

Universidade Federal do Piauí

Diversidade genética de populações de ovinos Santa Inês no Meio-Norte do Brasil com marcadores de base única (SNPs)

Bruna Lima Barbosa

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

**Teresina
2015**

Bruna Lima Barbosa
Bacharel em Ciências Biológicas

**Diversidade genética de populações de ovinos Santa Inês no Meio-Norte do
Brasil com marcadores de base única (SNPs)**

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Barros Britto

Coorientador:

Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento

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

Teresina
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

B238d Barbosa, Bruna Lima.
Diversidade genética de populações de ovinos Santa Inês no meio-norte do Brasil marcadores de base única (SNPs) / Bruna Lima Barbosa. – Teresina: 2015.
52 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Fábio Barros Britto
Co-orientação: Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento

1. Estrutura Populacional. 2. Ovino Deslanado. 3. Microarranjos. 4. Polimorfismo de Base Única. 5. BeadChip OvinoSNP50. I. Título.

CDD 636.3

**Diversidade genética de populações de ovinos Santa Inês no Meio-Norte do
Brasil com marcadores de base única (SNPs)**

Bruna Lima Barbosa

Aprovada em: ____/____/____

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Cintia de Souza Clementino - UESPI

Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz – Embrapa Meio-Norte

Prof. Dr. Fábio Barros Britto - CCN/UFPI

(Orientador)

Dedico

À minha mãe, meu maior exemplo e força para seguir em frente e lutar pelo o que almejo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ser meu guia, força e luz nessa e em todas as caminhadas de minha vida. A Ele toda honra e toda glória!

À Universidade Federal do Piauí (UFPI) pela oportunidade de aprimoramento do conhecimento e formação profissional.

Ao Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento pelos conhecimentos e lições de vida e humildade transmitidas e ensinadas pelos excelentes professores e funcionários que compõem o quadro de profissionais.

A EMBRAPA Meio-Norte pelo material biológico fornecido.

A CAPES pela bolsa concedida para o desenvolvimento da pesquisa.

A equipe do LASO (Laboratório de Solos) - UFPI, pelo apoio e ensinamentos. A Yolly Marques por ter me ensinado as técnicas moleculares e, em especial, a Kaline Gonzalez por sempre, da forma mais calma e disponível, me ajudar em dúvidas e dificuldades que eu tive durante esse percurso.

A equipe do Laboratório de Genética Molecular e Conservação de Germoplasma da UFPI, *Campus* Cinobelina Elvas, em Bom Jesus, pelo apoio e, em especial a professora Katiene e Renan.

Ao Laboratório de Biologia Molecular, no Centro de Ciências da Natureza – UFPI, pelo fornecimento do espaço e equipamentos para a realização da etapa de quantificação das amostras.

Ao meu orientador, Fábio Barros Britto, pelos conhecimentos compartilhados e especialmente pela paciência, compreensão e ajuda. A quem aprendi a respeitar e admirar como professor, orientador e pesquisador. Um exemplo de dedicação para mim e muitos alunos.

Ao professor José Lindenberg Rocha Sarmiento pela contribuição e ensinamentos relacionados à pesquisa.

A professora Ângela Celis pela preocupação, dedicação e serenidade. Conselhos desde antes do mestrado e que com certeza fizeram toda a diferença! Uma mãezona para todos!!

A professora Lidiane Feitosa por me oferecer palavras de incentivo, força e ajuda da forma mais despretensiosa e amiga possível. Um ser humano e profissional admirável!

A professora Ana Paula Peron pelos conselhos e preocupação concedidos a mim. Muito do que me disse serviu para eu continuar a trilhar esse caminho.

Ao Daniel Biagiotti pelo material concedido a pesquisa, pela compreensão e ensinamentos sempre passados com muita paciência e compreensão.

Ao Márcio da Silva Costa pelas contribuições a pesquisa.

A minha mãe, Maria Senhora, por ser meu exemplo de guerreira e inspiração para conquistar tudo o que sempre almejou para mim. Sou e faço de tudo para ser como a senhora. És minha fonte de inspiração, minha força para seguir. Amor infinito!!!

Ao meu pai, José Barbosa, pela preocupação, compreensão e apoio. Te amo, pai!

A minha irmã Bianca por sempre me fazer sorrir com suas marmotas. Minha companheira! Sou muito feliz por ter você! Te amo muito!

Aos meus familiares pela compreensão e incentivo para seguir meus estudos e por sempre acreditarem em mim. Minha prima Jéssica por me escutar e aconselhar e muitas vezes enxugar minhas lágrimas, mesmo distante. Amo muito todos vocês!

As minhas amigas "Panteras" por todos esses anos de amizade, cumplicidade, diversão, lutas e companheirismo. Márcia Vieira, por sempre acreditar em mim, por ser uma das minhas maiores incentivadoras e também pelo carinho e dedicação que tens a mim. Lhaís Leal, pelas palavras de força, incentivo e por sempre estar ao meu lado. Lívia Martins, minha morena linda, por estar todos esses anos de estudo ao meu lado, pelas noites em claro sem perder a fé que conseguiríamos nossos objetivos. Obrigado por acreditarem em mim! Amigas, amo muito vocês!!!

Aos meus amigos de mestrado: Artemisa Borges por sempre está disposta a ouvir, ajudar e por transmitir tanta calma e fé. Um exemplo de dedicação. Marcones Costa pelo apoio e risadas que sempre me arrancava. Jesuíno Martins pelas palavras de incentivo e pelo apoio de sempre. Karla Anielle por compartilhar momentos de tensão sempre com uma palavra de motivação. Mário Henrique por escutar minhas reclamações e negativismos, sempre disposto a ajudar e Raimundo Borges por ser um exemplo de dedicação e compromisso. Amigos, pelos anos de dedicação e lutas juntos, um sempre dando força e incentivo aos outros. O meu muito obrigada! A melhor do mestrado!

Aos meus amigos de vida, os “Friends”, pela dedicação e amizade verdadeira e sincera por todos esses anos. Ao meu amigo Bruno Gomes que sempre esteve disposto a me ajudar e oferecer uma palavra de força, de fé e amizade. Te amo!

A pessoa maravilhosa, engraçada e sempre disposta a ajudar, Ana Marçal. Muito obrigada por tudo!

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais uma conquista em minha vida! Sou grata a todos!!

“A humildade é o que nos leva além”.

(DoM)

SUMÁRIO

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Panorama da ovinocultura mundial e do Brasil.....	16
2.2. Ovinos Santa Inês.....	19
2.3. O uso dos marcadores moleculares em estudos genéticos.....	22
2.4. Marcadores SNP.....	24
2.5. Diversidade genética em ovinos Santa Inês.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Amostragem e áreas de coleta.....	29
3.2 Extração de DNA.....	29
3.3 Quantificação.....	30
3.4 Genotipagem.....	31
3.5 Análise genética.....	33
4 RESULTADOS.....	36
4.1. Estimativas gerais de diversidade.....	36
4.2. Estimativas diversidade entre e dentro das fazendas amostradas.....	37
4.3. Inferências de estrutura populacional.....	38
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

RESUMO

BARBOSA, B.L. **Diversidade genética de populações de ovinos Santa Inês no Meio-Norte do Brasil com marcadores de base única (SNPs)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento), UFPI, Teresina, 2015.

Os ovinos da raça Santa Inês destacam-se em quase todas as regiões do Brasil por seu potencial adaptativo e reprodutivo. Embora a raça tenha registrado baixos índices produtivos, sabe-se que a mesma apresenta alto potencial genético. Porém, a busca de resultados imediatos faz com que diversos produtores realizem cruzamentos destes animais com raças exóticas, popularmente mais produtivas. Visando a conservação da raça Santa Inês e a aplicação deste patrimônio genético em futuros estudos de melhoramento, torna-se necessário avaliar a diversidade genética dos rebanhos disponíveis. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética de ovinos puros da raça Santa Inês em fazendas do Piauí e Maranhão, utilizando o chip de alta densidade *BeadChip OvineSNP50* da *Illumina*. Dos 54.241 marcadores de base única (SNPs) disponíveis, foram selecionados os que passaram no teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg (significância a 0,05), frequência do alelo menor (MAF) > 0,1, GC-score > 0,7, GT-score > 0,5 e desequilíbrio de ligação (LD com $r^2 > 0,05$), sobrando 1.747 SNPs. Foram genotipados animais de seis fazendas (uma em Floriano, PI; duas em Campo Maior, PI; duas em José de Freitas, PI; uma em Santa Inês, MA). Os dados observados nos SNPs selecionados indicaram valores médios de heterozigosidades observada e esperada de, respectivamente, 0,485 e 0,476. As estimativas de variação apresentaram valores negativos para o índice de fixação F, porém todos próximos a zero. O coeficiente de endogamia (Fis) mostrou-se não significativo (-0,023) e a estimativa de número de migrantes (Nm = 17,258) corroborou para a hipótese de que os baixos índices de endogamia ocorrem devido ao câmbio de animais entre as fazendas. A maior parte da variabilidade encontrada (95%, estimada pela AMOVA) está uniformemente distribuída entre as fazendas. Porém, por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e de análises Bayesianas para avaliação de estrutura populacional, observou-se a presença de dois perfis genéticos presentes entre as amostras. A maioria dos animais pertence a um grupo único, que apresenta baixa introgressão de material genético. Estes animais foram observados nos municípios de Floriano e Campo Maior, no Piauí, bem como em Santa Inês, Maranhão. Um segundo grupo de animais, encontrado nas fazendas de José de Freitas, PI, mostrou material genético mais heterogêneo, podendo haver cruzamentos destes com outros de regiões distintas.

Palavras-chave: Estrutura populacional, Ovino deslanado, microarranjos, Polimorfismo de base única e *BeadChip OvineSNP50*.

ABSTRACT

BARBOSA, B.L. **Genetic diversity of populations of Santa Inês sheep breed in Mid-North Brazil with single nucleotide polymorphism (SNPs) markers.** 2015. Dissertation (Master/Genetics and Breeding) - UFPI, Teresina, 2015.

The Santa Inês sheep stand out in almost all regions of Brazil for its adaptive and reproductive potential. Although the breed has registered low reproductive rates, it is known that it possess a high genetic potential. However, the search for immediate results has driven many breeders to cross these animals with exotic breeds, usually more productive. In order to promote the conservation of Santa Inês breed and the application of this genetic resource in future breeding studies, it is necessary the evaluation of the genetic diversity of the available flocks. In this context, the aim of this study was to evaluate the genetic diversity of purebreed Santa Inês sheep on farms of Piauí and Maranhão, using the Illumina high-density OvineSNP50 BeadChip. Of the 54,241 single nucleotide polymorphism (SNPs) markers available, only those that passed the Hardy-Weinberg equilibrium test (0.05 significance level), minor allele frequency (MAF) > 0.1, GC-score > 0.7, GT-score > 0.5 and linkage disequilibrium (LD, $r^2 > 0.05$) were selected, remaining 1,747 SNPs. Animals from six farms were genotyped (one in Floriano, PI; two in Campo Maior, PI; two in José de Freitas, PI; one in Santa Inês, MA). The data obtained from the selected SNPs indicated average values of the observed and expected heterozygosity, respectively, 0.485 and 0.476. The variation estimates were negative for the fixation index F , nearing zero. The inbreeding coefficient (F_{is}) proved to be not significant (-0.023) and the average number of migrants per generation ($N_m = 17.258$) corroborated the hypothesis that the low inbreeding rates are due to the exchange of animals between farms. The AMOVA showed that most of the variability found (95%) is distributed uniformly between farms. However, through the Principal Coordinates Analysis (PCoA) and Bayesian analysis of population structure, it was observed the presence of two genetic profiles present between samples. Most of the animals belong to a single group, which exhibit low introgression of the genetic material. These animals were observed in the counties of Floriano and Campo Maior, Piauí, as well as in Santa Inês, Maranhão. A second group of animals, found on farms of José de Freitas, PI, showed a more heterogeneous genetic material, enabling the cross of these animals with others from distinct regions.

Keywords: Population structure, hair sheep, microarrays, single nucleotide polymorphism and OvineSNP50 BeadChip.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fenótipo do ovino Santa Inês	20
Figura 2 - Mapa dos Estados do Piauí e Maranhão destacando os municípios onde foram realizadas as coletas nos ovinos Santa Inês	30
Figura 3 - Genotipagem com tecnologia <i>Infinium</i> da <i>Illumina</i>	32
Figura 4 - Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrando a distribuição das amostras nas três primeiras coordenadas da análise (Verde = Embrapa; Azul escuro = Chico Beca; azul claro = São José; Lilás = Santa Inês, MA; Vermelho = Campinas; Preto = Floriano).....	38
Figura 5 - (A) Representação gráfica do ΔK mais provável, calculado de acordo com Evanno; Regnault; Goudet (2005); (B) Designação das populações de Ovinos Santa Inês usando a estrutura baseada na alocação das amostras para $K = 2$	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das localidades e quantidades de animais genotipados.	29
Tabela 2 - Marcadores selecionados para as análises através do teste de Desequilíbrio de Ligação (LD)	35
Tabela 3 - Média e erro padrão para diversas estimativas ao longo de cada <i>locus</i> em cada População. (N = número de indivíduos; Ho = Heterozigosidade observada; He = Heterozigosidade esperada; uHe = Heterozigosidade esperada com fator de correção para tamanho amostral $[2N/(2N-1)]$; F = índice de fixação de Wright $[1-(Ho/He)]$).....	36
Tabela 4 - Análise Molecular de Variância (AMOVA) e estatísticas F para avaliação da variabilidade genética entre e dentro dos locais amostrados.....	37

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos (*Ovis aries*) foram um dos primeiros grupos de animais a serem domesticados (RYDER, 1989). Possuem ampla distribuição em quase todas as regiões do mundo devido a sua grande capacidade adaptativa. Esses animais servem como fonte de alimento, proteção e tração ao homem e, com o tempo, passaram por modificações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, através da seleção natural e antrópica (KIJAS et al., 2012; McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010; MARIANTE; CAVALCANTE, 2006; VIANA, 2008).

Introduzidos no Brasil por colonizadores portugueses e espanhóis, esses pequenos ruminantes foram se adaptando às condições ambientais do país e adquirindo características próprias, sendo chamadas de raças “Crioulas”, Locais ou naturalizadas (EGITO et al., 2002). Destacaram-se, inicialmente, na produção laneira da Região Sul do país, até que, em meados dos anos 90, uma crise mundial da lã, levou os produtores a investirem na produção de corte (VIANA, 2008).

Segundo levantamentos do ano de 2013 (IBGE), o rebanho brasileiro é constituído de 17.290.519 cabeças desses animais, sendo a região nordestina representada por 56,53% deste efetivo. Nos estados desta região, o Piauí ocupa o terceiro maior rebanho. Dentre as principais raças, destacam-se a Morada Nova, Somalis Brasileira, Bergamácia, Cariri, Rabo Largo e Santa Inês. Esta última com grande potencial adaptativo, genético e de porte apreciável, tendo se expandido para outras regiões do país (BIAGIOTTI et al., 2015; MACHADO, 2000; SANTOS; SALLES; VALGUEIRO, 2001).

Os ovinos Santa Inês possuem carne e peles de qualidade. São prolíficos e com fêmeas com ótima habilidade materna, porém apresentam produtividade reduzida, o que vem levando produtores a cruzar esses animais com raças especializadas, visando aumento de produção. Esses cruzamentos vêm sendo realizados, em sua maioria, de forma desordenada, podendo levar a problemas com a diversidade genética do Santa Inês (ARCO, 2010; ARCO, 2014; BIAGIOTTI et al., 2015; CARTAXO et al., 2008; SANTOS; CUNHA; BUENO, 1999; SOUSA; LOBO; MORAIS, 2003). O planejamento e execução de programas de melhoramento com objetivos claros, em conjunto com os produtores e instituições de pesquisa, aparece como uma forma de conservação da variabilidade genética desses ovinos, bem

como fornecer animais com as características superiores desejadas (MORAIS, 2000).

Há vários estudos envolvendo características de interesse de raças de ovinos, incluindo a Santa Inês. Dentre os temas de investigação encontram-se morfometria (BIAGIOTTI et al., 2013; COSTA JÚNIOR et al., 2006; McMANUS et al., 2013; TORRES, et al., 2013), resistência a parasitas (COSTA; SIMÕES; CORRÊA, 2011; SCZESNY-MORAES et al., 2010), teste de parentesco (HEATON et al., 2014), filogenia (MEADOWS et al., 2007) e estudos de diversidade genética com diversos marcadores moleculares (CARVALHO, 2013; CORRÊA, 2013; MARQUES, 2014), incluindo os de polimorfismo de base única (SNPs) (GRASSO et al., 2014; KIJAS et al., 2009, 2012; OLIVEIRA, 2014; TOLEDO, 2014).

A utilização de marcadores moleculares surge como uma ferramenta para avaliar a variabilidade existente em animais de relevância econômica, podendo visar o melhoramento genético dos mesmos. O surgimento de novas tecnologias de sequenciamento, baseadas em microarranjos tem possibilitado a análise de grande quantidade de marcadores em um menor espaço de tempo que o sequenciamento de Sanger, gerando grande quantidade de dados (CAIXETA et al., 2013). Porém, estudos de diversidade genética, especialmente os relacionados à raça Santa Inês, com o uso de microarranjos de SNPs são ainda escassos.

No presente estudo objetivou-se estimar os parâmetros de diversidade genética intra e interpopulacional de ovinos Santa Inês puros, criados no Meio-Norte do Brasil baseados na utilização de microarranjos de marcadores de base única (SNPs) como forma de ampliar o conhecimento local sobre a raça e, assim, contribuir para o melhoramento e para a preservação de sua variabilidade genética regional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Panorama mundial e nacional da ovinocultura

A espécie *Ovis aries* foi uma das primeiras a serem domesticadas pelo homem (RYDER, 1989), tendo provável origem no Oriente Médio há aproximadamente 8000-9000 anos (LEGGE, 1996). Com o tempo, o processo de domesticação desses animais levou a mudanças em sua morfologia, fisiologia e comportamento (KIJAS et al., 2012; MARIANTE e CAVALCANTE, 2006). Sua criação fornecia vários benefícios ao homem como alimento, através da carne e, mais tarde, pelo leite; além de proteção e abrigo com o uso da lã, peles e fibras extraídas (McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010; VIANA, 2008).

A criação de ovinos, seja para fins econômicos ou de subsistência, tornou-se presente em quase todos os continentes de maneira uniforme, chegando a aproximadamente um bilhão de animais, sendo a espécie com maior número de raças catalogadas, segundo dados da FAO (2013). A capacidade de adaptação a diferentes climas, relevos e vegetações, resultado do processo de domesticação e posterior seleção, é um dos fatores que possibilitaram esse sucesso em expansão mundial (KIJAS et al., 2012; McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010; VIANA, 2008).

Os maiores efetivos de ovinos encontram-se nas regiões da China, Índia e Irã, seguidos pela África, Europa e Cáucaso, que dispõem de 15% do rebanho, e América Latina e Caribe que representam 8% do efetivo mundial (FAO, 2013). Austrália e Nova Zelândia possuem uma produção altamente tecnicizada o que os tornam os maiores produtores de carne e lã ovina. A Europa tem seus produtos destinados à fabricação de queijos refinados e a América do Sul à produção de lã e carne de alcance internacional, sendo Argentina e Uruguai os maiores produtores de lã desse continente (FAO, 2013; VIANA, 2008).

De acordo com o relatório de perspectivas alimentares da FAO (2013), para os anos de 2014 a 2015, a comercialização de carne ovina se mantém em declínio, ocupando a quarta posição em um *ranking* em que a carne de aves é o principal produto comercializado mundialmente (43% do total do mercado), seguido da carne de bovinos e suínos. A produção oriunda de ovinos é considerada de rentabilidade reduzida para alguns produtores, devido ao investimento com instalações, medicamentos, manutenção do rebanho e alimentação (FERGUSON et al., 2011).

Do ponto de vista nacional, a ovinocultura teve importância desde a chegada dos primeiros animais junto com os colonizadores portugueses e espanhóis na América do Sul (EGITO et al., 2002) e foram introduzidos diretamente no Brasil pelo Paraguai e Argentina (McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010). Apesar de controvérsias, os animais provavelmente introduzidos, posteriormente denominados como raças, foram os grupos genéticos Churra, Churra Bordaleira, Merino e Lacha (MARIANTE e CAVALCANTE, 2006). Esses animais, gradativamente, foram sujeitos à seleção natural e adquiriram características de adaptação às condições dos diferentes Biomas do país de forma mais efetiva que as outras espécies de animais que também desembarcaram em terras brasileiras. As raças naturalizadas passaram a ser chamados de “Crioulas” ou raças locais (EGITO et al., 2002).

A região Sul, mais especificamente o Estado do Rio Grande do Sul, destacou-se com o maior rebanho de ovinos lanados e como o maior produtor de lã (DE ZEN et. al., 2014). No entanto, em meados dos anos 90, ocorreu a chamada crise da lã, devido à valorização de tecidos sintéticos pelo mercado internacional e aumento das terras de cultivo de grãos. Esse fato refletiu negativamente na produção do Estado. Houve redução no número de animais e, conseqüentemente, isso levou alguns produtores a desistirem da atividade e seguirem outro rumo econômico: a produção de carne (DE ZEN et. al., 2014; VIANA, 2008). Com o passar do tempo, os sulistas voltaram a investir na produção de lã de forma menos expressiva, visando também a produção de carne. Portanto, destacou-se a busca por animais com dupla aptidão (DE ZEN et. al., 2014).

A produção ovinos de corte se expandiu e a região Nordeste, antes voltada apenas à subsistência, destacou-se nesse mercado do país. As condições adversas como temperaturas altas, baixa disponibilidade de água, tipo de alimento e o clima tropical não foram obstáculo para a adaptação dos animais por terem grande rusticidade (CODEVASF, 2015; DE ZEN et. al., 2014). Os animais da região são, principalmente, de raças nacionais adaptadas deslanadas, resultantes do cruzamento com raças exóticas introduzidas na colonização, e, além do potencial adaptativo, apresentam boas características de carcaça e carne de qualidade (ZAPATA et al., 2001).

Segundo dados do IBGE (2013), o rebanho brasileiro de ovinos compõe 17.290.519 animais. A região Nordeste apresenta o rebanho mais numeroso dentre as regiões do país, representando aproximadamente 56,53% do total. A região Sul,

historicamente apresentada como grande produtor de lã, atualmente, constitui apenas 29,99% do rebanho do país, porém ainda destaca-se como o segundo maior número de animais do gênero. Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí possuem os rebanhos de maior representatividade no Nordeste (MAPA, 2015). O Piauí é quarto nessa região em número de ovinos com 1.205.232 cabeças. O Estado do Maranhão dispõe de 233.090 ovinos desse efetivo regional, sendo o sétimo no *ranking* (IBGE, 2013).

Mesmo sendo a região com o maior número animais, a produção de ovinos é baixa, devido ao fato de ser mais voltada à subsistência da população do que a um sistema com finalidades de produção. Além desse fator, podem ser citados o pequeno tamanho das propriedades, baixa disponibilidade de forragem no período seco, aliados ao baixo potencial produtivo dos rebanhos e de práticas pouco adequadas de manejo alimentar, reprodutivo e sanitário (GUIMARÃES FILHO; ATAÍDE JÚNIOR, 2009).

De acordo com dados da Anualpec (Anuário da Pecuária Brasileira) de 2013, a produção no Nordeste apresentou um incremento de 23%, no Norte 54% e Sudeste com 56%. Mesmo com esse aumento, a produtividade de carne ovina ainda é deficitária e não atende ao mercado interno, que consome aproximadamente 204 mil toneladas por ano, sendo a produção nacional de apenas 174 mil toneladas, segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO). Nesse contexto, o Uruguai apresenta-se como o principal exportador de carne desse tipo ao Brasil, como também a Argentina, tendo os preços mais razoáveis, além de maior qualidade (ANUALPEC, 2013; DE ZEN et al., 2014).

Visando aumento de produtividade dos rebanhos de forma rápida, alguns produtores realizam cruzamentos com raças exóticas sem um sistema de melhoramento genético definido. Esse processo vem sendo conduzido sem a cautela necessária e sem um planejamento para manter o equilíbrio no número de animais nas populações de abate. Conseqüentemente, podem haver prejuízos futuros relacionados a características como adaptabilidade, sustentabilidade e qualidade dos produtos oriundos do animal. É necessário o investimento em organização de gestão, integração de produtores, indústrias e a participação de órgãos de pesquisa para melhor condução de um programa de melhoramento genético animal que foque também na conservação do patrimônio genético do país (MORAIS, 2000).

2.2. Ovinos Santa Inês

Em meados dos anos 90, devido à crise da lã, a ovinocultura de corte começou a despontar no mercado brasileiro, em detrimento da produção mista e laneira. Reprodutores de raças especializadas na produção de carne como a Hampshire Down, Suffolk, Ille de France e Texel começaram a ser importadas pelos criadores de animais da raça Corriedale, que possui dupla aptidão, para gerar cordeiros mestiços. Outros criadores utilizavam raças exóticas em cruzamentos absorventes (MORAIS, 2000). O processo de escolha da raça ideal aos fins de produção é o que mais influencia na qualidade e quantidade do produto final almejado, sendo esta seleção essencial para se obter alta produtividade em condições ambientais e ecologicamente adequadas, o que não é observado em uma única raça apenas (SOUZA; LOBO; MORAIS, 2003).

Nesse contexto, a raça Santa Inês que se desenvolveu nos anos 50 e era denominada de “pelo-de-boi”, já se destacava especialmente no Nordeste e chamava a atenção de produtores das regiões Sudeste e Centro-Oeste (MORAIS, 2000). Com o tempo, devido a seu potencial adaptativo e reprodutivo, a raça passou a estar presente em quase todas as regiões do país. Além da grande rusticidade, eles ainda são prolíficos, precoces e com boa habilidade materna, no entanto, apresentam baixa produtividade (ARCO, 2010; ARCO, 2014).

A adaptação às condições do semiárido nordestino faz que a região apresente o maior contingente de ovinos do Brasil. Destacam-se as raças Morada Nova, Somalis Brasileira, Bergamácia, Cariri, Rabo Largo e Santa Inês (MACHADO; 2000; McMANUS et al., 2014; SANTOS; SALES; VALGUEIRO, 2001). No Piauí, o Santa Inês apresenta destaque, resultado de sua adaptabilidade, porte e promissor potencial genético (BIAGIOTTI et al., 2015; CARTAXO et al., 2008).

Os ovinos Santa Inês são, provavelmente, resultantes de cruzamentos intercorrentes entre as raças Bergamácia, Morada Nova, Somálias e ovinos sem raça definida (SRD) que tiveram origem na Bahia, após períodos de seleção natural e seleção genealógica realizada por criadores e técnicos (ARCO, 2014; PAIVA, 2005). Porém, ainda é incerto a origem verídica, como afirmam Paiva et al. (2003), que aproximam a Santa Inês da raça Rabo Largo, e Carneiro et al. (2010), que sugerem que o novo porte da raça pode ser devido a cruzamentos com animais Suffolk.

São deslanados com pelos curtos e sedosos. Os animais deslanados foram adquirindo pelos curtos em substituição a lã com o avanço do processo de

domesticação e seleção, sendo que os lanados tiveram o processo inverso (JACINTO; SOBRINHO; COSTA, 2004). De acordo com Primo (1999), a característica deslanada ou com pelos curtos desses animais sugere que tiveram origem nas regiões africanas de Angola e Nigéria. No Brasil, os animais com esse tipo de pelagem são representados pelas raças Morada Nova, Somalis e Santa Inês (JACINTO; SOBRINHO; COSTA, 2004).

Morfologicamente, o Santa Inês (Figura 1) é identificado pela presença de uma cabeça semi-convexa e mocha em ambos os sexos, orelhas longas e em forma de lança; tronco forte, grande e comprido, região dorso-lombar longa e retilínea com boa cobertura muscular; garupa ampla e comprida, cauda média afinando proporcionalmente; pernas fortes, firmes e com articulações fortes e bons prumos. As fêmeas possuem peso corporal variando de 40 a 90Kg e os machos podendo atingir até 120Kg. São encontradas com pelagem nas cores vermelha, preta, branca e chitada (ARCO, 2014; SOUZA; LOBO; MORAIS, 2003.)



Figura 1 - Fenótipo do ovino Santa Inês

Fonte: http://www.caprino-ovinocultura.com.br/site/santa_ines.php

Possuem aptidão para a produção de carne com pouca gordura e pele de qualidade (ARCO, 2012, 2014). Para uma produção de carne de qualidade é necessário que os produtores disponibilizem manejos nutricionais e sanitários de

qualidade, lembrando que essa melhoria do produto final, também é devido à genética do animal. No Brasil, a carne ovina, em sua maioria, é oriunda de animais que possuem baixa qualidade de carcaça. (McMANUS et al., 2013), daí a importância de estudos genéticos para aprimoramento da característica produtiva dos rebanhos nessas regiões (McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010).

Durante a estação seca na região semi-árida, a qualidade do alimento de animais, incluindo os ovinos, como a forragem é reduzida de forma significativa e a busca por medidas alternativas se torna interessante (WANDERLEY et al., 2002). Costa et al. (2012) realizaram um estudo em que a dieta com base em milho de ovinos da raça Santa Inês foi substituída por palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) que é bem adaptada ao solo e clima da região. Fizeram uma análise, por meio de um delineamento em blocos totalmente ao acaso, da qualidade da carne. Os resultados indicaram que houve redução no teor de lipídios na carne, o que levou os autores a afirmarem que a substituição alimentar pode ser em 100% para palma forrageira (fornecendo ainda água, vitamina A, energia e minerais aos rebanhos), sem alterar as características físicas e sensoriais dos animais e mantendo a qualidade do produto.

Os criadores têm realizado cruzamentos de animais de raças nativas, que apresentam rusticidade, prolificidade e resistência a parasitas gastrointestinais, como a Santa Inês, com raças exóticas como a Suffolk e Ille de France, as quais apresentam características como produtividade elevada, para obterem animais que produzam, em maior quantidade, carne e peles de qualidade, dentre outras. No entanto, esse sistema tem sido executado de forma desordenada, o que influencia no tamanho populacional desse grupo de animais (GUIMARÃES et al., 2012). Esses visam à exploração da heterose e pode levar a resultados insatisfatórios e ameaçando a conservação da diversidade genética dessa raça por meio da erosão genética ou, em casos mais severos, a extinção (BIAGIOTTI et al., 2015; CARTAXO et al., 2008; DICKERSON, 1970; SANTOS; CUNHA; BUENO, 1999; SOUSA; LOBO; MORAIS, 2003). Garcia et al. (2009) afirmam que os cruzamentos visando aumento de produtividade dos animais, devem ser baseados em pesquisas sobre o peso ideal para abate dos cordeiros e perfis genéticos das raças. O ideal é que esses cruzamentos ocorram baseados em programas de seleção com objetivos estabelecidos (NETO et al., 2010), podendo assim não só resultar na obtenção de

produtos com as características sugeridas, mas também na preservação da diversidade existente nos animais.

Sabendo da importância de ovinos como o citado aqui para o desenvolvimento do país, estudos de conservação de recursos genéticos, de manejo sanitário, controle de verminoses, caracterização fenotípica e molecular, dentre outros, são essenciais para um maior conhecimento e manutenção do patrimônio genético. Estudos de variabilidade genética das raças de ovinos são fundamentais para se conhecer a situação genética dos mesmos, informando tamanho da população, taxas de endogamia, filogenia, características relacionadas a doenças como as verminoses, entre outras. Nesse contexto, e devido à importância dos ovinos Santa Inês como fonte de variabilidade genética, análises com marcadores de alta cobertura do genoma, como os SNPs se mostram importantes para um maior conhecimento da espécie, bem como para a elaboração de estratégias de conservação das características da raça.

2.3. O uso dos marcadores moleculares em estudos genéticos

Com o desenvolvimento de técnicas do DNA recombinante e marcadores moleculares, pode-se incrementar a formação de genótipos superiores com informações oriundas diretamente do DNA (COUTINHO, ROSÁRIO; 2010). Marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico do DNA, que diferenciam dois ou mais indivíduos, sendo herdados geneticamente (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; MILACH, 1998). Os marcadores moleculares são numerosos e facilmente detectados no genoma (GRIFFITHS, 2005) e sua associação à técnicas tradicionais como a seleção fenotípica, auxiliam no melhoramento animal (DONATONI, 2012).

Os principais marcadores moleculares utilizados em análises zootécnicas são os RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), os microssatélites e, mais recentemente, os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* ou Marcadores de Base Única). O desenvolvimento fácil da técnica, avaliação eficaz, interpretação e análise dos dados são características fundamentais a serem avaliadas para a escolha do marcador molecular mais adequado à pesquisa a ser desenvolvida (CAIXETA et al., 2013).

Os marcadores de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP foram os primeiros a serem utilizados em estudos de interesse zootécnico,

no início dos anos 80 (CAETANO, 2009), além de também pioneiro como marcador baseado em hibridização (CAIXETA et al., 2013). São codominantes e baseiam-se na utilização de uma ou mais enzimas de restrição para o corte em pontos específicos da sequência de DNA gerando fragmentos de tamanhos diferentes, representando a presença e ausência de sítios de reconhecimento de enzimas de restrição em indivíduos distintos (BOLSTEIN et al., 1980; CAIXETA et al., 2013; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; GRIFFITHS, 2005).

Mesmo sendo abundantes no genoma, possibilitando a localização de um maior número de *loci* polimórficos com elevada robustez, é uma técnica demorada, com várias etapas de execução e que não possibilita automação, impedindo a geração de grande quantidade de dados, além de cara e que exige uma sonda específica para a hibridização, como também alta quantidade e qualidade do DNA (BOLSTEIN et al., 1980; CAIXETA et al., 2013). Utilizado para estudos de identidade genética e variabilidade, mapeamento comparativo e testes de paternidade (FALEIRO, 2007). Observa-se pouca utilização dos mesmos, atualmente, devido ao advento de marcadores com técnicas menos dispendiosas e com maior quantidade de dados e amostras genotipadas por análise, o que agiliza a obtenção de resultados.

Outro marcador codominante utilizado em pesquisas genéticas são os microssatélites, também chamados de SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou STR (*Short Tandem Repeats*) que são definidos como regiões dispersas do genoma compostas de números variáveis de repetições *in tandem*, de um a seis pares de base, sendo as mais comuns (CA)_n. Caracterizam-se por serem altamente polimórficos, com sequências flanqueadoras da mesma espécie sendo geralmente conservadas, com alta taxa de mutação e geralmente multialélicos, sendo bastante abundantes e distribuídos nos genomas de eucariotos, com reprodutividade e simplicidade do uso de PCR (CAIXETA et al. 2013; TAUTZ, 1989).

Os primeiros mapas genéticos de interesse zootécnico foram construídos com microssatélites (COUTINHO; ROSÁRIO 2010). Contudo, esses marcadores requerem a construção de uma biblioteca genômica, sequenciamento e desenho de *primers*, o que torna o trabalho mais demorado, caro e trabalhoso (BRAMMER, 2000; CAIXETA et al., 2013). Atualmente, as sequências disponíveis em bancos de dados permitem a confecção de *primers* específicos de forma menos laboriosa. Possuem aplicação em estudos de identidade genética, variabilidade dentro uma

espécie e em testes de paternidade, bem como na identificação de QTLs, análises de bancos de germoplasma, na Seleção Assistida por Marcadores e estudos de seleção genômica ampla (CAIXETA et al., 2013; FALEIRO, 2007).

Com os avanços tecnológicos e o desenvolvimento do sequenciamento automático possibilitou-se a detecção de um tipo de marcador molecular de alto desempenho, eficiência e custos baixos, os SNPs. Juntamente com as pequenas mutações *indels* (inserções e deleções), os SNPs representam a forma mais frequente de variação genética natural, geralmente, na maior parte dos organismos, e, desta forma, sendo muito utilizados como uma nova geração de marcadores moleculares com diversas aplicações (CAIXETA et al., 2013).

2.4. Marcadores SNP

SNPs são definidos como polimorfismos de um único nucleotídeo de uma sequência de DNA. Envolvem a substituição, adição ou deleção de um nucleotídeo, apresentando como base molecular as mutações de ponto, especialmente as transições e menos frequentes, as transversões. Podem ocorrer em regiões codificadoras, mas na maioria das vezes são observados em regiões intergênicas, sem função determinada (CAETANO, 2009; CAIXETA et al., 2013). A alteração de um nucleotídeo só pode ser considerada SNP se estiver presente em mais de 1% da população, se não, constitui uma mutação ao acaso (BROOKES, 1999).

Os polimorfismos de base única estão distribuídos de forma abundante por todo o genoma, ou seja, com alta variabilidade genética. Possuem a vantagem de serem mais estáveis que os outros marcadores, porém pouco informativos por serem geralmente bialélicos (dois alelos por *locus*), o que requer a utilização de uma grande quantidade desse marcador para o seu estudo em análises genéticas. Uma outra vantagem é a sua possibilidade de automação, que permite a análise de uma grande quantidade de indivíduos e de marcadores (*ultra-highthroughput genotyping*), utilizados na localização de QTL (*Quantitative Trait Loci*) (CAIXETA et al., 2013; REGITANO; VENERONI, 2009), os quais dão origem aos principais fenótipos de interesse econômico.

Aplicam-se em estudos de filogenia e mapeamento genético de características de interesse, de haplótipos e associativo com base no desequilíbrio de ligação de alta resolução (LEE et al., 2006), além da análise de estrutura populacional, e seleção assistida por marcadores. Possuem grande aplicação na

análise genética de doenças de características complexas e usos em farmacogenômica e dermatogenética, e, mais recentemente, têm sido utilizados em testes de parentesco em gado e ovinos e estudos de associação e seleção genômica ampla de várias espécies de animais domésticos (CAIXETA et al., 2013; HEATON et al., 2014; JANSEN, 2015; KIJAS et al., 2012; LEE et al., 2006; MATUKUMALLI et al., 2006; OLAZAR, 2013; OLIVEIRA, 2014).

Com o surgimento de novas técnicas de sequenciamento, promoveu-se a utilização de plataformas de genotipagem capazes de colher informação, em um único ensaio, de milhões de pares de bases, além de apresentarem maior vantagem quanto a custo por base e economia de tempo em relação ao sequenciamento de Sanger (CAIXETA et al., 2013; THE INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM, 2010). Consistem em microarranjos pré-definidos de moléculas de DNA que são quimicamente ligadas à suportes sólidos revestidas por compostos com carga elétrica positiva (OLAZAR, 2013).

As mais utilizadas atualmente para a genotipagem de SNPs são: *SNPstream* (Beckman Coulter), *GeneChip* (Affymetrix), *Perlegen Wafers*, *Molecular Inversion Probe – MIP* (Affymetrix) e *GoDLenGate* e *Infinium* da *Illumina*. A *SNPstream* utiliza extensão de *primers* com minisequenciamento e arranjo disposto em lâmina, processando grande quantidade de genótipos (4.600 a 3.000.0000) por dia, porém com número de SNPs menor comparado a outras plataformas de genotipagem. *Perlegen Wafers* e *GeneChip* são baseadas em processos de hibridização de oligonucleotídeos. A *Molecular Inversion Probe* analisa 10.000 SNPs por ensaio em arranjo de lâmina e extensão de *primer* por meio de minisequenciamento. As plataformas *GoldenGate* e *Infinium* baseiam-se no emprego de microarranjos e extensão de *primers* alelo-específicos, no entanto, a primeira utiliza PCR no passo de amplificação e pode genotipar apenas 1536 loci simultaneamente, enquanto a segunda dispensa amplificação via Reação da Cadeia de Polimerase e genotipa de centenas a milhares de polimorfismos de base única de forma simultânea (CAIXETA et al., 2013; ILLUMINA, 2006).

Com essas ferramentas a disposição e dada a importância dos estudos com SNPs em ovinos, atualmente, existe um Consórcio Genômico Internacional de Ovinos (ISGC) onde estão disponíveis dados (*HapMap Ovine SNP50 dataset*) de animais e raças identificadas, identificação de genótipos e SNPs, bem como informações que descrevem as posições dos mesmos (THE INTERNATIONAL

SHEEP GENOMICS CONSORTIUM, 2010; SHEEP HAPMAP AND ANIMAL RESOURCES, 2015). Para a execução desse projeto há a participação de países de todos os continentes, incluindo o Brasil, representado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde disponibilizam informações de 98 animais das raças domesticadas Morada Nova, Criola Brasileira e Santa Inês (SHEEP HAPMAP AND ANIMAL RESOURCES, 2015; TOLEDO, 2014).

Os painéis desses polimorfismos possibilitam estudos de diversidade genética entre e dentro de populações, estrutura populacional, endogamia, além da detecção de assinaturas de seleção, o que possibilita a identificação de regiões genômicas de interesse relacionadas a características quantitativas. Isso abre um leque de possibilidades e perspectivas para estudos de genética animal, bem com de conservação dessa diversidade (FAO, 2013).

2.5. Diversidade genética em ovinos Santa Inês

Por seu perfil com alta adaptabilidade, sobrevivência e reprodução, as raças naturalizadas, especialmente da região nordestina, são tão importantes para programas de conservação desses recursos genéticos e consequente preservação da variabilidade genética e seu uso no futuro (HALL; BRADLEY, 1995). Como já comentado, a mistura genética entre as raças pode levar a perdas de diversidade valiosas, demonstrados em várias pesquisas.

Em um estudo realizado por Paiva et al. (2005), os resultados mostraram que as raças naturalizadas apresentam maior diversidade genética quando comparadas com as comerciais. Paiva et al., (2003) afirmam que desenvolver uma estratégia visando o crescimento das informações sobre a variabilidade genética e origem das raças de ovinos com maior expressão no país pode reduzir o impacto da produção indiscriminada ocorrente no Brasil. Estudos da estrutura populacional através da estimação de número efetivo e taxa de consanguinidade são essenciais para compreensão da variabilidade existente e detectam se a raça encontra-se em situação de risco (ARRANDAS et al., 2012; TOLEDO, 2014). As condições precárias em que se desenvolve a produção dos ovinos no Nordeste brasileiro, em sua maioria, e os cruzamentos indiscriminados de raças naturalizadas com exóticas visando aumento de características produtivas, colocam em risco o patrimônio genético desses animais de tamanha importância ao desenvolvimento do país (RODRIGUES, 2009).

As incertezas sobre a origem da raça Santa Inês são base para várias investigações. McMANUS et al. (2010) sugere que vários eventos de introgressão gênica fizeram parte da formação de algumas características da raça e que à aproximam da raça Suffolk. Dados de Paiva et al. (2005) apontam para uma subestrutura da raça em "Velha" e "Nova Santa Inês", esta última apresentando maior porte e melhor cobertura de musculatura posterior e caracteres negativos como a menor resistência a parasitoses, qualidade de pelo inferior e ocorrência de doenças não características da raça como o *Scrapie*.

Outros estudos também visam aumentar o conhecimento acerca dos grupos genéticos animais e assim contribuir para programas de conservação de recursos genéticos. Os SNPs, juntamente com os marcadores microssatélites são os mais utilizados em estudos de variação genética, segundo Toro et al. (2008). A FAO, em conjunto, com a Sociedade Internacional de Genética Animal propuseram a confecção de um painel com informações de marcadores microssatélites de ovinos com dados oriundos de estudos do mundo todo, ou seja, a meta-análise dos dados. Isso traria maiores informações sobre a diversidade mundial desses recursos genéticos, e estudos já estão sendo realizados com a utilização de SNPs em painéis (PAIVA; McMANUS, 2012). A ampla distribuição nos genomas e o advento de plataformas de genotipagem de alta densidade tornaram os marcadores de base única ideais para estudos genômicos de diversidade (DING; JIN, 2009).

Kijas et al., (2009) identificaram o primeiro conjunto de SNPs do genoma ovino e que a formação de uma subestrutura populacional agrupa os ovinos quanto a sua origem geográfica. Anos mais tarde, com um conjunto amplo de amostras, Kijas et al., (2012) realizaram uma análise ampla do genoma a partir de um painel de diversidade global de 74 raças de ovinos com o intuito de caracterizar geneticamente esses animais pós domesticação e seleção. Constataram que a domesticação destes ocorreu sob uma ampla base genética de animais selvagens e que isso pode explicar o alto nível de diversidade de SNPs e a manutenção do grande tamanho efetivo populacional (N_e) verificado atualmente, na maioria das populações de ovinos. TOLEDO (2014), afirmando a importância dos trabalhos de Kijas et al. (2012), buscou aprofundar os conhecimentos sobre a estrutura populacional de raças brasileiras que não participaram desse estudo de âmbito mundial, como Santa Inês, Morada Nova, Somalis Brasileira, Barriga Negra e Rabo Largo, as principais raças deslanadas; e Crioula Lanada, Pantaneira e Bergamácia,

raças lanadas. Em suma, a caracterização genética de ovinos naturalizados brasileiros é fundamental para programas de melhoramento, manejo e conservação dos mesmos (PAIVA et al., 2005).

Visando a conservação desse importante germoplasma animal, o Programa de Conservação de Recursos Genéticos Animais, sob coordenação do Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) foi criado e elaborou as etapas que incluem a identificação das populações, caracterização genética e fenotípica, bem como a avaliação do potencial produtivo, sendo o germoplasma armazenado *in situ* ou *ex situ*. Essa importante iniciativa tem como objetivo ter informações suficientes para comparação de raças naturalizadas e conseqüentemente de sua conservação (EGITO et al., 2002).

Além dos exemplos citados aqui, há vários estudos envolvendo características de interesse da raça Santa Inês, dentre os temas de investigação encontram-se morfometria (BIAGIOTTI et al., 2013; COSTA JÚNIOR et al., 2006; McMANUS et al., 2013; TORRES, et al., 2013), resistência a parasitas (COSTA; SIMÕES; CORRÊA, 2011; SCZESNY-MORAES et al., 2010), teste de parentesco (HEATON et al., 2014), filogenia (MEADOWS et al., 2007), pedigree (TEIXEIRA NETO et al., 2013) e estudos de diversidade genética com diversos marcadores moleculares (CARVALHO, 2013; CORRÊA, 2013; MARQUES, 2014), incluindo os de polimorfismo de base única (SNPs) (GRASSO et al., 2014; KIJAS et al., 2009, 2012; OLIVEIRA, 2014; TOLEDO, 2014). Porém, os estudos sobre a raça com SNPs devem estar mais presentes no Brasil, incluindo os de diversidade genética que ainda são escassos, especialmente na região Nordeste.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e áreas de coleta

Para a realização dessa pesquisa foram utilizados ovinos puros da raça Santa Inês devidamente registrados na Associação Piauiense de Criação de Caprinos e Ovinos (APICCOV). O projeto foi cadastrado no comitê de ética da UFPI (Universidade Federal do Piauí) e, posteriormente, os objetivos da pesquisa foram esclarecidos aos criadores, que aceitaram participar do projeto, autorizando a coleta dos dados em sua propriedade. As localidades selecionadas, bem como os códigos que as identificam durante o texto, para o estudo encontram-se descritas na Tabela 1 e Figura 2.

Depois do registro dos animais no banco de dados, foi realizada a coleta de dados e de material biológico (pelos e sangue) do rebanho.

Tabela 1: Relação das fazendas e quantidades de animais genotipados.

Município	Fazenda	Nº de indivíduos
Floriano/PI	FL	21
Campo Maior/PI	CM1	42
	CM2	50
José de Freitas/PI	JF1	39
	JF2	63
Santa Inês/ MA	SI	56
TOTAL		271

3.2 Extração de DNA

Foram feitas extrações de DNA a partir de amostras de sangue retirado da veia jugular dos 271 animais em estudo. Estas foram coletadas em tubos a vácuo contendo anticoagulante, devidamente identificadas e armazenadas sob refrigeração no Laboratório de Genética Molecular e Conservação de Germoplasma da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Cinobelina Elvas, em Bom Jesus.

A extração do DNA foi realizada com o Kit de extração da Qiagen *DNeasy Blood & Tissue* segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Terminada a extração, a qualidade do DNA verificada em gel de agarose a 1% em tampão SB a 1× por 60 minutos a 60V. Os géis foram posteriormente visualizados e registrados

em fotodocumentador (*L-PIX Loccus Biotecnologia*). O DNA obtido foi estocado em freezer a -20°C até as análises subsequentes.

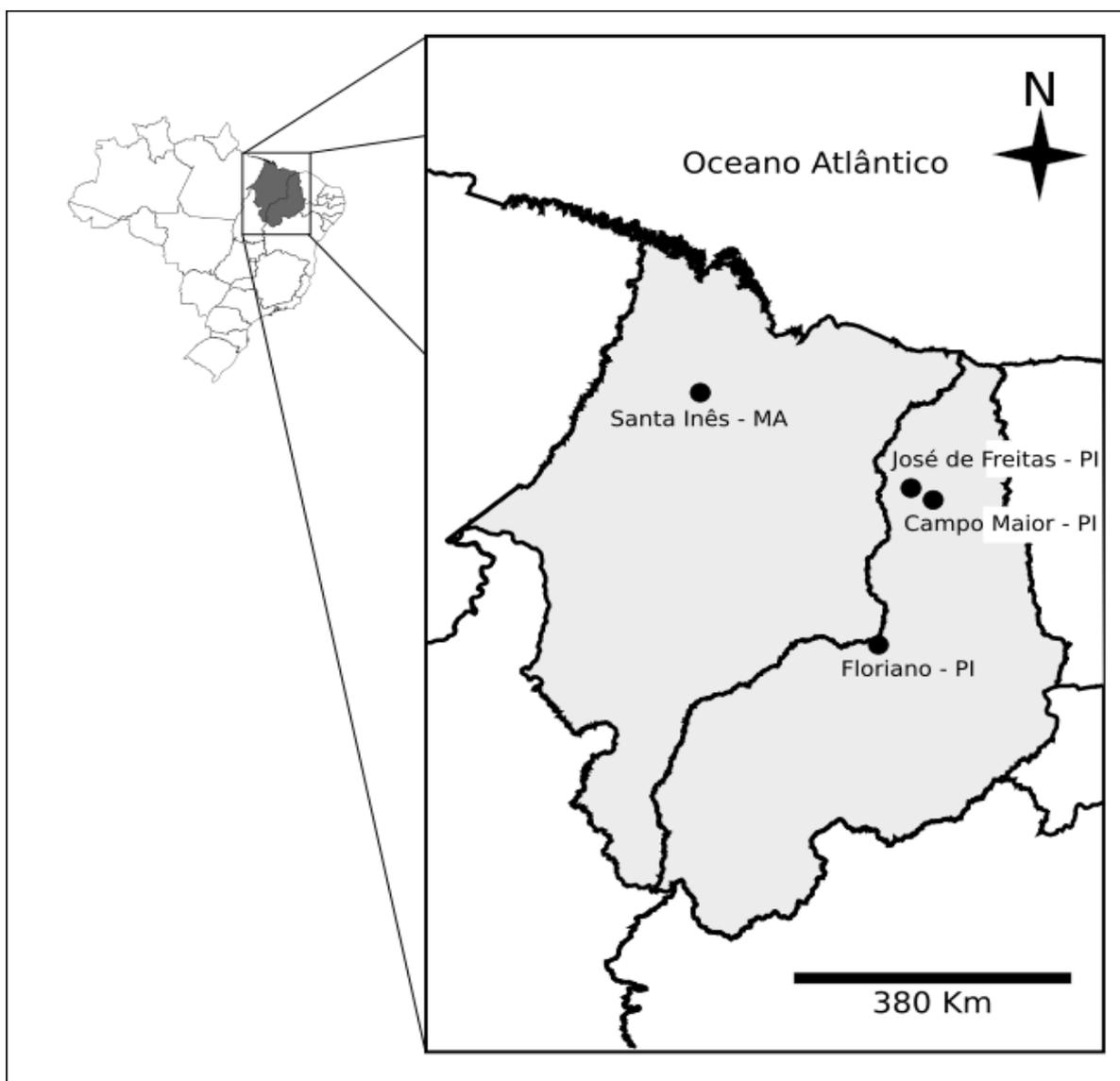


Figura 2. Municípios das fazendas: Floriano, PI; Campo Maior, PI; José de Freitas, PI; Santa Inês, MA.

3.3 Quantificação

A quantificação do DNA extraído das amostras foi analisada com a utilização do Fluorespectofotômetro *NanoDrop 3300* com o kit intercalante *AccueBlue dsDNA*, que forneceu a concentração de DNA das amostras, bem como seu grau de pureza. As amostras de DNA, bem como os reagentes que constituem o kit de

quantificação, foram retirados da geladeira para uso em temperatura ambiente, sendo os reagentes protegidos da luz durante os procedimentos.

Para o preparo da solução de trabalho, foram utilizados 19,6 µl de *AccuBlue Broad Range Buffer*, 0,2 µl de *AccuBlue Broad Range Enhancer* e 0,2 µl de *AccuBlue Broad Range Dye*, sendo essas quantidades referentes para uma amostra. Depois de homogeneizada, foram distribuídos 20 µl dessa solução em uma placa de PCR. Posteriormente, foram pipetados 1 µl dos DNAs de concentração padrão e 1 µl do DNA das amostras e ao fim da adição, homogeneizou-se, deixando a placa, coberta com papel alumínio, ao abrigo de luz por 15 minutos antes da utilização.

Passado o tempo para o fluoróforo *AccueBlue* reagir com as amostras de DNA, a curva de quantificação começou a ser calibrada, adicionando 2,0 µl das amostras no pedestal do quantificador. Após a calibragem, as amostras de DNA dos ovinos começaram a ser quantificadas. Planilhas do *EXCEL* foram geradas com os resultados referentes ao processo.

Após a quantificação, todas as amostras tiveram suas concentrações ajustadas, deixando em cada tubo a quantidade de 1,0 µg de DNA para os procedimentos de genotipagem.

3.4 Genotipagem

A genotipagem das 271 amostras foi realizada utilizando o chip de alta densidade *BeadChip OvineSNP50* contendo 54.241 SNPs uniformemente espaçados nos cromossomos. O chip de SNPs foi fabricado de acordo com a tecnologia *Infinium* da *Illumina*TM, usando a plataforma *iScan*. O protocolo de genotipagem foi seguido de acordo com que foi estabelecido pelo fabricante (disponível em www.illumina.com). Este consistiu nos seguintes passos principais: (1) amplificação isotérmica e (2) incubação das amostras (*overnight*); (3) fragmentação das amostras, (4) precipitação e ressuspensão, (5) preparação do *BeadChip* e (6) hidridização (*overnight*); (7) extensão enzimática de uma única base, (8) visualização das imagens na plataforma *iScan* e (9) resultados gerados (Figura 3).

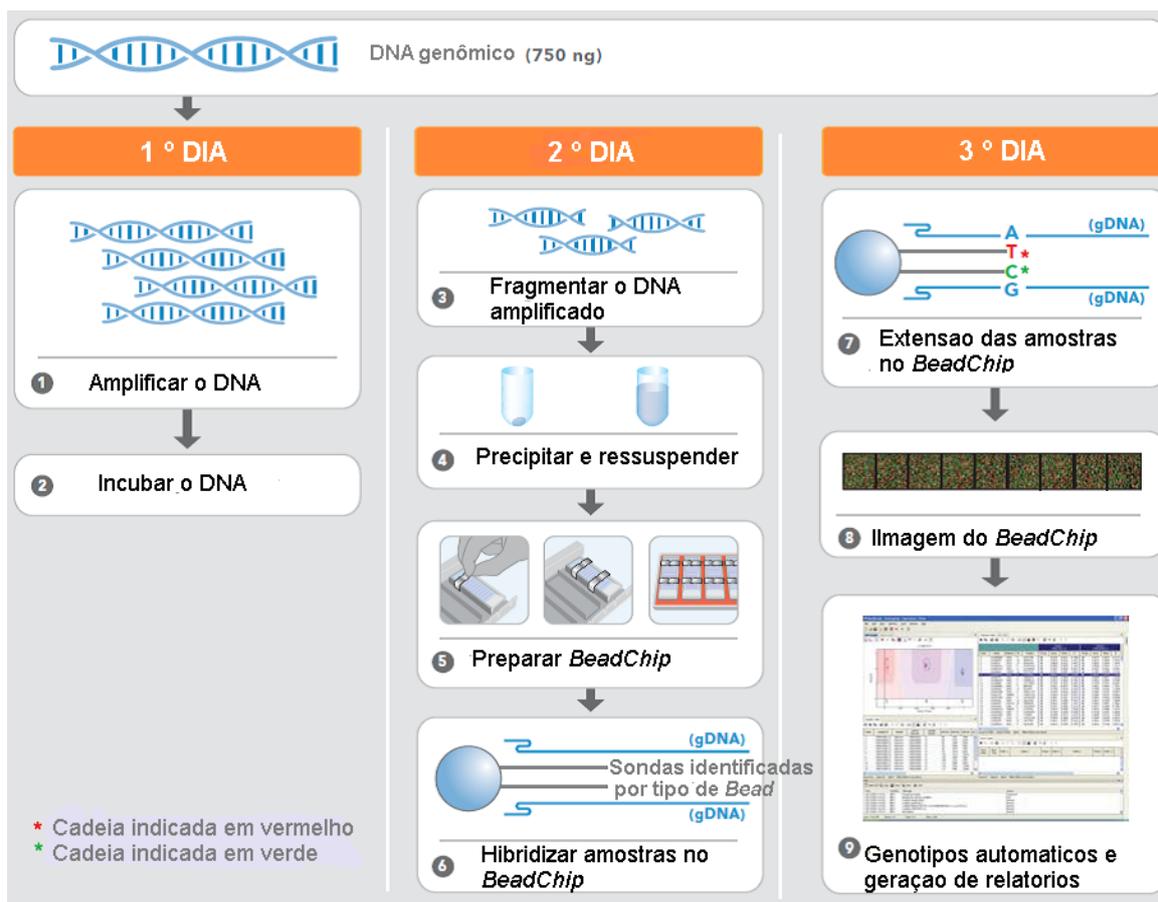


Figura 3 - Genotipagem com tecnologia *Infinium* da *Illumina*

Fonte: (<http://www.illumina.com>)

O processo de amplificação isotérmica visou aumentar à ordem de centenas de vezes a concentração do DNA, evitando assim, que esse fosse um fator limitante e influenciasse, de forma negativa, os resultados. O material sofre precipitação com álcool e ressuspensão. O DNA foi submetido à ação de enzimas do tipo *end-point* que fragmentam em locais específicos da sequência, evitando a quebra excessiva do DNA. Posteriormente a esses processos, o DNA genômico se anelou a 50 bases ligadas covalentemente a cada *Bead*, o qual representa um *locus* específico. A lâmina foi submetida a corantes que foram incorporados aos *Beads* e que permitiram a diferenciação dos genótipos. Por fim, os fluoróforos ligados aos *Beads* foram submetidos a um conjunto de *laser* que permitiu que o sinal de fluorescência fosse captado e analisado pela plataforma *iScan*.

3.5 Análise genética

De posse dos dados de genotipagem, foi realizada a triagem dos SNPs baseados em parâmetros como *GenCall* (GC), *GenTrain* (GT), Frequência do Alelo Menos Frequente (MAF), Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação (DL). As pontuações de GC estão correlacionadas com a qualidade dos resultados de genotipagem de cada amostra, já as pontuações GT mensuram a confiabilidade da detecção de SNPs na distribuição dos genótipos (FAN et al., 2003; OLIPHANT et al., 2002).

O controle de qualidade dos SNPs foi executado nos programas R (R CORE TEAM, 2015) versão 3.2.1 e PLINK (PURCELL et al., 2007). No *software* R, dos 54.241 marcadores, foram retirados os que não apresentavam GT score > 0,5 e, posteriormente, com GC score > 0,7, o que ocorreu em mais de 10% dos marcadores, restando, após restrição, 46.023 SNPs. Valores de GC acima de 70% indicam genótipos bem estabelecidos e, para pontuações GT mínima de 0,25, os SNPs podem ser conservados na análise (ILLUMINA, 2010).

Uma margem de erro de 5% foi considerada para dados ausentes devido a erros de genotipagem e, no programa PLINK, foram filtrados os dados de indivíduos com MAF < 10% e em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), considerando $P < 0,01$. Desvios do EHW e MAF baixos são desconsiderados das análises por poderem estar relacionados à má qualidade na determinação dos SNPs ou em sua designação (SALANTI et al., 2003; TABANGIN; WOO; MARTIN, 2009). Além disto, por se tratar de um estudo de diversidade, foram incluídos apenas os marcadores ligados a cromossomos autossômicos, restando 34.318 marcadores. Um indivíduo não foi considerado nos cálculos por apresentar mais de 5% de dados faltantes.

A estimativa do desequilíbrio de ligação (DL) foi realizada somente em SNPs a partir de regiões genômicas únicas, também no *software* PLINK. Com o teste de desequilíbrio de ligação ($r^2 > 0,05$) foram descartados 32.571 SNPs, sobrando para as análises subsequentes 1.747 SNPs (Tabela 2). r^2 é a correlação entre frequências alélicas em loci diferentes, sendo mais indicada para mensurar o DL (HARTL; CLARK, 2010).

Após a triagem dos marcadores mais informativos, foram calculadas estimativas Heterozigosidade Esperada (H_e) e Heterozigosidade Observada (H_o) para cada localidade, porcentagem de *loci* polimórficos (média do número de *locos* polimórficos pelo total de *locos*), estimativas F de Wright (F_{is} , F_{ct} , F_{it}), número

médio de migrantes em cada subpopulação a cada geração (Nm) baseados no Modelo Ilha de migração e análise de coordenadas principais (PCoA). Todos esses cálculos foram executados por meio do programa GenAEx versão 6.5 (PEAKALL e SMOUSE, 2012).

As estimativas F utilizam coeficientes de endocruzamento para medir a variabilidade intra e interpopulacional. F_{is} é o coeficiente de endogamia ou índice de fixação dentro dos indivíduos relacionados à população, que mensura a redução da heterozigosidade de um indivíduo devido a acasalamentos aleatórios na subpopulação. O coeficiente de endogamia dos indivíduos com relação ao total (F_{it}) e considera além dos acasalamentos ao acaso, a diferenciação no âmbito genético entre as subpopulações. O coeficiente de endogamia dentro da subpopulação com relação ao total (F_{st}) fornece a percentagem total da diversidade genética que está distribuída entre as subpopulações (WRIGHT, 1951).

A análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das populações e indivíduos, foi analisada no mesmo programa, utilizando 10.000 permutações para os cálculos. Esta levou em consideração o agrupamento das amostras *a priori* onde as mesmas foram organizadas por região, como segue: (a) Região Sul-Piauiense = amostras de Floriano, PI; (b) Região Central do Piauí = amostras de Campo Maior e José de Freitas, PI; (c) Região Leste do Maranhão = amostras de Santa Inês, MA.

Tabela 2 - Marcadores selecionados para as análises após teste de Desequilíbrio de Ligação (LD).

Cromossomo	Variantes Removidas	Variantes selecionadas
1	3713	196
2	3427	133
3	3090	141
4	1731	79
5	1443	94
6	1613	93
7	1411	65
8	1330	76
9	1284	55
10	1146	63
11	719	41
12	1077	63
13	1077	55
14	697	44
15	1008	62
16	889	46
17	863	51
18	864	51
19	743	47
20	712	46
21	562	38
22	688	46
23	1270	98
25	601	34
26	613	30
Total	32.571	1.747

O programa STRUCTURE versão 2.3.4 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), foi utilizado para definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras coletadas, por meio de métodos Bayesianos sem informações a “*priori*” sobre a origem das amostras. Foram utilizadas 100.000 simulações de Cadeias de Markov Monte Carlo com *burn in* de 50.000, modelo de ancestralidade *admixture*, e testados valores de K variando de 1 a 7. A determinação do K mais provável em relação aos propostos foi realizada utilizando valores de ΔK (EVANNO; REGNAULT; GOUDET, 2005), como segue:

$$\Delta K = \frac{m [L'(K+1) - L'(K)]}{s [L(K)]}, \quad \text{Onde } L: \quad L'(K) = \frac{L(K) - L(K-1)}{s [L(K)]}$$

Sendo m = média, s = desvio padrão, K = número de grupos propostos.

4 RESULTADOS

4.1. Estimativas gerais de diversidade

Os dados observados nos 1.747 marcadores selecionados indicaram valores médios de heterozigidade observada (H_o) de 0,486 e de heterozigidade esperada (H_e) de 0,476. A H_e e H_o variaram pouco entre as fazendas (Tabela 3), lembrando que foram selecionados apenas os marcadores que passaram no teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 3 - Média e erro padrão para diversas estimativas ao longo de cada *locus* em cada População. (N = número de indivíduos; H_o = Heterozigidade observada; H_e = Heterozigidade esperada; uH_e = Heterozigidade esperada com fator de correção para tamanho amostral [$2N/(2N-1)$]; F = índice de fixação de Wright [$1-(H_o/H_e)$]).

População		N	H_o	H_e	uH_e	F
Floriano – PI	Média	21	0,493	0,429	0,440	-0,141
	Desvio	-	0,003	0,002	0,002	0,005
Campo Maior – PI	Média	92	0,479	0,475	0,477	-0,009
	Desvio	-	0,002	0,001	0,001	0,003
José de Freitas – PI	Média	102	0,489	0,473	0,475	-0,033
	Desvio	-	0,002	0,001	0,001	0,002
Santa Inês – MA	Média	55	0,483	0,466	0,470	-0,035
	Desvio	-	0,002	0,001	0,001	0,003
Total	Média	67,5	0,486	0,461	0,476	-0,055
	Desvio	-	0,001	0,001	0,001	0,002

Com relação às estimativas de variação genética observou-se que, em cada local amostrado, houve valores negativos para índice de fixação F. Porém, todos ficaram próximos à zero, com exceção de Floriano (Tabela 3). O coeficiente de endogamia é baseado nas medidas de H_o e H_e . Valores negativos indicam quantidade de heterozigotos acima do que era esperado, o que pode descartar a endogamia como fator influenciador das mudanças nas frequências genotípicas (McMANUS et al., 2011). Aqui houve pouca variação entre os índices de heterozigidade, com uma H_o um pouco maior que a H_e .

4.2. Estimativas de diversidade entre e dentro das fazendas amostradas

Pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) pôde-se perceber que a maior parte da variabilidade genética encontrou-se uniformemente distribuída dentro das fazendas (95%). O alto valor obtido mostrou que as localidades não estão apresentando características genéticas marcadamente distintas. A variância entre regiões representou apenas 1% da variação total e, a variância encontrada entre as fazendas representou apenas 3% da variação. Considerando-se a explicação da variação baseada entre indivíduos coletados ao acaso (considerando a amostragem total), não foram observados valores significativos, com o componente de variância obtendo valor zero (Tabela 4). As estatísticas F realizadas mostraram valores baixos, embora significativos ($P < 0,05$), para a variação entre regiões (Fct), entre fazendas (Fst) e entre indivíduos coletados ao acaso considerando a amostragem total (Fit) (Tabela 4). O que representou baixa variação entre os ovinos das fazendas amostradas.

A análise para a estimativa de endogamia entre os indivíduos (Fis) mostrou valor de -0,023, sendo este não significativo ($P = 0,930$). Os dados também são concordantes com os valores obtidos para o número de migrantes por região por geração ($N_m = 17,258$; erro padrão = 3,445), mostrando fluxo significativo de animais entre fazendas e, portanto, apresentaram baixos níveis de endogamia.

Tabela 4: Análise Molecular de Variância (AMOVA) e estatísticas F para avaliação da variabilidade genética entre e dentro dos locais amostrados.

Fonte de variação	GL	SQ	Média dos Quadrados	Componente de variância	% Total	F (P valor)
Entre regiões*	2	4802,645	2401,322	5,455	1	Fct = 0,013 (0,004)
Entre fazendas	1	3299,510	3299,510	14,966	3	Fst = 0,047 (0,001)
Entre dois indivíduos escolhidos ao acaso	266	107421,127	403,839	0,000	0	Fit = 0,044 (0,044)
Dentro das fazendas em geral	270	114151,000	422,781	422,781	95	–
Total	539	229674,281		443,203	100	

* ver organização das regiões no Material e Métodos

4.3. Inferências de estrutura populacional

Por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA), as fazendas dos municípios de Floriano e Santa Inês foram representadas mais próximas entre si. As populações de Campo Maior e, em especial, José de Freitas, encontraram-se mais dispersas no gráfico (Figura 4). No entanto, apesar da clara distinção obtida entre as amostras no gráfico espacial, é importante ressaltar que a porcentagem de variância acumulada explicada pelas três primeiras coordenadas não ultrapassaram o valor de 18% (Valor por coordenada: C1 = 6,78%; C2 = 6,09%; C3 = 5,12%). Valores de variância acumulada superiores a 80% foram obtidos apenas após a 66ª coordenada.

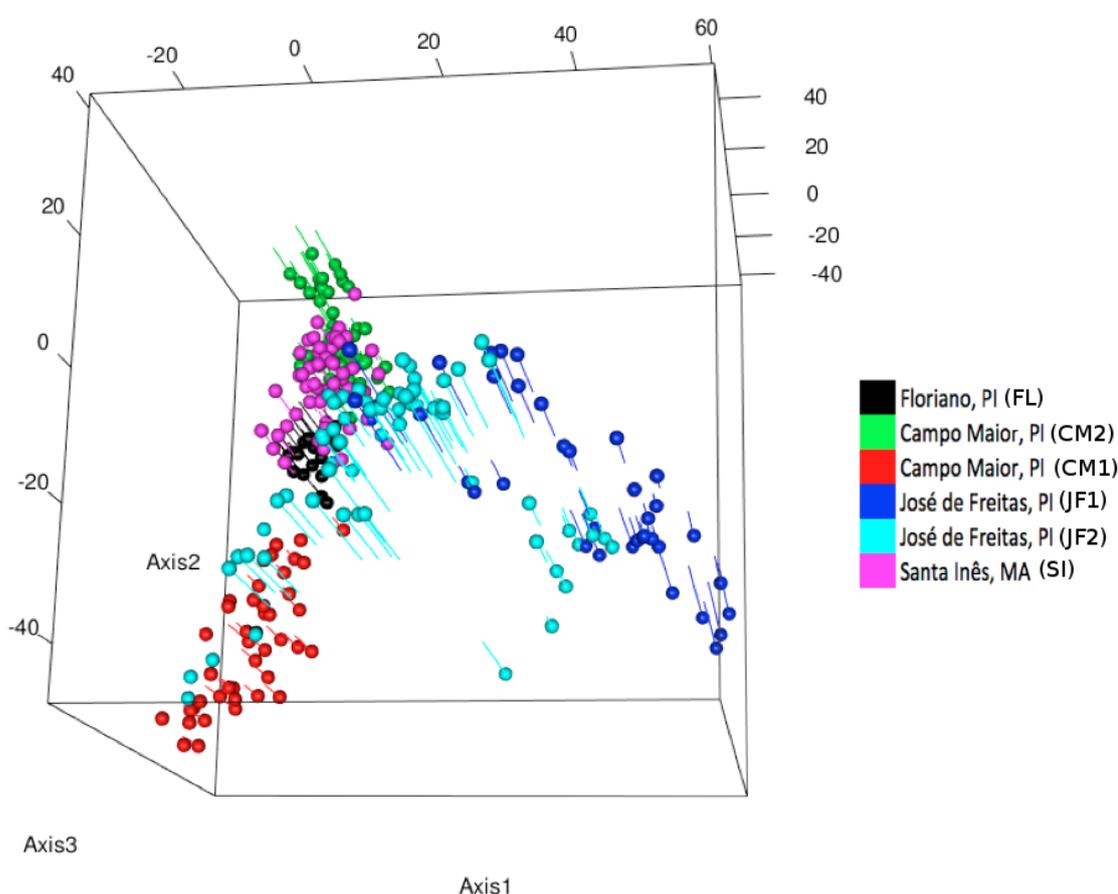


Figura 4: Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrando a distribuição das amostras nas três primeiras coordenadas da análise.

Os resultados das análises Bayesianas, realizadas no programa STRUCTURE, mostraram que o número de grupos genéticos mais provável para representar as amostras estudadas foi $K = 2$ (Figura 5A). O gráfico de barras mostrou a divisão dos

perfis genéticos gerados por município e por fazenda, onde observou-se que a maior parte das amostras formaram um grupo homogêneo constituído pelos municípios de Floriano e Campo Maior no PI, juntamente com Santa Inês, no MA (Figura 5B). Entretanto, as amostras de José de Freitas apresentaram-se bem heterogêneas, com destaque para JF1, que apresentou a maior parte dos indivíduos com perfil genético distinto das demais (Figura 5B). Estes resultados também podem ser observados pela dispersão dos indivíduos desta fazenda nas análises de PCoA (Figura 4).

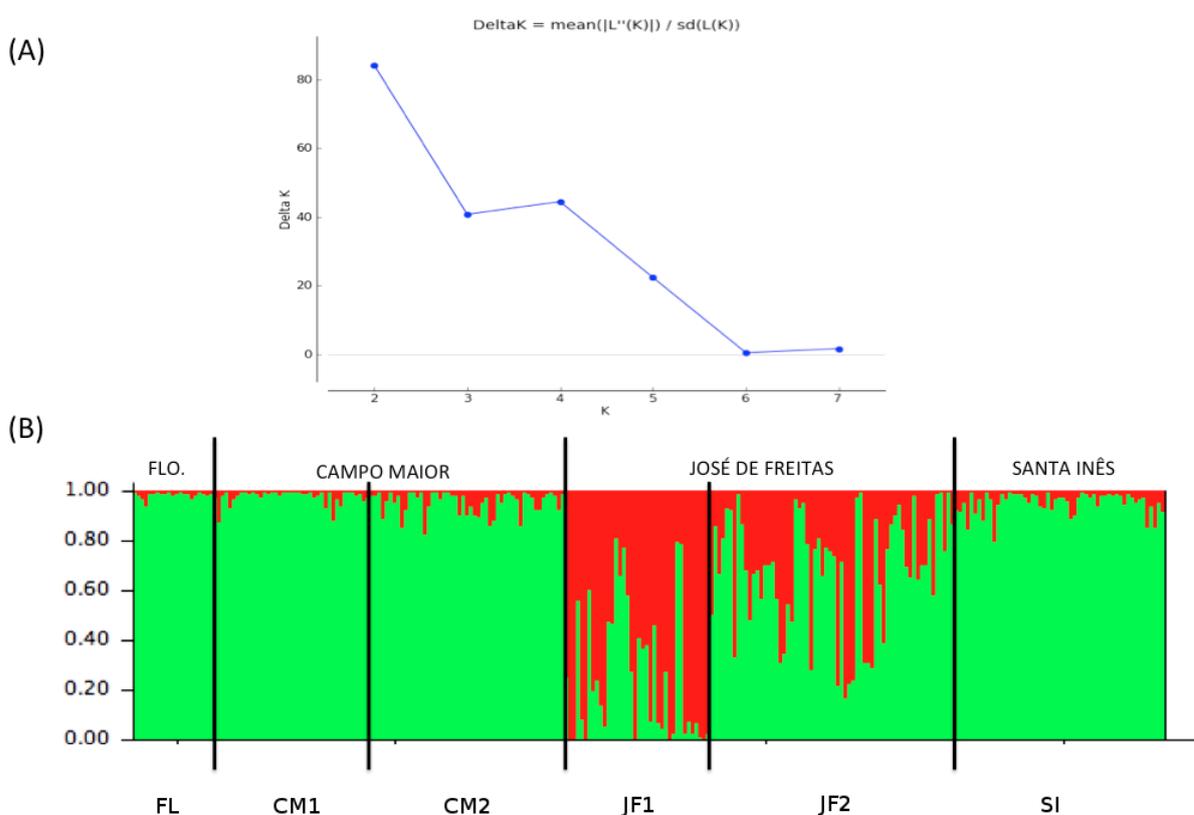


Figura 5 - (A) Representação gráfica do ΔK mais provável, calculado de acordo com Evanno; Regnault; Goudet (2005); (B) Designação das populações de Ovinos Santa Inês usando a estrutura baseada na alocação das amostras para $K = 2$.

5 DISCUSSÃO

Os polimorfismos genéticos apresentam relevância em análises das relações genéticas entre subpopulações de uma espécie (HARTL; CLARK, 2010). Estudos de parentesco entre ovinos mostram a importância dos SNPs nesse tipo de análise, onde informações oriundas de marcadores de base única podem auxiliar no planejamento de cruzamentos tecnificados, reduzindo valores expressivos de taxas endogâmicas e perda de alelos no melhoramento dos animais (McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010; VASCONCELOS, 2012).

Os valores médios de heterozigosidades observada e esperada para as populações de ovinos Santa Inês foram considerados altos, especialmente com relação aos animais de Campo Maior e José de Freitas. Dados de ovinos Santa Inês coletados de outros estados do Nordeste e Centro-Oeste também mostraram altos valores de heterozigosidade para a raça, também utilizando SNPs ($H_o = 0,34$ e $H_e = 0,34$) (TOLEDO, 2014). O mesmo trabalho mostrou que valores acima de 0,3 representam bom nível de polimorfismo. Sabe-se que a Santa Inês é considerada uma raça altamente polimórfica e com processos de introgressão recente com ovinos de outras raças (KIJAS et al., 2012; McMANUS; PAIVA; ARAÚJO, 2010; PAIVA et al., 2005).

As estatísticas F de Wright, bem como as análises de estrutura populacional mostraram que, no geral, os animais estudados não formaram grupos genéticos com correspondência às suas respectivas áreas geográficas. Os valores baixos dos coeficientes de fixação apresentados aqui sugerem diferenciação genética baixa entre as populações. Valores muito baixos de diferenciação genética estimada pelo F_{st} podem representar importantes níveis de diferenciação entre ou dentro de raças (McMANUS, 2011; WRIGHT, 1978). Alguns dados observados em outros estudos de ovinos apontam para a importância do uso de reprodutores externos nos acasalamentos, os quais contribuem positivamente para dissolver as diferenças entre rebanhos (TEIXEIRA NETO et al., 2013). Baixos valores para esses índices evidenciam a baixa estruturação populacional entre os animais analisados. Valores de F_{is} negativos e próximo a zero indicam baixa taxa endogâmica, devido a maior controle relacionado aos acasalamentos, por introdução de outros animais no rebanho podendo ser de raças exóticas ou não. Ademais, a existência de fluxo gênico entre as populações conta como o fator preponderante à manutenção do

tamanho efetivo populacional e conservação da variabilidade genética da Santa Inês. Segundo Paiva et al. (2003), baixos valores de diversidade genética podem estar relacionados à endogamia e deriva genética, porém, este fato não foi constatado no presente estudo.

Dados de pedigree em ovinos Santa Inês, no Piauí, mostraram que os índices de endogamia estiveram em ascensão até 2012 e que o monitoramento do tamanho efetivo populacional tem ajudado a diminuir esses índices e, conseqüentemente, manter a diversidade genética (REGO NETO, 2013). Nesta pesquisa, os valores de endogamia mensurados pelo Fis foram baixos e negativos (-0,023), corroborando com essa afirmativa. Isso remete a preocupação de alguns criadores em manter o tamanho da população de ovinos das raças o que, conseqüentemente, influi na variabilidade genética dos rebanhos visto que os valores de heterozigosidade foram considerados altos e os índices endogâmicos baixos.

Toledo (2014) reportou que o coeficiente de endogamia da raça Santa Inês apresentou-se como o menor dentre outras raças localmente adaptadas, que apresentaram valores de Fis inferiores a 10%, utilizando marcadores SNP. Em estudos utilizando outros marcadores moleculares (p. ex.: microssatélites) em rebanhos brasileiros de Santa Inês também ficou constatada variabilidade genética acentuada (MARQUES, 2014), sendo evidenciada, em outro estudo, a ocorrência de níveis endogamia acima de 5% em amostras de animais do Núcleo de Conservação da Embrapa de Sergipe (SOUZA et al., 2012).

As análises de número de migrantes médio entre as populações mostraram que as fazendas do presente estudo têm 17,3 migrantes a cada geração. Um fluxo gênico desta magnitude influencia diretamente no número de heterozigotos encontrados, que estão diretamente relacionados com o número esperado de acordo com as premissas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HARTL; CLARK, 2010). Por fim, entende-se que esse alto número de migrantes contribuiu para o fluxo gênico entre as populações analisadas, o que está relacionado à introgressão gênica. Mesmo com o fato dos rebanhos estudados serem fechados e constituídos em sua maioria por fêmeas, observou-se fluxo gênico o que pode ser reflexo do intercâmbio de animais entre as fazendas analisadas no município.

Corroborando com as estimativas de diversidade, os resultados obtidos com a AMOVA revelaram que a maior parte da variação encontrou-se dentro das populações (95%) e, além disso, remete a alta variabilidade encontrada dentro da

raça Santa Inês. Souza et al. (2012) obtiveram resultados em que AMOVA mostrou que a maior parte da variação encontrou-se dentro das populações, especialmente da Embrapa analisada (Núcleo de conservação de Sergipe), devido ao maior tamanho populacional dos animais. Os ovinos são reportados por terem altos níveis de diversidade genética e baixos níveis de diferenciação genética, o que é explicado por sua domesticação e seleção terem ocorrido sob uma ampla base genética de animais selvagens e seus tamanhos populacionais se manterem elevados com relação a outros animais domesticados (KIJAS et al., 2012).

Os dados obtidos pelas análises Bayesianas, realizadas no programa STRUCTURE, relacionados à análise de estrutura da população, agregaram as seis fazendas de ovinos estudadas em apenas dois grupos genéticos. Observou-se que as populações de Floriano-PI, Campo Maior-PI e Santa Inês-MA pertencem ao mesmo grupo, com baixa quantidade de introgressão de material genético. Essa similaridade também pode ser observada pela Análise de Coordenadas Principais, onde essas populações foram representadas mais próximas com relação às outras. A população de José de Freitas foi a mais heterogênea, com uma das fazendas pertencendo, praticamente, a outro grupo genético. Esta similaridade entre as fazendas do município, JF1 e JF2, que também apresentaram o maior tamanho populacional entre os municípios analisados, pode ser explicada pelo uso dos mesmos reprodutores entre os rebanhos. Ademais, as fazendas JF1 e JF2 encontram-se geograficamente próximas.

Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem subsídios para diversas investigações acerca da raça Santa Inês em municípios do Piauí e Maranhão, especialmente na área genética, onde os trabalhos com SNPs ainda são escassos. Os baixos índices endogâmicos reportados e consequente fluxo gênico entre os animais amostrados podem indicar uma possível preocupação de alguns criadores em conservar a variabilidade da raça Santa Inês com a realização de acasalamentos entre esses animais. Demonstra também a alta variabilidade já mencionada a Santa Inês (KIJAS et al., 2009; 2012) o que fornece base para estudos genéticos mais aprofundados, como os de associação genômica. McManus; Paiva; Araújo (2010) afirmam que, para estudos de associação com marcadores, é necessário que se realize estudos aprofundados da estrutura genética da raça devido a sua má definição fenotípica, característica que pode levar a identificação errônea em ecótipos, o que fortalece a importância desse estudo para futuras pesquisas. No

entanto, como é reportado em alguns estudos como o de Rego Neto et al. (2014), o número de registros de rebanhos da raça tem reduzido gradativamente nos últimos anos, o que se deve aos cruzamentos com raças importadas ou sua substituição integral por essas, visando maior produção de carne por alguns criadores. Isso é um risco potencial ao patrimônio genético da Santa Inês e a possível extinção da mesma. Nesse sentido, pesquisas sobre diversidade genética tornam-se importantes como meio de mensurar a variabilidade da raça e como forma de alerta e conscientização da necessidade de conservação da mesma.

6 CONCLUSÕES

- Os rebanhos estudados mostraram altos níveis de diversidade genética, mesmo com todos os animais sendo considerados puros. Isto reforça o potencial genético da raça em trabalhos de melhoramento, visando aumentar sua produtividade;
- A diversidade genética estimada entre as fazendas não mostra forte padrão de divisão genética com relação às áreas geográficas das amostras;
- Dois grupos genéticos foram identificados entre as fazendas, sendo um formado pela maioria dos animais pertencentes às fazendas do município de José de Freitas, PI, e o outro grupo sendo formado pelos demais rebanhos;
- Os valores baixos dos coeficientes de fixação sugerem que a baixa estruturação populacional está possivelmente relacionada com o intercâmbio de animais entre as propriedades ou pela aquisição de reprodutores da mesma fonte;
- A taxa de migrantes por geração, considerada alta, também evidencia fluxo entre os grupos genéticos e reforça a variabilidade da raça Santa Inês.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE, A. F. T. et al. Resistance of Santa Inês, Suffolk and Lle de France sheep to naturally acquired gastrointestinal nematode infections. **Veterinary Parasitology**, ed. 120, p. 91-106, 2004.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA PECUÁRIA , ANUALPEC, 2013 / Heloísa Poll ... [et al.]. – Santa Cruz do Sul : Editora Gazeta Santa Cruz, 128 p, 2013.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA, ANUALPEC. **Rebanho Ovino Brasileiro**. 282p. 2007.

ARANDAS, J. K. G. et al. . Estrutura Populacional de Ovinos da Raça Morada Nova. In: IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, **Anais...** João Pessoa. 2012.

ARCO, 2010. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. Disponível em: http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/jornais/jornal_ago2010.pdf. Acesso em: 29.04.2015.

ARCO. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos: Padrões raciais. Disponível em: http://www.arcoovinos.com.br/sitenew/racas_links/santa_ines.htm. Acesso em 08.01.2014.

BIAGIOTTI, D. et al. Diferenciação de populações ovinos encontradas no estado do Piauí. **Arquivos de zootecnia**, v. 64, n. 245, p.5-12, 2015.

BOISTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRAMMER, S. P. **Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal** . Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2000. 12p. (Embrapa Trigo. Documentos, 3).

BROKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2; p177-186, 1999.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia** , v.38, p.64-74, 2009.

CAIXETA, E. T.; FERRÃO, L. F. V.; MACIEL- ZAMBOLIM, E. Marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; FRITSCHÉ-NETO, R. **Biotechnologia aplicada ao melhoramento de plantas**:Suprema, cap.2, 336p., 2013.

CARNEIRO, H. et al. Morphological characterization of sheep breeds in Brazil, Uruguay and Colombia. **Small Ruminant Research**, v.94, p.58-65, 2010.

CARTAXO, F. Q. et al. Efeitos do genótipo e da condição corporal sobre o desempenho de cordeiros terminados em confinamento. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 37, n. 8, p. 1483-1489, 2008.

CARVALHO, K. S. S. **Diversidade genética de *Haemonchus contortus* em populações de pequenos ruminantes do Piauí**. 2013. 47p. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Genética e Melhoramento- Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2013.

CODEVASF, **Companhia de desenvolvimento dos vales do São Francisco e do Parnaíba**. Codevasf investe em tecnologia, equipamentos e pesquisa para fortalecer caprinovinocultura no semiárido baiano. 2015. Disponível em: <http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/codevasf-investe-em-tecnologia-equipamentos-e-pesquisa-para-fortalececer-caprinovinocultura-no-semiarido-baiano>. Acesso em 07.04.2015.

CORRÊA, T. da S. **Caracterização da diversidade genética de ovinos da região Norte do estado do Rio de Janeiro por meio de marcadores microssatélites**. 2013. 49p. Dissertação para a obtenção do título de mestre em produção animal na área de concentração de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2013.

COSTA, R. G. et al. Meat quality of Santa Inês sheep raised in confinement with diet containing cactus pear replacing corn. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 2, p.437-437, 2012.

COSTA, V. M.M.; SIMÕES, S. V. D.; RIET-CORREA, F. Controle das parasitoses gastrintestinais em ovinos e caprinos na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p.65-71, 2011.

COSTA JÚNIOR, G. da S. et al. Caracterização morfométrica de ovinos da raça Santa Inês criados nas microrregiões de Teresina e Campo Maior, Piauí. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.6, p. 2260-2267, 2006.

COUTINHO, L. L. do ROSÁRIO, M.F. **Biotecnologia animal. Estudos avançados**, v.24, n.70, p. 123-147, 2010.

DE ZEN, S. et al. Evolução da caprino e ovinocultura. **Ativos ovinos e caprinos**, ano 1, n. 1, 2014.

DICKERSON, G. Efficiency of animal production – molding the biological components. **J. Anim. Sci**, v. 30, p.849–859, 1970.

DONATONI, F. A. B. **Prospecção de SNPs por eletroforese capilar e sua identificação em genes candidatos relacionados à resistência de caprinos a nematoides gastrointestinais**. 2012, 93p. Tese (Mestrado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Arquivos de Zootecnia**, v. 51, p. 39-52, 2002.

EVANNO, G.; REGNAULT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, 2007. 102p.

FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH, FAO. 2013. **In vivo conservation of animal genetic resources**. FAO Animal Production and Health Guidelines, n. 14, Roma, 2013.

FERGUSON, M; KENNEDY, A; YOUNG, M. The and roads and efficiency and the and ewe and flock. **Recent Advances in Animal Nutrition**, v.18, p.37-43, 2011.

FERREIRA, M. E; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, 220p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Meteorologia e tensões políticas afetam os mercados de alimentos. Rome: FAO, 2014. Disponível em: <https://www.fao.org.br/mtpama.asp>. Acesso em 06.04.2015.

GARCIA, I. et al. Allometric study on carcass tissues from purebred Santa Ines lambs or crossbred with Texel, Ile de France and Bergamacia. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p.539–546, 2009.

GRASSO, A. N. et al. Genomic variation and population structure detected by single nucleotide polymorphism arrays in Corriedale, Merino and Creole sheep. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p.389-395, 2014.

GRIFFITHS, Anthony J.F., et. al. **Introdução à Genética**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 743p.

GUIMARÃES FILHO; ATAÍDE JÚNIOR, 2009 - **Manejo básico de ovinos e caprinos: guia do educador**/ Clóvis Guimarães Filho; Josvaldo.Rodrigues Ataíde Junior -- Brasília : SEBRAE, 2009.

GUIMARÃES, F. F. et al. Parâmetros populacionais de ovinos Santa Inês na região sul do Piauí. In: IX SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, **Anais...** João Pessoa. 2012.

HALL, S. J. G; BRADLEY, D. G. Conserving livestock breed biodiversity. **Trends in ecology evolution**, v. 10, p267-270, 1995.

HARTL, D. L.; A. G., CLARK. **Princípios de genética de populações**. Editora Artmed, 4ª edição, 2010.

HEATON, M. P. et al. SNPs for parentage testing and traceability in globally diverse breeds of sheep. **PLoS ONE**, v. 9, 10p., 2014.

HEGGEBØ, R. et al. Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. **Journal of General Virology**, v.83, n.2, p.479-489, 2002.

IANELLA, P. et al. Avaliação dos polimorfismos do gene PRNP ligados a scrapie clássica em núcleos de conservação de ovinos do Brasil. In: SIMPOSIO DE RECURSOS GENETICOS DA AMERICA LATINA Y EL CARIBE, 7., 2009, Pucon. **Proceedings...** Pucon: 2009. v.2, p.265-266.

ILLUMINA. 2006. **Infinium® II Assay Workflow**. Disponível em: <http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/workflows/workflow_infinium_ii.pdf> Acesso em: 06/07/2015.

ILLUMINA. 2010. **Infinium Genotyping Data Analysis**. Disponível em: http://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_infinium_genotyping_data_analysis.pdf. Acesso em: 06/07/2015.

IBGE. **Efetivo dos rebanhos do Brasil**. 2013. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2&z=t&o=24&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em 31.03.2015.

JACINTO, M. A. C.; SOBRINHO, A. G. S.; COSTA, R. G. Características Anátomo-Estruturais da Pele de Ovinos (*Ovis áries* L.) Lanados e Deslanados, Relacionadas com o Aspecto Físico-Mecânico do Couro, **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v. 33, n. 4, p. 1001-1008, 2004.

JANSEN, G. Dermagenética: a saúde da pele através de estudos dos seus genes, **Carta molecular**, n. 50. Disponível em: http://www.cartamolecular.com.br/arquivos/1/CM_50_NEW.pdf. Acesso em 19/02/2015.

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

KIJAS, J.W. et al. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. **PLoS Biology**, v.10, n.2, 2012.

LEE, M.A. et al. Establishment of a pipeline to analyse non-synonymous SNPs in *Bos Taurus*. **BMC Genomics**, v.7, 12p., 2006

LEGGE, T. The beginning of caprine domestication in Southwest Asia. **The Origins and Spreak of Agriculture and Pastoralism in Eurasia**. Ed. Harris DR (Univ College London, London), p. 238–262, 1996.

MACHADO, T.M.M. The native populations of Brazil: identification, standardization and preservation. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7, France, 2000. In: Proceedings... France: International Goat Association, p. 941-943, 2000.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: Raças domésticas da história do Brasil**. Brasília, 2ª ed. Embrapa. 2006.

MARQUES. I.T.O. **Caracterização da Diversidade Genética de Ovinos Santa Inês no Estado do Piauí**. 2014. 53p. Dissertação para obtenção do título de Mestre na área de concentração de Genética e Melhoramento - Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2014.

MATUKUMALLI, L.K. et. al. Application of machine learning in SNP discovery. **BMC Bioinformatics**, v. 7, 9p., 2006.

McMANUS, C.; PAIVA, S.; ARAÚJO, R. Genetics and breeding of sheep in Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 236 – 246, 2010.

MCMANUS, C.; PAIVA, S. **Estatísticas para descrever genética de populações**. Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira. Publicado on-line em www.animal.unb.br em 07.01.2011.

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.

MEADOWS, J. R. S. et al. Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. **Genetics**, v. 175, p1371 – 1379, 2007.

MEADOWS, J. R.; LI, K.; KANTANEN, J.; TAPIO, M.; SIPOS, W.; PARDESHI, V.; et al. Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. **J Heredity**, v. 96, p.494-501, 2005.

MILACH, S. C. K. Principais **Tipos de Marcadores e suas Características**. In: Milach, S. Marcadores Moleculares em Plantas. Porto Alegre: S. C. K. Milach, p. 17-28, 1998.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, MAPA, 2015. **Caprinos e ovinos**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>. Acesso em: 23/03/2015.

MORAIS, O. R. **Melhoramento Genético dos Ovinos no Brasil: situação e perspectivas**. In: III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2000, Belo Horizonte... Anais, Belo horizonte, p.266-271, 2000.

NETO, A. et al. Additive and non-additive genetic effects on growth, reproductive and maternal traits in sheep of Santa Ines, Brazilian Somali, Dorper and Poll Dorset breeds. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.1943–1951, 2010.

OLAZAR, M. R. R. **Uma metodologia para a descoberta de marcadores genéticos em estudos de associação**. 2013, 149p. Tese (Doutorado em

Engenharia Elétrica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

OLIVEIRA, P. S. **Estudo da diversidade genética e análise de associações de polimorfismo único (SNPs) com resistência às parasitoses gastrointestinais e prolificidade em ovinos da raça Santa Inês**, 2014, 113p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

OLIPHANT, A. et al. BeadArray technology: enabling an accurate, cost-effective approach to high-throughput genotyping. **Biotechniques**, v.32, p.56-61, 2002.

PAIVA, S.R. et al. Genetic variability of the Brazilian hair sheep breeds using RAPD-PCR markers. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, V. 40, p.887-893, 2005a.

PAIVA S.R. et al. Genetic variability among brazilian sheep using microsatellites. **The Role of Biotechnology**, Italy, p. 195-196, 2005d.

PAIVA, S. R. et al. Caracterização Genética da raça Santa Inês. In: 2ND International Symposium on Sheep and Goat Production, 2003, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, p. 487- 499, 2003.

PAIVA, S. R.; McMANUS, C. Utilização de marcadores moleculares na caracterização genética de ovinos. In: IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, **Anais...** João Pessoa. 2012.

PAIVA, S. R. (2005c). **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2005c. 118p. Tese (Doutorado) em Genética e Melhoramento.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, p.2537-2539, 2012.

PRIMO, AT. **América: conquista e colonização**. Porto Alegre: Movimento, 2004.

PURCELL, S. et al. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, 2007. Disponível em: <http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 115, p. 945-959, 2000.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2015. <http://www.R-project.org>.

REGO NETO, A. A. **Estrutura genética da população de ovinos Santa Inês no Estado do Piauí**. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal - CCA, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.

REGO NETO, A. de A. et al. Estrutura e distribuição geográfica do rebanho de ovinos Santa Inês no Estado do Piauí. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 2, p. 272-280, 2014.

REGITANO, L.C.A. de.; VERERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: II SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL, 6, 2009. **Anais...** São Carlos, SP, 2009.

RODRIGUES, D. S. **Estrutura Populacional de um Rebanho Morada Nova Variedade Branca no Estado do Ceará**. 2009. 45 f. Dissertação de Mestrado em Zootecnia - CCA, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

RYDER, M. L. **Sheep e Man**, Londres, 1983.

SANTOS, D.O.; SALLES, H.O.; VALGUEIRO, D.E.A. Mapeamento do efetivo caprino e ovino de raças naturalizadas do Nordeste do Brasil: Resultados parciais. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 2001, Londrina, **Anais...** SIRGEALC. Brasília-DF: Embrapa Recursos Genéticos, 2001. v. 3. p. 615-616.

SANTOS, L. E.; CUNHA, E. A.; BUENO, M. S. Atualidades na produção ovina em pastagens. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINOCULTURA E ENCONTRO INTERNACIONAL DE OVINOCULTURA, 5., 1999, Botucatu, **Anais...** Botucatu, UNESP, 1999. p. 35-50.

SALANTI et al. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations and power. **Eur. J. Hum. Genet.** v.13, p. 840–848, 2005.

SCHERF, D. B. **World Watch List for Domestic Animal Diversity**, Rome: Ed. 3. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000. SHEEP HAPMAP AND ANIMAL RESOURCES. Disponível em: <http://sheephapmap.org/hapmap.php> Acesso em 30/03/2015.

SCZESNY-MORAES, E. A. et al. Resistência anti-helmíntica de nematoides gastrintestinais em ovinos, Mato Grosso do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p.229-236, 2010.

SOUSA, W. H., LÔBO, R. N. B.; MORAIS, O. R. Ovinos Santa Inês: Estado de arte e Perspectivas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE-SINCORTE, 2., 2003. João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba, 2003. p.501-522.

SOUZA, C. A. et al. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. **Genetic and Molecular Research**, v. 11, n.2, p.1217-1229, 2012.

TABANGIN, M.E., WOO, J.G., MARTIN, L. J. The effect of minor allele frequency on likelihood of obtaining false positives. **BMC Proc.** ;3 Suppl 7:S41, 2009.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

TEIXEIRA NETO, M. R. et al. Parâmetros populacionais da raça ovina Santa Inês no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, n.12, p.1589-1595, 2013.

THE INTERNATIONAL SHEEP GENOMICS CONSORTIUM, et al. The sheep genome reference sequence: a work in progress, **Animal Genetics**, v. 41, p449–453, 2010.

TOLEDO, N. M. (2014). **Estudo da estrutura genética de ovinos localmente adaptados do Brasil por meio de marcadores de base única (SNP - Single Nucleotide Polymorphism)**. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de agronomia e veterinária, 2014. 79p. Dissertação (Mestrado) em Ciências animais.

TORO et al. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Anim. Genet. Res.**, 120, p.174-195, 2008.

TORRES, T. S. et al. Uso do método de agrupamento da ligação média (UPGMA) associado à caracterização fenotípica de ovinos Santa Inês. In: X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. **Anais...** Uberaba, 2013.

VASCONCELOS, C. C. M. P. (2012). **Desenvolvimento e validação de painéis de SNPs para testes de paternidade em ovinos**. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina veterinária, 2012. 58p. Dissertação (Mestrado) em Ciências animais.

VIANA, J. G. A. Panorama geral da ovinocultura no mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, ano 4, n. 12, p. 44 - 47, 2008.

WANDERLEY, W.L. et al. Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em substituição à silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*, (L.) Moench) na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.273-281, 2002.

WRIGHT, S. **Ann. Eugenics**, 1-5, 323-354, 1951.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago, v.4, 580p.,1978.

ZAPATA, J. F. F. et al. Características de carcaça de pequenos ruminantes do nordeste do Brasil. **Ciência Animal**, v. 11, p. 79-86, 2001.