentar as dificuldades de análises computacionais, exigindo programas mais robustos e
366 computadores com grande capacidade de memória. Isso pode acarretar em um aumento de custo
367 das análises, o que ainda pode ser um problema, principalmente para pequenos rebanhos (Talent
368 et al., 2016).

369 Os valores de parentesco encontrados com os painéis de microssatélites foram
370 semelhantes aos encontrados no painel contendo 47.069 SNPs, apesar do painel com 10 e 12
371 marcadores mostrarem maior número de pares indivíduos com valores de $r = 0$, diferente do que

372 é observado no painel SNP. Contudo, esses resultados se ajustam às expectativas e confirmam
373 que um reduzido número de marcadores microssatélite apresenta poder informativo para estimar
374 parentesco equivalente a resultados estimados com uma grande quantidade de marcadores SNP.

375 Sendo assim, análises de parentesco realizadas com marcadores microssatélite podem ser
376 inseridas em programa de melhoramento e conservação de recursos genéticos de ovinos Santa
377 Inês, uma vez que metodologias como essa atribuiu resultados confiáveis e com custos menores
378 que análises utilizando SNPs, para fins de gerar informações de parentesco em pequenos
379 rebanhos ou rebanhos com deficiência no controle de pedigree.

380 **5. Conclusões**

381 Um painel com 15 marcadores de microssatélites é suficiente para estimar as relações de
382 parentescos com uma confiança de 95%, sendo que os resultados obtidos estavam altamente
383 correlacionados com o parentesco estimado com marcadores SNP.

384 Com isso, é possível inferir que a utilização de marcadores microssatélite para estimação
385 de parentesco em ovinos Santa Inês é uma alternativa viável e pode ser utilizada para auxiliar em
386 programas de melhoramento genético, conservação de recursos genéticos e rebanhos com
387 deficiência no controle genealógico. Além disso, as informações aqui geradas podem corrigir
388 erros de pedigree, resultando em ganhos na predição de valores genéticos e para controle de
389 endogamia dos rebanhos.

390

391 **Referências**

- 392 Agung, P. P., Saputra, F., Zein, M. S. A., Wulandari, A. S., Putra, W. P. B., Said, S., & Jakaria,
393 J., 2019. Genetic diversity of Indonesian cattle breeds based on microsatellite markers. Asian-
394 Australasian journal of animal sciences, 32(4), 467. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0283>.
- 395 Al-Atiyat, R. M., 2015. The power of 28 microsatellite markers for parentage testing in sheep.
396 Electronic Journal of Biotechnology, 18(2), 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2015.01.001>
- 397 Alves, A.A.C., Lôbo, A.M.B.O., Facó, O., Silva, L.P., Lôbo, R.N.B., 2016. Genetic parameters
398 for rank of the Santa Inês sheep in agricultural fairs using Bayesian procedures. Italian Journal of
399 Animal Science, 15, 604-609. <http://dx.doi.org/10.1080/1828051X.2016.1248866>.
- 400 Amorim, S. T., Kluska, S., Berton, M. P., De Lemos, M. V. A., Peripolli, E., Stafuzza, N. B.,
401 2018. Banhero, G. Genomic study for maternal related traits in Santa Inês sheep breed. Livestock
402 Science, 217, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.09.011>.
- 403 ARCO. Associação Brasileira De Criadores De Ovinos, 2018. Padrões raciais.
404 <http://www.arcoovinos.com.br/index.php/mn-srgo/mn-padroesraciais/40-santa-ines/> (accessed 17
405 Jun 2018).
- 406 Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., Mergeai, G., 2006. Optimization of a reliable,
407 fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels.
408 Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 10(2), 77-81.
409 <https://popups.uliege.be:443/1780-4507/index.php?id=1128>.

- 410 Blouin, M. S., 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in
411 natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(10), 503-511.
412 [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00225-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00225-8).
- 413 Bolormaa, S., Ruvinsky, A., Walkden-Brown, S., Van Der Werf, J., 2008. DNA-based parentage
414 verification in two Australian goat herds. *Small Ruminant Research*, 80(1-3), 95-100.
415 <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.08.005>.
- 416 Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W., 1980. Construction of a genetic linkage
417 map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human*
418 *genetics*, 32(3), 314.
- 419 Brookfield, J.F.Y., 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from
420 heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5(3), 453-455. [https://doi.org/10.1046/j.1365-](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x)
421 [294X.1996.00098.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.1996.00098.x).
- 422 Brumfield, R. T., Beerli, P., Nickerson, D. A., Edwards, S. V., 2004. The utility of single
423 nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends in Ecology & Evolution*,
424 18(5), 249-256. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00018-1](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00018-1).
- 425 Dakin, E. E., Avise, J. C., 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93(5),
426 504-509. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>.
- 427 FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018. Production sheep by
428 country. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize> (accessed 20 March 2020).

- 429 Glaubitz, J. C., Rhodes, J.R., O. E., Dewoody, J. A., 2003. Prospects for inferring pairwise
430 relationships with single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, 12(4), 1039-1047.
431 10.1046/j.1365-294x.2003.01790.x.
- 432 Gois, G. C., Campos, F. S., dos Santos Pessoa, R. M., da Silva, A. A. F., de Sousa Ferreira, J.
433 M., da Silva Matias, A. G., Santos, R. N., 2018. Qualidade da carne de ovinos de diferentes
434 pesos e condição sexual. *PUBVET*, 12, 172. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n5a97.1-9>
- 435 Harlizius, B., Lopes, M. S., Duijvesteijn, N., Van De Goor, L. H. P., Van Haeringen, W. A.,
436 Panneman, H., Knol, E. F., 2011. A single nucleotide polymorphism set for paternal
437 identification to reduce the costs of trait recording in commercial pig breeding. *Journal of animal*
438 *science*, 89(6), 1661-1668. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132014000100013>.
- 439 IBGE, 2017. *Produção Pecuária municipal*.
440 http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf. (accessed 29
441 december 2019).
- 442 Kaiser, S. A., Taylor, S. A., Chen, N., Sillett, T. S., Bondra, E. R., Webster, M. S., 2017. A
443 comparative assessment of SNP and microsatellite markers for assigning parentage in a socially
444 monogamous bird. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 183-193. [https://doi.org/10.1111/1755-](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12589)
445 [0998.12589](https://doi.org/10.1111/1755-0998.12589).
- 446 Kling, D., Welander, J., Tillmar, A., Skare, O., Egeland, T., Holmlund, G., 2012. DNA
447 microarray as a tool in establishing genetic relatedness—Current status and future prospects.

- 448 Forensic Science International: Genetics, 6(3), 322-329.
449 <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.07.007>.
- 450 Li, C. C., Weeks, D. E., Chakravarti, A., 1993. Similarity of DNA fingerprints due to chance and
451 relatedness. *Human heredity*, 43(1), 45-52. <https://doi.org/10.1159/000154113>.
- 452 Lopes, M. S., Silva, F. F., Harlizius, B., Duijvesteijn, N., Lopes, P. S., Guimarães, S. E., Knol, E.
453 F., 2013. Improved estimation of inbreeding and kinship in pigs using optimized SNP panels.
454 *BMC genetics*, 14(1), 92. <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/14/92>.
- 455 Lynch, M., 1988. The divergence of neutral quantitative characters among partially isolated
456 populations. *Evolution*, 42(3), 455-466. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1988.tb04152.x>.
- 457 Lynch, M., Ritland, K., 1999. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers.
458 *Genetics*, 152(4), 1753-1766.
- 459 Marshall, T. C., Slate, J. B. K. E., Kruuk, L. E. B., Pemberton, J. M., 1998. Statistical confidence
460 for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639-
461 655. [10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x).
- 462 Milligan, B. G., 2003. Maximum-likelihood estimation of relatedness. *Genetics*, 163(3), 1153-
463 1167. <http://www.genetics.org/content/163/3/1153>.
- 464 Misztal, I., Tsuruta, S., Lourenco, D., Aguilar, I., Legarra, A., Vitezica, Z. Manual for BLUPF90
465 familyo fprograms, v.2018.

- 466 Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K., 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation.
467 Trends in ecology & evolution, 19(4), 208-216. 10.1016/j.tree.2004.01.009.
- 468 Oliveira Do Ó, A., Rêgo Neto, A. D. A., Santos, G. V. D., Sarmiento, J. L. R., Biagiotti, D.,
469 Souza, J. E. R. D., 2012. Curva de crescimento de ovinos Santa Inês no Vale do Gurgueia.
470 Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 13(4), 912-922.
471 <https://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402012000400019>.
- 472 Panetto, J. C. D. C., Machado, M. A., da Silva, M. V. G., Barbosa, R. S., dos Santos, G. G., de
473 MH Leite, R., & Peixoto, M. G. C., 2017. Parentage assignment using SNP markers, inbreeding
474 and population size for the Brazilian Red Sindhi cattle. Livestock Science, 204, 33-38.
475 <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2017.08.008>.
- 476 Pew, J., Muir, P. H., Wang, J., Frasier, T. R., 2015. Related: an R package for analysing pairwise
477 relatedness from codominant molecular markers. Molecular ecology resources, 15(3), 557-561.
478 <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12323>.
- 479 Queller, D. C., Goodnight, K. F., 1989. Estimating relatedness using genetic markers. Evolution,
480 43(2), 258-275. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb04226.x>.
- 481 Rego Neto, A., Sarmiento, J.L.R., Santos, N.P.S., Campelo, J.E.G., Sena, L.S., Biagiotti, D.,
482 Santos, G.V., 2018. Population genetic structure of Santa Inês sheep in Brazil. Tropical animal
483 health and production, 50(3), 503-508. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1459-5>.

- 484 Ritland, K., 1996. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients.
485 *Genetics Research*, 67(2), 175-185. <https://doi.org/10.1017/S0016672300033620>.
- 486 Santos, N. P. D. S., Sarmiento, J. L. R., Carvalheiro, R., Campelo, J. E. G., Sousa, W. H. D.,
487 Rego Neto, A. D. A., Biagiotti, D., 2016. Contribuição genética ótima aplicada à seleção de
488 ovinos Santa Inês. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 51, 745-750.
489 <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000600006>.
- 490 Santure, A. W., Stapley, J., Ball, A. D., Birkhead, T. R., Burke, T., Slate, J. O. N., 2010. On the
491 use of large marker panels to estimate inbreeding and relatedness: empirical and simulation
492 studies of a pedigreed zebra finch population typed at 771 SNPs. *Molecular Ecology*, 19(7),
493 1439-1451. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04554.x>.
- 494 Sena, L. S., Dos Santos, G. V., Torres, T. S., De Sousa Júnior, A., Neto, A. D. A. R., Sarmiento,
495 J. L. R., Biagiotti, D., 2016. Genetic parameters for carcass traits and body size of meat sheep.
496 *Semina: Ciências Agrárias*, 37(4), 2477-2485. 10.5433/1679-0359.2016v37n4Supl1p2477.
- 497 Talenti, A., Nicolazzi, E. L., Chessa, S., Frattini, S., Moretti, R., Coizet, B., Ajmone-Marsan, P.,
498 2016. A method for single nucleotide polymorphism selection for parentage assessment in goats.
499 *Journal of dairy science*, 99(5), 3646-3653. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10077>.
- 500 Thompson, E. A., 2013. Identity by descent: variation in meiosis, across genomes, and in
501 populations. *Genetics*, 194(2), 301-326. 10.1534/genetics.112.148825.

- 502 Tino, C., Cavani, L., Fonseca, R., Silva, K. D. M., 2020. Análise da estrutura populacional de
503 ovinos deslançados do núcleo de conservação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
504 *Zootecnia*, 72, 560-564. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-10502>.
- 505 Tokarska, M., Marshall, T., Kowalczyk, R., Wójcik, J. M., Pertoldi, C., Kristensen, T. N.,
506 Bendixen, C., 2009. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity
507 analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison. *Heredity*, 103(4), 326-
508 332. DOI: 10.1038/hdy.2009.73.
- 509 Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER:
510 software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular*
511 *Ecology Notes*, 4(3), 535-538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>.
- 512 Wang, J., 2002. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*,
513 160(3), 1203-1215.
- 514 Wang, J., 2006. Informativeness of genetic markers for pairwise relationship and relatedness
515 inference. *Theoretical population biology*, 70(3), 300-321.
516 <https://doi.org/10.1016/j.tpb.2005.11.003>.
- 517 Wang, J., 2007. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness.
518 *Genetics Research*, 89(3), 135-153. DOI: 10.1017/s0016672307008798.

- 519 Wang, J., 2011. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness
520 and inbreeding coefficients. *Molecular ecology resources*, 11(1), 141-145.
521 <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02885.x>.
- 522 Wang, J., 2017. Estimating pairwise relatedness in a small sample of individuals. *Heredity*,
523 119(5), 302-313. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.52>.
- 524 Yilmaz, O., 2016. Power of different microsatellite panels for paternity analysis in sheep.
525 *Animal Science Papers and Reports*, 34(2), 155-164.
- 526 Yu, G. C., Tang, Q. Z., Long, K. R., Che, T. D., Li, M. Z., Shuai, S. R., 2015. Effectiveness of
527 microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for parentage analysis in European
528 domestic pigs. *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 1362-1370.
529 <http://dx.doi.org/10.4238/2015>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os marcadores microssatélites utilizados no presente estudo demonstraram ser úteis para estudos de estrutura e de diversidade genética de ovinos Santa Inês, bem como para estimar relações de parentesco.

Os resultados mostraram que rebanhos de ovinos Santa Inês presente na região Meio Norte do Brasil apresentou alta variabilidade genética, com moderada estruturação populacional. Foi observado índice de migração relativa, bem como evidência de deriva genética e indícios de gargalo genético. Com essas características genéticas, é sugerida uma revisão das estratégias de manejo, pois os rebanhos podem estar sofrendo influência de práticas desordenadas de acasalamento.

A estimativa de parentesco indicou que a maioria dos pares de indivíduos estudados não apresentava relação ou eram meio irmãos. Contudo, quando analisado as fazendas separadamente, a maior parte dos indivíduos apresentaram algum grau de parentesco, sugerindo que está acontecendo acasalamento entre indivíduos aparentados. Além disso, foi relatado que painéis contendo acima de 15 marcadores microssatélites foram capazes de estimar parentesco com mesma acurácia que o painel SNP. Deste modo, microssatélites fornecem informações e orientações confiáveis sobre relações de parentesco, que podem ser usadas em futuras estratégias de gestão genética dos rebanhos de ovinos Santa Inês, tais como programas de conservação e melhoramento da raça.

ANEXOS



O *Jornal Asiático-Australasiano de Ciências Animais* (AJAS) é o jornal oficial da Associação Asiático-Australásia de Sociedades de Produção Animal (AAP). Qualquer pessoa que queira enviar um manuscrito é aconselhada a ler atentamente os objetivos e a seção deste escopo. Os manuscritos enviados ao AJAS devem ser preparados de acordo com as seguintes instruções. Para questões não abordadas nestas instruções, o autor é encaminhado para o Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (ICMJE), “Recomendações para a Conduta, Relatórios, Edição e Publicação de Trabalhos Acadêmicos em Revistas Médicas” (<http://www.icmje.org>).

OBJETIVOS E ÂMBITO DE APLICAÇÃO

O AJAS tem como objetivo publicar resultados de pesquisas originais e de ponta e análises sobre aspectos relacionados a animais das ciências da vida. A ênfase será colocada em estudos envolvendo animais de fazenda, como gado, búfalos, ovelhas, cabras, porcos, cavalos e aves. Estudos para a melhoria da saúde humana usando modelos animais também podem ser publicados. O AJAS abrangerá todas as áreas de produção animal e aspectos fundamentais das ciências animais: reprodução e genética, reprodução e fisiologia, nutrição, ciência da carne e do leite, biotecnologia, comportamento, bem-estar, saúde e sistemas de pecuária. O AJAS é subdividido em 10 seções.

- Melhoramento Animal e Genética: genética quantitativa e molecular, genômica, avaliação genética, evolução de animais domésticos e bioinformática
- Reprodução e Fisiologia Animal: fisiologia da reprodução, desenvolvimento, crescimento, lactação e exercício; e biologia de gametas

- Nutrição de ruminantes e utilização de forragem: microbiologia e função do rúmen, nutrição de ruminantes, fisiologia e metabolismo e utilização de forragem
- Nutrição e Tecnologia de Alimentos para Suínos: nutrição e fisiologia de suínos; avaliação de alimentos para animais, aditivos para alimentos para animais e tecnologia de processamento de alimentos para animais
- Aves e nutrição animal de laboratório: nutrição e fisiologia de aves de capoeira e outros animais não ruminantes
- Produtos de origem animal: ciência do leite e da carne, biologia muscular, composição do produto, segurança alimentar, segurança alimentar e alimentos funcionais
- Biotecnologia Animal: nutrição molecular, animais transgênicos, identificação e manipulação de genes
- Saúde Animal: modulação imune, infecção e imunidade, respostas ao estresse, vacinas e terapêuticas e modelos animais
- Comportamento e Bem-Estar Animal: comportamento social e sexual, adaptação e bem-estar animal
- Meio ambiente e gestão: gestão de resíduos de gado, gado e meio ambiente e sistemas de pecuária

DIREITOS AUTORAIS E LICENÇA DE ATRIBUIÇÃO COMUM CRIATIVA

Um manuscrito submetido, quando publicado, se tornará propriedade da revista. Os direitos autorais de todos os materiais publicados são de propriedade da AAAP. A Licença de Atribuição Creative Commons disponível em: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> também está em vigor.

ÉTICA EM PESQUISA E PUBLICAÇÃO

A revista segue as diretrizes éticas para pesquisa e publicação descritas nas Diretrizes sobre Boa Publicação (<http://publicationethics.org/resources/guidelines>) e nas Diretrizes do ICMJE (<http://www.icmje.org>).

1. Autoria

O crédito de autoria deve basear-se em (1) contribuições substanciais para concepção e design, aquisição de dados e / ou análise e interpretação de dados; (2) redigir o artigo ou revisá-lo criticamente quanto a conteúdo intelectual importante; (3) aprovação final da versão a ser publicada; e (4) concordar em ser responsável por todos os aspectos do trabalho,

garantindo que as questões relacionadas à precisão ou integridade de qualquer parte do trabalho sejam investigadas e resolvidas adequadamente. Todo autor deve atender a todas essas quatro condições. Após a submissão inicial de um manuscrito, qualquer alteração na autoria (adição de autores, exclusão de autores ou reorganização da ordem dos autores) deve ser explicada por uma carta ao editor dos autores envolvidos. Esta carta deve ser assinada por todos os autores do artigo.

- Autor correspondente e primeiro autor: AJAS permite uma autoria múltipla correspondente (no máximo duas) para um artigo. Apenas um autor deve corresponder à redação de um artigo. O AJAS aceita aviso de igual contribuição para o primeiro autor quando o estudo foi claramente realizado pelos co-primeiros autores (máximo dois).
- Correção da autoria após a publicação: O AJAS não corrige a autoria após a aceitação final, a menos que um erro tenha sido cometido pela equipe editorial. A autoria pode ser alterada antes da aceitação final quando a correção da autoria for solicitada por todos os autores envolvidos no manuscrito.

2. Má conduta científica

Os autores devem ser responsáveis pela credibilidade de todas as alegações de má conduta científica, por exemplo, suspeita de fabricação ou falsificação de dados, dupla publicação ou plágio. Os manuscritos enviados não devem ter sido publicados anteriormente e não devem ser considerados para publicação em outro local. Nenhuma parte do manuscrito aceito deve ser duplicada em qualquer outra revista científica sem a permissão do conselho editorial da AJAS. Os manuscritos enviados são selecionados quanto a possível plágio ou publicação duplicada pelo CrossCheck após o recebimento pelo periódico. Se for detectado plágio ou publicação duplicada, os manuscritos poderão ser rejeitados, o incidente será anunciado no AJAS e suas instituições poderão ser informadas. Também haverá penalidades impostas pelo comitê de ética da AJAS (ver comitê de ética).

Com qualquer alegação levantada pelos revisores, leitores ou terceiros, o Editor Chefe, juntamente com o comitê de Ética da AJAS, primeiro tentará abordar o assunto com o (s) Autor (es) Correspondente (s). Caso isso não resolva a situação satisfatoriamente, o Editor Chefe entrará em contato com a instituição do Autor Correspondente para solicitar uma investigação; o editor-chefe também pode entrar em contato com os co-autores e / ou os financiadores da pesquisa publicada.

É de responsabilidade dos autores solicitar permissão da autoridade apropriada para qualquer material que esteja sendo reproduzido. Este requisito se aplica a textos, figuras, tabelas e áudio e / ou vídeo.

3. Publicação Secundária

É possível republicar manuscritos se eles satisfizerem as condições da publicação secundária das Recomendações do ICMJE (http://www.icmje.org/urm_main.html).

4. Declaração de Conflito de Interesses

O autor correspondente deve informar o editor de quaisquer conflitos de interesse em potencial que possam influenciar a interpretação dos dados pelos autores. Exemplos de potenciais conflitos de interesse são apoio financeiro ou conexões com empresas, pressão política de grupos de interesse e questões acadêmicas. Em particular, todas as fontes de financiamento aplicáveis ao estudo devem ser explicitamente declaradas.

5. Cuidado e uso de animais

Ao realizar experimentos com animais, os autores devem seguir os requisitos locais ou nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório. Todas as experiências com animais devem ser revisadas pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (IACUC) da organização em que a experiência foi realizada. O manuscrito deve incluir a declaração de conformidade com a IACUC, que deve aparecer como o primeiro item na seção Métodos. Se necessário, o editor ou revisores podem solicitar cópia do documento para resolver as questões sobre a aprovação da IACUC e seus problemas relacionados. A AJAS se reserva o direito de rejeitar qualquer manuscrito com base em estudos antiéticos ou de má conduta em estudos com animais. Também é recomendado que o sexo dos animais e, se houver, influência ou associação do sexo nos resultados do estudo sejam descritos.

6. Má conduta de publicação

Quando o AJAS enfrenta casos suspeitos de má conduta em pesquisa e publicação, como publicação redundante (duplicada), plágio, dados fraudulentos ou fabricados, conflito de interesses não revelado (Col), problemas éticos com um manuscrito enviado (ou publicado), o AJAS seguirá o fluxograma fornecido pelo Comitê de Ética em Publicações (<http://publicationethics.org/resources/flowcharts>). A discussão e decisão sobre os casos suspeitos serão realizadas pelo comitê de ética da AJAS.

7. Reter dados originais

Espera-se que os autores retenham os dados brutos originais apresentados em um artigo publicado pelo período de tempo exigido pela fonte ou instituição de financiamento dos autores; caso a instituição ou fonte de financiamento não possua a política de retenção de dados, todos os dados originais e brutos devem ser mantidos por pelo menos 6 anos após a publicação do artigo. A AJAS se reserva o direito de alterar esse prazo em circunstâncias atenuantes.

PROCESSO DE APRESENTAÇÃO E REVISÃO POR PARES

1. Submissão

Todos os manuscritos devem ser enviados pelo sistema de envio eletrônico da AJAS (<http://submit.ajas.info/>). Se houver dificuldades, os autores devem entrar em contato com o escritório editorial (<http://submit.ajas.info/community/contact/>).

2. Processo de Revisão / Revisão por Pares

A adequação dos artigos para publicação no AJAS é julgada pelos membros do conselho editorial. O editor-chefe tem total responsabilidade pelos trabalhos enviados, que são avaliados na ordem recebida. No estágio inicial, o editor-chefe pode solicitar aos editores associados que avaliem os artigos submetidos quanto à adequação para revisão posterior. Cada artigo que for considerado adequado será avaliado por pelo menos dois membros do conselho editorial ou por outros revisores cientificamente qualificados. O editor-chefe lida com toda a correspondência com o autor e toma a decisão final sobre se o artigo é recomendado para aceitação ou rejeição ou se deve ser devolvido ao autor para revisão.

Um revisor pode não pertencer à mesma instituição que o autor. Os revisores devem examinar o artigo e devolvê-lo com o seu relatório ao editor-chefe o mais rápido possível, geralmente dentro de três semanas. A identidade e o relatório dos revisores são divulgados ao editor-chefe, mas apenas o relatório anônimo é rotineiramente enviado ao autor. O anonimato dos revisores é preservado, a menos que seja desejado por todas as partes envolvidas.

O revisor recomenda aceitação, aceitação após revisão, reenvio após revisão ou rejeição. Se os dois revisores recomendam aceitação ou rejeição, a decisão permanece. Quando as opiniões deles diferem, o editor-chefe pode solicitar a um terceiro revisor ou editor associado que decida sobre a aceitação ou rejeição desse trabalho. O editor-chefe pode ter que decidir se aceita ou rejeita um manuscrito para o qual os relatórios de revisão estão vencidos se o processo de revisão não for concluído dentro de 2 meses.

Os trabalhos que necessitarem de revisão serão devolvidos ao autor correspondente, e o autor deverá devolver o manuscrito revisado ao editor-chefe dentro de 4 semanas; caso contrário, o autor será notificado de que o trabalho foi retirado. O editor-chefe pode enviar o manuscrito revisado aos editores associados para examinar se o manuscrito foi revisado conforme sugerido pelos revisores.

Se um artigo não for adequado para publicação, o autor correspondente será notificado com uma declaração dos motivos da rejeição. O autor pode recorrer se acreditar que um julgamento errado ou injusto foi feito. Uma carta ao editor-chefe, apresentando as razões pelas quais a decisão deve ser reconsiderada, será levada em consideração. A maioria dos trabalhos

publicados eventualmente é devolvida para revisão. Os motivos comuns para solicitar a revisão são: falha em seguir estilo e forma, falta de clareza ou brevidade, questões de fato ou teoria, organização deficiente de material tabular e inglês ruim.

PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO

1. Requisitos Gerais

- O manuscrito deve ter espaçamento duplo, em fonte Times New Roman (tamanho 12). Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente no canto superior direito, começando com a página de título.
- As linhas em todas as páginas, incluindo as páginas para referências e legendas de figuras, devem ser numeradas consecutivamente na margem esquerda, começando com o número um na parte superior da página de título. É desejável uma margem de 2,5 cm nos dois lados da página.
- Pesos e medidas devem ser expressos no sistema de unidades SI (métricas) e temperaturas na escala Celsius (centígrados).
- Especifique todas as abreviações na primeira aparição em resumo, texto principal e tabelas / figura, respectivamente e, em seguida, use as abreviações posteriormente. Consulte a lista de abreviações padrão no apêndice 2 das instruções para autores para obter a abreviação adequada da terminologia comumente usada.
- As tabelas, em espaço duplo, devem ser tão pequenas e simples quanto possível. Cada tabela deve estar em uma folha separada.
- As legendas das figuras devem ser digitadas em uma folha separada. As fotografias devem ser cuidadosamente preparadas para que uma imagem clara possa ser impressa.
- Os manuscritos serão editados na ordem recebida e os trabalhos aceitos serão publicados na ordem apresentada, se possível.
- Autores cuja língua nativa não é o inglês são fortemente encorajados a revisar seus manuscritos antes da submissão.
- Os autores devem declarar qualquer suporte financeiro ou relacionamento que possa representar um conflito de interesses.

A preparação do manuscrito é diferente de acordo com o tipo de publicação, incluindo artigos originais, resenhas, notas técnicas, editoriais, resenhas de livros e correspondência. Outros tipos também podem ser negociados com o conselho editorial da AJAS.

2. Original Articles

Os Artigos Originais são relatórios de investigações básicas. Embora não haja limitação no tamanho dos manuscritos, o conselho editorial pode resumir ilustrações excessivas e tabelas grandes. O manuscrito de um Artigo Original deve ser organizado na seguinte seqüência: página de rosto, resumo, palavras-chave, texto principal (introdução, materiais e métodos, resultados e discussão), implicações (opcional), agradecimentos (opcional), referências, tabelas, e lendas das figuras. As figuras podem ser enviadas como arquivos separados.

1) Página de rosto

Os seguintes itens devem ser incluídos na página de rosto: (a) o título do manuscrito, (b) lista de autores, (c) afiliação de cada autor, e-mail e ORCID (d) nome, e-mail e número de telefone do autor correspondente; (e) quando aplicável, a fonte de qualquer financiamento para pesquisa e uma lista de onde e quando o estudo foi apresentado em parte em outro lugar. O título do manuscrito deve ser digitado em negrito, usando letras maiúsculas e minúsculas e colocado no centro da página. Embora o título deva ser o mais breve possível, é recomendável incluir as espécies animais envolvidas na pesquisa, quando aplicável. Abreviações não são permitidas no título. Os nomes completos de todos os autores devem ser fornecidos com o nome da família em itálico. Não devem ser utilizadas indicações de nível docente ou outros títulos profissionais. Nomear um autor em um documento implica que a pessoa nomeada está ciente da pesquisa relatada e concorda e aceita a responsabilidade por quaisquer resultados ou conclusões relatados. O endereço da instituição onde a pesquisa foi conduzida deve incluir o nome da instituição, cidade, código postal e país. Se a afiliação for diferente do primeiro autor, os autores deverão ser marcados com "1", "2", "3" e assim por diante, em algarismos arábicos, que devem aparecer em sobrescrito no canto superior direito do nome do autor. e no início de cada afiliação.

2) Resumo

Um resumo estruturado é necessário para artigos originais e um não estruturado para artigos de revisão. O resumo, composto por no máximo 300 palavras, aparece em uma página separada após a página de título. O resumo deve resumir os resultados pertinentes de uma forma breve, mas compreensível. Um resumo estruturado deve conter as seções Objetivo (objetivo / plano de fundo), Métodos, Resultados e Conclusão. Um resumo não estruturado deve ser um parágrafo sem seções. As referências nunca devem ser citadas no resumo.

3) Palavras-chave

No final do resumo, devem ser listadas até seis palavras-chave que melhor descrevem a natureza da pesquisa. O termo "Palavras-chave" deve aparecer em negrito, seguido de dois pontos. A primeira letra de cada palavra-chave é maiúscula e as palavras-chave são separadas por ponto e vírgula. As palavras-chave devem incluir as espécies animais, variáveis testadas e os principais critérios de resposta. As palavras-chave devem ser selecionadas no CAB Thesaurus (disponível em <http://www.cabi.org/cabthesaurus/>).

4) Cabeçalhos

Os principais títulos do artigo (Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão [ou Resultados e Discussão] e Referências) aparecem em negrito romano. Os primeiros subtítulos aparecem na margem esquerda em uma linha separada na impressão em negrito, não são seguidos por pontuação e somente a primeira palavra é maiúscula. Os primeiros subtítulos são utilizados quando as subseções consistem em vários parágrafos. Os subtítulos secundários aparecem no início da primeira linha de um parágrafo. Eles estão em itálico e não exigem rotulagem (a, b, c, etc.).

Materiais e Métodos

Animais, desenho experimental e dieta

Animais

5) Introdução

A introdução começa em uma nova página após o resumo. A introdução justifica brevemente a pesquisa e especifica as hipóteses a serem testadas. Uma discussão extensa da literatura relevante deve ser incluída na discussão dos resultados, não na introdução. Para minimizar o comprimento e evitar redundância, geralmente não mais que três referências devem ser citadas para apoiar um conceito específico.

6) Materiais e método

- Todas as experiências com animais devem ser revisadas pela IACUC para o cuidado e uso de animais. Se espécimes de seres humanos foram utilizados na pesquisa, os autores devem certificar que a aprovação da pesquisa de um IRB apropriado foi obtida. O manuscrito deve incluir uma declaração de conformidade ou isenção da IACUC ou IRB nesta seção.
- Uma descrição clara ou referência original é necessária para todos os procedimentos biológicos, analíticos e estatísticos usados no experimento. Todas as modificações de procedimentos devem ser explicadas. Dietas, animais (raça, sexo, idade, peso corporal e

condições de pesagem [isto é, com ou sem restrição de ração e / ou água]), técnicas cirúrgicas, medições e modelos estatísticos devem ser descritos de forma clara e completa. Nomes de marcas e nomes de empresas e locais de todas as substâncias e equipamentos mencionados no texto devem ser incluídos entre parênteses no texto, não nas notas de rodapé.

Statistics: Biology should be emphasized, but the use of incorrect or inadequate statistical methods to analyze and interpret biological data is not acceptable. Consultation with a statistician is recommended. Statistical methods commonly used in the area of animal sciences need not be described in detail, but adequate references should be provided. The statistical model, classes, blocks, and experimental unit must be designated. Any restrictions used in estimating parameters should be defined. Reference to a statistical package without reporting the sources of variation (classes) and other salient features of the analysis, such as covariance or orthogonal contrasts, is not sufficient. A statement of the results of statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. Please refer to the following article for statistical guideline: Guidelines for experimental design and statistical analyses in animal studies submitted for publication in the Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Asian-Australas J Anim Sci 2018;31(9):1381-1386. DOI: <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0468>

7) Resultados

Os resultados devem ser apresentados em forma de tabela, quando possível. O texto deve explicar ou elaborar os dados tabulares, mas os números não devem ser repetidos extensivamente dentro do texto. Dados suficientes, todos com algum índice de variação anexado, devem ser apresentados para permitir que os leitores interpretem os resultados do experimento. A discussão pode ser combinada com os resultados em uma seção, se desejado.

8) Discussão

A discussão, seja em uma seção separada ou combinada com os resultados, deve interpretar os resultados de forma clara e concisa em termos de mecanismos biológicos e deve integrar-se às descobertas da pesquisa de outros estudos para fornecer aos leitores uma ampla base para entender se as hipóteses testadas foram aceitas ou rejeitadas.

9) Implicações (opcional)

Esta seção, composta por não mais que 100 palavras em um parágrafo, segue a discussão e deve explicar em termos leigos, sem abreviações, acrônimos ou citações, o que os resultados desta pesquisa implicam na produção e / ou biologia animal. Embora algumas especulações sejam permitidas, esta seção também deve alertar o leitor contra a superextrapolação dos

resultados. Para manuscritos com inscrições diretas, esta seção consistirá em um resumo interpretativo.

10) Referências

No texto, as referências devem ser citadas com algarismos arábicos entre colchetes, numerados na ordem citada. Na seção de referências, as referências devem ser numeradas e listadas em ordem de aparência no texto. O número de referências é limitado a 30 para artigos originais. Todos os autores de um trabalho citado devem ser listados se houver seis ou menos autores. Os três primeiros autores devem ser listados seguidos por "et al." se houver mais de seis autores. Se uma referência possuir um identificador de objeto digital (DOI), ela deverá ser fornecida. Resultados não publicados e comunicações pessoais não devem ser incluídos na lista de referências. Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com as abreviações ISO convencionais usadas pelo PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>) Uma pequena lista de abreviações de títulos de periódicos é fornecida no Apêndice 1. As referências de amostra são fornecidas abaixo. Outros tipos de referências não descritas abaixo devem seguir o *Guia de estilo da NLM para autores, editores e editores* (<http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>).

Exemplos de referências

(artigos de periódicos)

1. Seo D, Bhuiyan MS, Sultana H, Heo JM, Lee JH. Análise da diversidade genética de populações de patos do sul e leste da Ásia usando marcadores microssatélites altamente polimórficos. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016; 29: 471-8. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0915>
2. Tizioto PC, Coutinho LL, Mourão GB, et al. Variação na diferenciação miogênica A abundância de 1 mRNA está associada à maciez da carne bovina em bovinos Nelore. *Anim Genet* 30 de março de 2016 [Epub]. <http://dx.doi.org/10.1111/age.12434>
3. Krehbiel CR, Cranston JJ, McCurdy MP. Um limite superior para a densidade calórica de dietas de acabamento. *J Anim Sci* 2006; 84 Suppl: E34-49.
4. Mahan DC, Weaver EM, Russell LE. Melhor desempenho do porco pós-desmame adicionando NaCl ou HCl a dietas contendo plasma animal [resumo]. *J Anim Sci* 1996; 74 (Suppl 1): 58.

(Livros e capítulos de livros)

5. Campo TG, Taylor RE. *Produção científica de animais de fazenda: uma introdução à ciência animal*. 11a ed. Rio Saddle Superior, NJ: Pearson Prentice Hall; 2015.

6. Comitê de Necessidades Nutricionais de Suínos, Conselho Nacional de Pesquisa. Necessidades nutricionais dos suínos. 11a ed. Washington, DC: Imprensa da Academia Nacional; 2012.
7. Latimer GW; AOAC International. Métodos oficiais de análise da AOAC International. 19 ed. Gaithersburg, MD: AOAC International; 2012.
8. Preston ND, Daszak P, Colwell RR. A interface ambiente humano: aplicando conceitos de ecossistema à saúde. In: Mackenzie JS, Jeggo M, Daszak P, Richt JA, editores. Uma saúde: as interfaces homem-animal-ambiente em doenças infecciosas emergentes. Nova Iorque: Springer-Verlag; 2013. p. 83-100. https://doi.org/10.1007/82_2013_317
(Sites)
9. Raosoft. Calculadora de tamanho de amostra [Internet]. Raosoft Inc .; c2004 [citado em 1 abr 2016]. Disponível em: <http://www.raosoft.com/samplesize.html>
10. Metagenômica: seqüências do ambiente [Internet]. Bethesda, MD: Centro Nacional de Informação Biomédica; 2006 [citado em 20 fev 2016]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=metagenomics.TOC>
(Dissertações e Teses)
11. Ha JK. Estudos sobre efeitos benéficos e adversos de tampões alimentares para cordeiros [dissertação]. Brookings, SD: Universidade Estadual da Dakota do Sul; 1981.
12. Yoon CH. Efeitos dos níveis de lisina e sódio no desempenho do crescimento, equilíbrio ácido-base e antagonismo da lisina-arginina em pintos de corte [dissertação de mestrado]. Seul, KR: Universidade Nacional de Seul; 1991.
(Documentos da Conferência)
13. Moss KJ, Greening L. O efeito da idade e do sexo no tempo necessário para os cavalos aprenderem uma tarefa operante. In: Proceedings of the British Society of Animal Science 2009; 30 de março de 2009 a 1 de abril; Southport, Reino Unido. Penicuik, Reino Unido: Sociedade Britânica de Ciência Animal; 2009. p. 1
14. Patrias K. Redação e edição compatíveis com computador. Interagindo com o ambiente digital: publicação científica moderna. 46ª Reunião Anual do Conselho de Editores de Ciências; 2003 3-6 de maio; Pittsburgh, PA.
(Relatórios de Pesquisa)

15. Página E, Harney JM. Relatório de avaliação de riscos para a saúde. Cincinnati, OH: Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional; 2001. Relatório No .: HETA2000-0139-2824.

11) Tabelas

As tabelas são usadas para apresentar dados numéricos de maneira autoexplicativa. Eles devem ser inteligíveis sem consultar o texto e não devem duplicar os dados já fornecidos no texto ou nas ilustrações. Qualquer abreviação usada em uma tabela deve ser definida nessa tabela. As tabelas devem ser espaçadas duas vezes com cada tabela em uma folha separada. As tabelas devem aparecer imediatamente após as referências. As tabelas devem ser paginadas em série com o texto. Todas as tabelas devem ser citadas no texto. Os algarismos arábicos são usados para numerar tabelas. O número da tabela (ou seja, tabela 4.) é digitado em negrito seguido de um ponto. O título da tabela continua na mesma linha, com apenas a primeira letra maiúscula. Um ponto final não deve aparecer no final do título. Os títulos das colunas devem ter a primeira letra de cada palavra em maiúscula, enquanto os nomes das variáveis devem ser digitados com apenas a primeira letra em maiúscula (ou seja, ganho médio diário). Para números menores que 1, um zero deve ser inserido à esquerda do ponto decimal e, se possível, as colunas devem estar alinhadas ao centro. Se não houver dados para uma entrada específica, um hífen deve ser inserido. Se uma explicação for necessária, uma abreviação pode ser usada no corpo da tabela (por exemplo, ND) e deve ser explicada claramente nas notas de rodapé. As referências às notas de rodapé em uma tabela devem ser especificadas por números sobrescritos, independentemente para cada tabela. Letras sobrescritas são usadas para designar significância estatística. Use uma letra minúscula *p* para indicar valores de probabilidade (ou seja, $p < 0,05$). A apresentação de erros padrão agrupados, a base geral para comparações estatísticas de médias, é recomendada quando a variação é homogênea. Eles devem ser apresentados em uma coluna ou linha separada. Erros padrão podem ser anexados a cada média por \pm sinais quando a variância ou SE é heterogênea (por exemplo, experimentos desequilibrados ou número desigual de observações nos meios de tratamento). O erro padrão combinado é a estimativa preferida do erro experimental, porque apresentar erros padrão individuais tende a desorganizar a tabela. Para a composição da dieta, os principais níveis de inclusão de ingredientes devem ser apresentados como uma porcentagem do total, e não em gramas ou quilogramas de alimento.

12) Figuras

As figuras devem ser colocadas no final do manuscrito com cada figura em uma página separada. As legendas das figuras devem ser digitadas (espaço duplo) em uma página separada.

As figuras devem caber em uma coluna (8 cm de largura) ou largura da página inteira (17 cm de largura). Recomenda-se um tamanho de tipo mínimo de 8 pontos (Times New Roman) para ser legível no tamanho final da publicação. Para tabelas contendo várias linhas, linhas sólidas, traço longo, traço curto e pontilhado devem ser usadas, enquanto linhas cinza ou sombreadas devem ser evitadas. Linhas com símbolos diferentes para os pontos de dados também podem ser usadas para distinguir curvas. Planos de fundo e linhas de grade desnecessários devem ser removidos dos gráficos. Cada eixo deve ter uma descrição e uma unidade. Para gráficos de barras, diferentes padrões de preenchimento podem ser usados, se necessário (preto, branco, cinza e listras). Curvas e pontos de dados devem ser identificados usando os seguintes símbolos (●, ○, ■, □, ◆, ◇, ▲, △, + e ×). Os símbolos devem ser definidos na legenda da figura ou em uma chave na figura. O tipo de arquivo preferido para figuras é JPEG, TIFF ou PPT. Para reproduzir figuras em escala de cinza (preto e branco), elas devem ser enviadas como tal. Se as figuras aparecerem em cores no diário de impressão, os arquivos deverão ser enviados em cores CMYK (não RGB). A resolução mínima é de 300 dpi para figuras coloridas e em escala de cinza e 600 dpi para arte de linha. As fotomicrografias devem ter o tamanho não ampliado designado na legenda ou com uma barra de escala na figura. Uma legenda deve ser preparada para fornecer informações suficientes e todas as abreviações, e os símbolos usados na figura devem ser definidos na legenda.

3. Outros tipos de manuscritos

Todos os outros tipos de manuscritos devem atender aos requisitos acima mencionados. Para requisitos adicionais para outros tipos de manuscritos, as seguintes diretrizes se aplicam.

1) Comentários

As críticas são convidadas pelo editor e devem ser análises abrangentes de tópicos específicos. Eles devem ser organizados da mesma maneira que um Artigo Original com um resumo não estruturado (300 palavras no máximo). O número de referências é limitado a 80.

2) Notas técnicas

Uma Nota Técnica é usada para relatar um novo método, técnica ou procedimento de interesse para os leitores do AJAS. Quando possível, uma Nota Técnica deve incluir uma comparação dos resultados do novo método com os resultados dos anteriores, usando testes estatísticos apropriados. As vantagens e desvantagens do novo procedimento devem ser discutidas.

Eles devem ser organizados da mesma maneira que um Artigo Original com um resumo não estruturado (máximo de 200 palavras). O comprimento do texto, excluindo referências, tabelas e figuras, não deve exceder 2.500 palavras. O número de referências é limitado a 15.

3) Editoriais

Os editoriais são convidados pelo editor e devem ser comentários sobre artigos publicados recentemente na revista. Os tópicos editoriais podem incluir áreas ativas de pesquisa, novas idéias e debates em todos os campos considerados de interesse dos leitores do AJAS. Os editoriais não devem exceder 1.000 palavras, excluindo referências, tabelas e figuras. As referências não devem exceder 5. É permitido no máximo 3 figuras, incluindo tabelas.

4) Resenhas de livros

As críticas de livros são solicitadas pelo editor. Estes cobrirão livros publicados recentemente, considerados de interesse para os leitores do AJAS. O formato é o mesmo dos editoriais.

5) Correspondência

A correspondência (cartas ao editor) pode ser uma resposta a um artigo publicado ou a uma peça curta e independente que expresse uma opinião. A correspondência não deve ter mais que 1.000 palavras de texto e 5 referências.

Resposta: Se a Correspondência for uma resposta a um artigo publicado, o editor-chefe pode optar por convidar os autores do artigo para escrever uma Resposta por Correspondência. As respostas dos autores não devem exceder 1.000 palavras de texto e 10 referências.

4. Uso de números

As regras a seguir abordam a formatação de números:

- Os números de um a nove devem ser digitados e numerais devem ser usados para 10 e acima.
- Os algarismos arábicos devem ser usados com unidades de medida abreviadas: 2 g, 5 d, US \$ 4,00, 3% e designações numéricas no texto: exp 1, grupo 3, etc.
- Os algarismos arábicos devem ser usados para expressar horários e datas: 08:00 h, 3 de setembro de 1985, etc.
- Em uma série que usa alguns números inferiores a 10 e outros superiores a 10, números devem ser usados para todos (ou seja, 2 Holsteins, 6 Charolais e 15 Friesians).

- Ao escrever um número grande que termina em vários zeros que representa uma aproximação, uma palavra deve ser usada para parte do número (ou seja, 1,8 milhão em vez de 1.800.000).
- Quando dois números aparecem adjacentes um ao outro, o primeiro deve ser escrito (ou seja, dez filhotes de 2 dias em vez de 10 filhotes de 2 dias).
- Uma frase não deve começar com um numeral. O número deve ser digitado e, quando possível, a frase pode ser reorganizada para eliminar longos números iniciais da frase.
- O sistema de relógio de 24 horas deve ser usado: 09:30, 13:40, etc. Os períodos de tempo devem ser expressos em horas quantitativas (por exemplo, 2 h 16 min). Os termos hora (h), minuto (min), segundo (s) e ano (ano) devem ser abreviados quando usados com um número no texto, mas explicitados quando usados sozinhos.
- Um hífen não deve ser usado para indicar inclusão (por exemplo, 12 a 14 mg ou semana 3 e 4, não 12-14 mg ou semana 3-4).

SMALL RUMINANT RESEARCH

Official Journal of the International Goat Association

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.1
• Editorial Board	p.1
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0921-4408

DESCRIPTION

Small Ruminant Research publishes original, basic and applied research articles, technical notes, and review articles on research relating to **goats, sheep, deer**, the **New World camelids llama, alpaca, vicuna and guanaco**, and the **Old World camels**.

Topics covered include nutrition, physiology, anatomy, genetics, microbiology, ethology, product technology, socio-economics, management, sustainability and environment, veterinary medicine and husbandry engineering.]

AUDIENCE

Research Scientists working on sheep, goats, deer and other small ruminants.

IMPACT FACTOR

2018: 1.210 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2019

ABSTRACTING AND INDEXING

Biological Abstracts
 Nutrition Abstracts and Reviews Series B
 Animal Breeding Abstracts
 Index Veterinarius
 Veterinary Bulletin
 Scopus
 Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

S.Y. Landau, Agricultural Research Organization Volcani Center, Bet Dagan, Israel

Honorary Editors-in-Chief

G.F.W. Haenlein, Newark, DE, United States

J.G. Boyazoglu †, Menton, France
Reviews and Special Issue Editor
G.C. Fthenakis, Karditsa, Greece
Statistics Editor
H. Voet, Rehovot, Israel
Associate Editors
Genetics
J.N.B. Shrestha, Sherbrooke, Quebec, Canada
Health and Welfare
G. Koop, Utrecht, Netherlands
T. Passler, Auburn, Alabama, United States
Lactation and Dairy Technology (products and quality)
N. Argov-Argaman, Rehovot, Israel
Nutrition
R. Bodas, Valladolid, Spain
S. Giger-Reverdin, Paris, France
Products (meat, wool and hair)
B.A. McGregor, Geelong, VIC, Australia
E. Piasentier, Udine, Italy
Production Systems and Sustainability
J. P. Dubeuf, Corte, France
Reproduction
N.H. Ing, College Station, Texas, United States
K.C. Lehloenya, Hatfield, South Africa
Editorial Advisory Board
H. Ben Salem, Ariana, Tunisia
B.A. Blacklaws, Cambridge, United Kingdom
J.M. Burke, Booneville, AR, United States
J.F. Capote Álvarez, Tenerife, Canary Islands, Spain
I. Cervantes, Madrid, Spain
L. Ekateriniadou, Thermi, Greece
M.H. Fahmy, Ottawa, ON, Canada
N.M. Fogarty, Parkes, NSW, Australia
S.P. Ford, Laramie, WY, United States
G. Freyer, Dummerstorf, Germany
M. Galina, Coyoacán, Mexico
E.G. Grünwaldt, Mendoza, Argentina
T. Kott, Praha, Czech Republic
G. Leitner, Bet Dagan, Israel
C. Li, Edmonton, AB, Canada
C. Ligda, Thermi, Greece
J. Miron, Bet Dagan, Israel
G. Moatsou, Athens, Greece
G. Molle, Olmedo, Italy
H.H. Montaldo, Coyoacán, Mexico
J.P. Muir, Stephenville, TX USA
Y.W. Park, Fort Valley, GA, United States
W.E. Pomroy, Wellington, New Zealand
D.P. Rasali, Burnaby, BC, Canada
A. Rodolakis, Nouzilly, France
J.F. Torres-Acosta, Merida, Yucatán, Mexico

GUIDE FOR AUTHORS

Novelty: Novelty and relevance to an international readership will determine if a manuscript has merit to be published in Small Ruminant Research.

Types of article

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

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. Reviews will often be invited, but submitted reviews will also be considered for publication. All reviews will be subject to the same peer review process as applies for original papers.

A Short Communication is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Submission of short communications is not encouraged. Short Communications may result from a request to condense a regular paper, during the peer review process. Results and Discussion are merged. Short Communications should not exceed 2,000 words, including figures, tables and references. The number of tables and figures should not exceed four.

A Technical Note is a report on a new method, technique or procedure falling within the scope of Small Ruminant Research. It may involve a new algorithm, computer program (e.g. for statistical analysis or for simulation), or testing method for example. The Technical Note should be used for information that cannot adequately be incorporated into an Original Research Article, but that is of sufficient value to be brought to the attention of the readers of Small Ruminant Research. The note should describe the nature of the new method, technique or procedure and clarify how it differs from those currently in use. It should not exceed 2,000 words.

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than 2 years old. Book reviews will be solicited. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Editor-in-Chief.

What is publishable: Papers on polymorphism studies will be considered only if they contain significant new information and have direct relevance to those species described in the aims and scope of this journal. Submissions on studies involving single-nucleotide polymorphism (SNP) only, without linking them strongly and experimentally to production traits, are not encouraged. Manuscripts with quantitative RT-PCR without multiple normalizer gene products will be declined at preliminary review.

Papers on the use of feeds in nutrition are publishable only if these feeds have more than local importance, which should be detailed in the introduction. In many studies of nutrition, the effect on animal performance of substituting a feed with another is investigated and the hypothesis is that no effect is anticipated. We recommend a power analysis to determine sample size before planning the study. If authors want to report that they have discovered no difference they should add confidence limits to the difference between the sample means: if the sample size is indeed too small, these limits will usually be too broad to be informative. If the authors' aim is to show no effect, then the usual rule for bioequivalence is that the 90%CI for the ratio between the two means needs to lie between 0.8 and 1.25.

Authors need to clearly state the experimental unit and degrees of freedom for the error term. With nutrition papers involving feeding animals in paddocks or pens with more than one animal, it is the number of paddocks or pens which determines the experimental units, not the number of animals in total, unless it is demonstrated that each animal takes independent foraging decisions.

Manuscripts that deal with the effects of plant secondary metabolites (PSMs) or plant extracts using in-vitro methods only are not published, unless if associated to a large-scale, long-term in vivo study. In studies with PSMs or plant extracts, advanced chemical analysis of the extracts should be documented. In vitro studies of the nutritional value of feeds are not in our scope unless they provide a background for in vivo studies in the same manuscript. Studies of the quality of semen, oocytes, embryos, following exposure to various materials (plant extracts, anti-oxidants, fatty acids and diluents) will be considered only if they are associated with in vivo evidence.

In the field of health, case reports presenting work in individual animals will not be considered. Only case reports presenting population medicine approaches will be considered for further evaluation on the condition that they have wide implications, well beyond their local interest, and good statistical evidence.

For products, we will consider studies on carcasses but not on the further processing of meat products for human food. Studies on the textile processing of fibres are also excluded. We will evaluate studies with milk as a whole entity, in the frame of a well-defined production system, and not as a generic commodity. Studies on the manufacture of ?milk products? as mixtures of milk components or fractionated milk with non-milk ingredients will not be considered for publication.

Papers on production systems will be considered only if their results can be connected to concepts and knowledge published elsewhere and/or extend them to scale up in genericity. Therefore, descriptive papers on production systems and local projects without connection to global development issues will generally not be considered. Special attention is given to the quality of methodological approaches and bibliographical references.

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the Elsevier Support Center. Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed

- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms sex and gender should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Small Ruminant Research.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official

records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/rumin/>

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

Article structure

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

Manuscripts in general should be organized in the following order:

Abstract

- Keywords (indexing terms), normally 3-6 items
- Introduction
- Material studied, area descriptions, methods, techniques
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgment and any additional information concerning research grants, etc.
- References

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author

actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

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

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information.

Authors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.

The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.

Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} .

Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O .

The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

*Electronic artwork**General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

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

Formats

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

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

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

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

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

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

Please do not:

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

Color**artwork**

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

Figure**captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

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

References**Web****references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data**references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/small-ruminant-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

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

Examples:

Reference to a journal publication:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:
Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

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

Reference to a website:
 Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:
 [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data

visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary

material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each

supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research

data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data

linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley

Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the

opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do

not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.