

DIVERSIDADE GENÉTICA DE OVINOS DA RAÇA SANTA INÊS CRIADOS NA REGIÃO NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

GENETIC DIVERSITY OF SANTA INÊS BREED SHEEP RAISED IN THE NORTHERN REGION OF THE RIO DE JANEIRO STATE UTILIZING MICROSATELLITE MARKERS

David C.M.G.¹, Bartholazzi Junior A.¹, Jardim J.G.¹, Corrêa T.S.¹, Madella-Oliveira A.F.², Quirino C.Q.^{1*}

¹Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Avenida Alberto Lamego 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil. *PQ CNPq. crq@uenf.br, celia.quirino@pq.cnpq.br.

²Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo. Rive, Alegre, Espírito Santo, Brasil.

Keywords: Genetic variability; Heterozygosity; Inbreeding; PIC.

Palavras chave: Variabilidade genética; Heterozigosidade; Endogamia; CIP.

ABSTRACT

To start the conservation and improvement of sheep breeds in Brazil, knowledge of the patterns of genetic diversity existing within and between the breeds is necessary. This work aimed to evaluate the genetic variability of Santa Inês herds in the state of Rio de Janeiro by analyzing microsatellite markers. We analyzed 120 animals of 6 different farms, identifying 10 microsatellite *loci*, only 9 amplified from each animal, totaling 1080 samples. The effective number of alleles per *locus* ranged from 3 to 9. All 9 microsatellite *loci* analyzed in this study showed polymorphism. The average observed heterozygosity was low (average of 0.20), but the expected heterozygosity ranged from 0.44 to 0.85, with average of 0.59. The PIC varied from 0.40 to 0.84, with average of 0.55 and the average inbreeding coefficient was 0.50 with the maximum of 0.88. The conclusion was that the genetic diversity of this animal population is low, and mating should be carried out between the animals with low or no relationship in order to prevent the occurrence of inbreeding depression, which would lead to productive and reproductive damage.

RESUMO

Como forma de iniciar um programa de conservação e melhoramento das raças de ovinos no Brasil, é necessário um conhecimento mínimo dos principais padrões de diversidade genética existentes entre e dentro das raças. Desta forma, o presente trabalho teve como finalidade avaliar a variabilidade genética de rebanhos da raça Santa Inês do norte do Estado do Rio de Janeiro a partir do uso de marcadores microssatélites. Foram analisados 120 animais de seis diferentes fazendas, onde 10 loci microssatélites foram estudados, apenas 9 amplificaram para cada um dos animais, totalizando 1080 amostras. O número efetivo de alelos por *locus* variou de três à nove. Todos os nove loci analisados nesse estudo se mostraram polimórficos. A Heterozigose média observada foi baixa (média de 0,20), mas a heterozigosidade esperada variou de 0,44 a 0,85, com média de 0,59. O PIC variou de 0,40 à 0,84 com média de 0,55 e a média do coeficiente de endogamia foi 0,50 com o máximo de 0,88. Isso conclui que a diversidade genética dessa população de animais é baixa os acasamentos devem ser entre animais com baixo ou nenhuma relação de parentesco para prevenir a ocorrência da depressão endogâmica, que levaria a prejuízos produtivos e reprodutivos.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui várias raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir de outras raças trazidas pelos portugueses e outros povos para o continente americano, sendo aqui introduzidas pelo Paraguai e pela Argentina (Crispim *et al.*, 2012). Estes animais se adaptaram aos mais variados ambientes brasileiros e hoje são conhecidos como naturalizados, locais ou localmente adaptados (McManus *et al.*, 2014). Atualmente, grande parte destes rebanhos encontra-se ameaçado de extinção, principalmente em razão de cruzamentos

absorventes indiscriminados com animais de raças exóticas/modernas que passaram a ser importadas a partir do final do século XIX e início do século XX (Sheriff & Alemayehu, 2018).

Levantamentos realizados sob a coordenação da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) sobre a situação das sete principais espécies de animais domésticos têm mostrado que existe uma grande quantidade de raças ameaçadas de extinção em todo o mundo (FAO, 2001). O sistema de informações sobre a Diversidade de Animais Domésticos (DAD-IS) da FAO comprovou que há uma taxa de extinção, a nível mundial, de 48 raças ao ano. Estes dados representam uma perda de material genético que poderia ser utilizado para melhoria de características relacionadas à resistência a doenças e rusticidade, aumentando o poder adaptativo das espécies.

As raças ovinas nativas brasileiras, como por exemplo, a Santa Inês, se destacam pela rusticidade e capacidade de adaptação a regiões de clima tropical e subtropical. Características como capacidade de resistir aos períodos de restrição alimentar impostos pelo período de seca, assim como a capacidade de apresentar resistência a diversos tipos de agentes patogênicos, conferem a Santa Inês os atributos necessários para classificá-las como detentoras de recursos genéticos importantes para uso futuro (McManus *et al.*, 2013; Berton *et al.*, 2017).

Como consequência da demanda comercial, em muitos países, inclusive no Brasil, os ovinos locais são parcialmente substituídas por raças comerciais exóticas (Souza Carneiro *et al.*, 2007; GebreMichael, 2008). As propostas de substituição ou modificação de genótipos existentes deveriam estar precedidas de uma exaustiva análise das suas consequências biológicas e socioeconômicas no sistema de produção (Egito *et al.*, 2002).

A manutenção de ovinos nativos depende diretamente de sua inserção nos sistemas de produção existentes. Para que isto aconteça, é necessário identificar características potenciais que poderão desempenhar um importante papel em nichos de mercado específicos, criando-se assim interesse por parte dos criadores, ao perceberem que podem utilizar ovinos locais e obter um maior retorno financeiro (Issakowicz *et al.*, 2016). Adicionalmente, a sobrevivência destas raças irá permitir que no futuro, que as mesmas possam vir a constituir fonte de material genético capaz de melhorar a resistência dos ovinos a condições desfavoráveis do ambiente de criação (Notter, 1999).

É necessário estudos dos padrões de diversidade genética existentes entre e dentro das raças, a fim de direcionar os acasalamentos e escolha de reprodutores de diferentes linhagens para manter o maior nível de variabilidade dentro do rebanho. Permitindo a utilização deste material genético na melhoria de diferentes características e, principalmente, preservar diferentes alelos exclusivos das raças nativas. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de caracterizar geneticamente, com base no número de alelos, heterozigosidade e nível de endogamia, rebanhos da raça Santa Inês do norte do Estado do Rio de Janeiro a partir do uso de marcadores microssatélites.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem e extração do DNA

O presente trabalho foi realizado com ovinos (*Ovis áries*) da raça Santa Inês de rebanhos do Norte do Estado do Rio de Janeiro. Foram coletados pêlos de 20 animais por fazenda, totalizando 6 fazendas estudadas, sendo essas localizadas em Conselheiro Josino (CJ), Lagoa de Cima (LC), São Fidélis (SF), São João da Barra (SJB), Farol de São Tomé (SC) e Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Para a obtenção de DNA de cada animal, foram coletadas amostras de pêlos da porção final da cauda, de forma que os bulbos pilosos pudessem se manter na maior parcela de pêlos retirados, já que são estas as fontes de células usadas para a obtenção do DNA. A porção final da cauda dos ovinos foi comprovada como a área mais eficaz para se efetuar a retirada dos pêlos (Souza *et al.*, 2010), pois é de fácil acesso, possui geralmente uma boa quantidade de pêlos em um tamanho médio que permite sua retirada e mantém uma boa porcentagem de pêlos acompanhados de bulbos em relação à quantidade total de pêlos retirados.

Os pêlos retirados foram armazenados em sacos de papel pardo com superfície não encerada, com o objetivo de manter a integridade dos seus bulbos até o momento de sua utilização

Foram utilizados 10 bulbos de pelos coletados de cada animal para cada extração de DNA. Cada um dos pêlos foi previamente observado ao microscópio óptico com a objetiva de 4/0.10X para a verificação da integridade

e presença do bulbo, para posteriormente ser cortado (separando-o do restante do pêlo) e colocado em tubos eppendorf de 1,5 mililitros para extração de DNA.

Para a reação de extração de DNA foram utilizadas duas soluções. A primeira, chamada de solução de lise, é uma solução de 200mM de NaOH. Foram adicionados 50 microlitros da solução de lise em cada tubo eppendorf contendo 10 bulbos previamente visualizados e cortados. Depois, os bulbos foram agitados com a pipeta com o intuito de ocasionar o desprendimento das células que estavam presas ao pêlo. Na etapa seguinte, os tubos foram submetidos ao aquecimento a 96° C por 15 minutos, para que as membranas celulares pudessem ser desnaturadas. Uma centrifugação a 13000 RPM por 1 minuto foi a etapa seguinte. Essa etapa visa separar o DNA das organelas e proteínas presentes no interior das células que, após a lise celular, estarão dispersas na solução. Ao final desse processo, foram adicionados 50 microlitros da segunda solução, a solução neutralizante, que consiste em uma solução de 200mM de HCL e 100mM de Tris HCL, com o objetivo de parar a atividade de lise da primeira solução e baixar o pH de toda a reação, tendendo para o pH neutro (Coelho *et al.*, 2004).

PCR e genotipagem dos loci de microssatélites

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

Tabela I. Informações sobre os loci estudados (*Information about the studied loci*).

| Locus | TAnel (°C) | Sequência do Primer 5' - 3' | Fragmento (pb) | Cromossomo em <i>Ovis aries</i> |
|-----------|------------|--|----------------|---------------------------------|
| OarFCB020 | 56 | AAATGTGTTTAAGATTCCATACAGTG GGAAAACCCCATATATACCTATAC | 92-112 | 2 |
| OarAE129 | 61 | AATCCAGTGTGTGAAAGACTAATCCAG GTAGATCAAGATATAGAATATTTTCA | 133-159 | 5 |
| OarFCB011 | 58 | GGCCTGAACTACAAGTTGATATATCTATCAC GCAAGCAGGTTCTTTACCACTAGCACC | 121-143 | 2 |
| SRCRSP08 | 58 | TGCGGTCTGGTTCTGATTTTAC CCTGCATGAGAAAGTCGATGCTTAG | 212-242 | Desconhecido |
| OarCP049 | 58 | CAGACACGGCTTAGCAACTAAACGC GTGGGGATGAATATTCCTCATAAAGG | 85-107 | 17 |
| SRCRSP05 | 56 | TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG | 141-149 | 18 |
| MAF65 | 54 | AAAGGCCAGAGTATGCAATTAGGAG CCACTCCTCCTGAGAATATAACATG | 123-135 | 15 |
| Inra63 | 58 | ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC AAACCACAGAAATGCTTGGGAAG | 165-199 | 14 |
| OarFCB304 | 59 | CCCTAGGAGCTTTCAATAAAGAATCGG CGCTGCTGTCAACTGGGTCAGGG | 150-188 | 19 |
| MAF214 | 60 | AATGCAGGAGATCTGAGGCAGGGACG GGGTGATCTTAGGGAGGTTTGGAGG | 182-230 | 16 |

TAnel: temperatura de anelamento; pb: pares de base.

As PCR foram realizadas separadamente para cada locus em volumes de 20 µl por reação, contendo tampão para PCR [5X Green Go Taq Buffer], dNTPs (10mM de cada), MgCl₂ (1,0-3,0 mM), Taq DNA polimerase (1U), um par de primers (20 p/mol de cada primer), água ultra pura e 5 microlitros de DNA pré-diluído 50x. Em cada reação foram utilizados controles negativos para monitorar possíveis contaminações. O programa de PCR utilizado foi constituído por um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, sendo que em cada ciclo foi estabelecido um tempo de 30 segundos para a desnaturação da dupla fita a 94°C, 30 segundos para o anelamento dos primers a temperatura específica de cada primer (Tabela

I), e 60 segundos para a síntese da nova cadeia a 72°C. Após o último ciclo, as reações foram submetidas a um passo final de 5 minutos a 72°C para a extensão final das cadeias de DNA. As temperaturas de anelamento dos primers foram otimizadas para cada *locus* de microssatélite. A Tabela I apresenta os dez propostos para o estudo nesse trabalho, com suas respectivas características.

O sucesso da amplificação por PCR foi confirmado em géis de poliacrilamida (8%) com 20 centímetros de tamanho para uma corrida extensa com o objetivo de separar fragmentos de DNA que possam diferir por uma pequena quantidade de pares de base. Juntamente com as amostras, foram aplicados padrões de peso molecular (25pb e 100pb) para a comparação dos tamanhos dos fragmentos obtidos. Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata.

Para a coloração, inicialmente os géis foram mergulhados em uma solução fixadora (100ml de Etanol, 5ml de Ácido Acético e 895ml de água destilada) por 5 minutos. Depois, foram adicionados 50ml de solução de Nitrato de Prata (0,2g de Nitrato de Prata e 50ml de Água destilada) por 10 minutos. As soluções foram descartadas adequadamente, o gel, lavado com água destilada por 2 minutos que foi ser descartada em seguida. Por fim, o gel foi mergulhado na solução Reveladora (30g NaOH, 5ml de Formol e aproximadamente 900ml de Água) até que as bandas do gel, correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados se tornassem nítidos. Todas as etapas foram executadas com leve agitação com o intuito de promover uma coloração uniforme. Após a visualização em acrilamida, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar no equipamento AdvanCE FS96 (Advanced Analytical).

Análise estatística dos dados

A variabilidade genética foi quantificada a partir de estimativas de contagem direta das frequências alélicas para cada *locus* utilizado. Os parâmetros genéticos populacionais utilizados para estimar a diversidade foram a diversidade alélica, heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e) sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e o índice de fixação (F_{is}) ou coeficiente de endogamia. O software PowerMarker v.3.25 (Liu & Muse, 2005) foi usado para estas análises interpopulacionais. O programa de análise estatística Genes (Cruz, 2006) foi usado para a construção de uma matriz de distâncias que por sua vez foi processada no software R. Através dessa análise, o estudo de agrupamento com base na média das distâncias entre todos os pares de genótipo (UPGMA) foi feito, resultando em dendrogramas que mostram o agrupamento dos indivíduos dentro de uma mesma população, de acordo com os alelos apresentados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez *locus* microssatélites analisados apenas o *locus* SRCRSP08 não obteve resultados positivos com amplificação de alelos ao final de todos os estudos. Visser *et al.* (2010) encontraram oito alelos para o *locus* SRCRSP08 em seu trabalho com Cabras da África do Sul. Mais recentemente, Qwabe *et al.* (2013) encontraram sete alelos para este *locus* em ovinos da raça Namaqua Afrikaner, também na África do Sul. Em nosso trabalho observamos bandas obtidas pela eletroforese capilar de tamanho reduzido, não estando entre a margem de tamanho de fragmento esperado para esse *locus* (212-242pb), não podendo assim ser enquadradas como alelos de interesse e, por conseguinte, sendo considerados apenas como amplificações inespecíficas. Pode-se levantar hipóteses relacionadas ao sítio de anelamento do primer nos ovinos Santa Inês analisados, ou mesmo relacionar as bandas de baixo tamanho a regiões que sofreram mutações nessa raça, estando essas fora do tamanho comumente observado para este *locus*.

A Tabela II mostra a quantidade de alelos encontrados em cada população para cada *locus* microssatélite.

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

Nas seis fazendas avaliadas foi observada baixa diversidade genética, o número médio de alelos variou de 3,78 na fazenda São Fidélis a 4,78 alelos por *locus* nas fazendas Conselheiro Josino e Lagoa de Cima. A formação destes rebanhos se baseou na aquisição de reprodutores de uma mesma linhagem e pela troca de animais entre estas propriedades. Desta forma, o baixo número de alelos, possivelmente é um reflexo da formação do plantel.

Tabela II. Número de alelos encontrados de cada *locus* em cada população de ovinos Santa Inês do norte do estado do Rio de Janeiro (*A number of alleles found in each locus in the different population studied of Santa Inês sheep from the northern state of Rio de Janeiro*).

| <i>Locus</i> | Fazendas | | | | | |
|--------------|----------|------|------|------|------|------|
| | CJ | LC | SC | SF | SJB | UENF |
| OarFCB20 | 9 | 9 | 9 | 5 | 6 | 9 |
| OarAE129 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| OarFCB011 | 8 | 6 | 0 | 8 | 8 | 3 |
| OarCP049 | 5 | 5 | 4 | 3 | 4 | 4 |
| SRCRSP05 | 4 | 4 | 4 | 5 | 5 | 3 |
| MAF65 | 0 | 1 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Inra63 | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 |
| OarFCB304 | 5 | 6 | 6 | 6 | 0 | 3 |
| MAF214 | 5 | 7 | 7 | 7 | 7 | 6 |
| Média | 4,78 | 4,78 | 3,89 | 3,78 | 4,67 | 3,89 |

CJ: Conselheiro Josino, LC: Lagoa de Cima, SF: São Fidélis, SJB: São João da Barra, SC: Farol de São Tomé e UENF: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

A baixa diversidade genética associada à permanência dos reprodutores por longos períodos no rebanho, possivelmente acarretará no elevado nível de endogamia dos rebanhos. Assim, todas as populações estudadas sofrem o risco de perdas na capacidade adaptativa e diminuição dos níveis produtivos e reprodutivos pela depressão endogâmica, além de aumentar a probabilidade de ocorrência de doenças ou defeitos genéticos.

Bolormaa *et al.* (2008) observaram em suas análises com populações de caprinos da Austrália um número de 7 alelos diferentes para o *locus* OarFCB20. Em um estudo executado em ovinos Barbados Blackbelly no Caribe, Roberts *et al.* (2003) encontrou, por sua vez, dez alelos diferentes para o mesmo *locus* (OarFCB20), concluindo ao final que as populações analisadas apresentaram alta variabilidade genética. Roberts *et al.* (2003), analisou um total de 11 *loci*, quatro destes *loci* foram utilizados em comum com este trabalho, OarFCB20, MAF65, SRCRSP05 e MAF214 e foram observados 10, 8, 8 e 3 alelos, respectivamente. Em nosso trabalho apenas o *locus* microssatélite MAF214 apresentou maior número de alelos (7). Tal comparação sugere que a variabilidade genética encontrada nos rebanhos analisados neste trabalho encontra-se baixa, havendo provavelmente a perda de alelos. Resultados semelhantes foram observados por David *et al.* (2018), com poucos números de alelos mais a maioria dos *loci* estudados em uma população de ovelhas localmente adaptadas da raça Morada Nova no Brasil.

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

Kevorkian *et al.* (2010) encontraram para o *locus* OarFCB11 doze alelos na maior das populações analisadas em seu trabalho com ovelhas da Romênia. Além desse, os *loci* OarFCB20, MAF214 e MAF65 também foram usados por esse autor (13, 7 e 10 alelos, respectivamente), também foram avaliados em nosso trabalho. Kevorkian *et al.* (2010), com a exceção novamente do *locus* MAF214, desta vez se equiparando com 7 alelos observaram maior número de alelos e maior diversidade genética. que nos rebanhos de ovinos Santa Inês utilizados nesse estudo.

Qwabe *et al.* (2013) avaliou a diversidade genética de ovinos Namaqua Afrikaner e observou baixa diversidade genética na população estudada. Quatro *loci* estudados por Qwabe *et al.* (2013), em comum com este trabalho (OarCP49, SRCRSP05, INRA63 e OarFCB011), apresentaram em média de 5 alelos por *locus*, enquanto a média para estes *loci* encontrados neste trabalho foi de 5.75, sugerindo baixo nível de variabilidade genética dos rebanhos analisados em ambos os trabalhos.

Ibrahim *et al.* (2010) encontraram oito alelos diferentes para o *locus* OarFCB304 em seu trabalho que usou raças de ovinos do Paquistão, com maior variabilidade genética. Em comparação à quantidade de alelos encontrada neste trabalho para o *locus* OarFCB304 (6). Em geral, a quantidade de alelos encontrada para cada

oco analisado neste trabalho foi inferior que aos encontrados em pesquisas similares, demonstrando assim a baixa variabilidade genética dos rebanhos estudados de ovinos Santa Inês.

Nas Figuras 1 a 6 são apresentados os dendogramas referente a cada propriedade. Em cada dendograma foi determinado um corte na altura que variou de 0,61 a 0,685, para permitir a visualização do agrupamento de pelo menos dois grupos de agrupamento em cada dendograma. Devido a baixa diversidade entre os animais, cortes abaixo do escolhido para cada população não permitiria o agrupamento em mais de um cluster.

Na Figura 1, apresenta-se o dendograma da fazenda Conselheiro Josino onde um corte feito aproximadamente em 0,675 foi suficiente para separar os genótipos encontrados em cinco grupos distintos. Em verde, o único indivíduo “6”, apresentou uma configuração alélica única, assim como o indivíduo em cinza “20”, distanciando-os dos maiores grupos da população. Destacados em azul, os indivíduos “4”, “13” e “9”, “12” foram agrupados juntos por apresentarem a ocorrência dos mesmos 4 alelos, aproximando-os geneticamente. Em vermelho, o maior grupo de indivíduos com repetição de alelos, obteve-se a ocorrência de sete alelos repetidos. Em amarelo, o segundo maior agrupamento de indivíduos com menor variabilidade genética entre si, foi observada a ocorrência dos mesmos sete alelos para os mesmos *loci*. Com a exceção dos animais “6” e “20”, tal dendograma mostra grande similaridade genética entre os ovinos Santa Inês, evidenciando baixa variabilidade genética, o que estaria ligado a acasalamentos entre animais aparentados dentro de um mesmo rebanho.

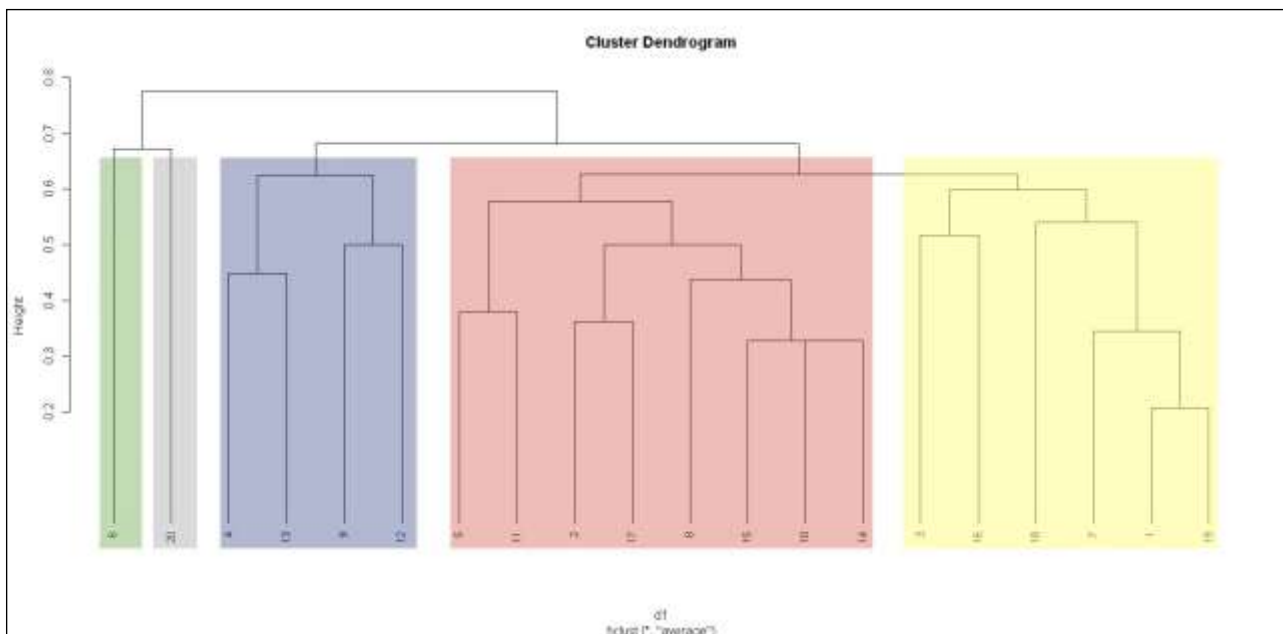


Figura 1. Dendrograma da fazenda Conselheiro Josino, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 5 grupos de similaridade genética dentro da população analisada, com base na metodologia UPGMA (*Dendrogram of the Conselheiro Josino farm of the northern of the state of Rio de Janeiro, showing 5 groups of genetic similarity within the analyzed population, based on UPGMA methodology*).

Na Figura 2, observa-se o dendrograma da fazenda Lagoa de Cima onde um corte aproximadamente em 0,65 foi o suficiente para separar os genótipos em apenas dois grupos distintos. Os indivíduos destacados em verde apresentaram repetição em quatro alelos, o que os aproxima geneticamente. O *locus* menos polimórfico nesse grupo foi o OarFCB020 e o mais polimórfico é o OarCP04, apresentando 3 alelos. Os indivíduos destacados em vermelho, por sua vez, apresentaram repetição de sete alelos entre a maior parte dos indivíduos, sendo o *locus* menos polimórfico o OarCP049 e o mais polimórfico o MAF65, com 4 alelos diferentes. Os indivíduos “6” e “20” apresentam alto grau de similaridade genética, de acordo com o dendrograma, compartilhando os mesmos alelos em praticamente todos os *loci* analisados. Em comparação com o dendrograma da fazenda Conselheiro Josino, Lagoa de Cima apresenta uma nítida menor variabilidade, verificando-se apenas dois grupos de similaridade genética.

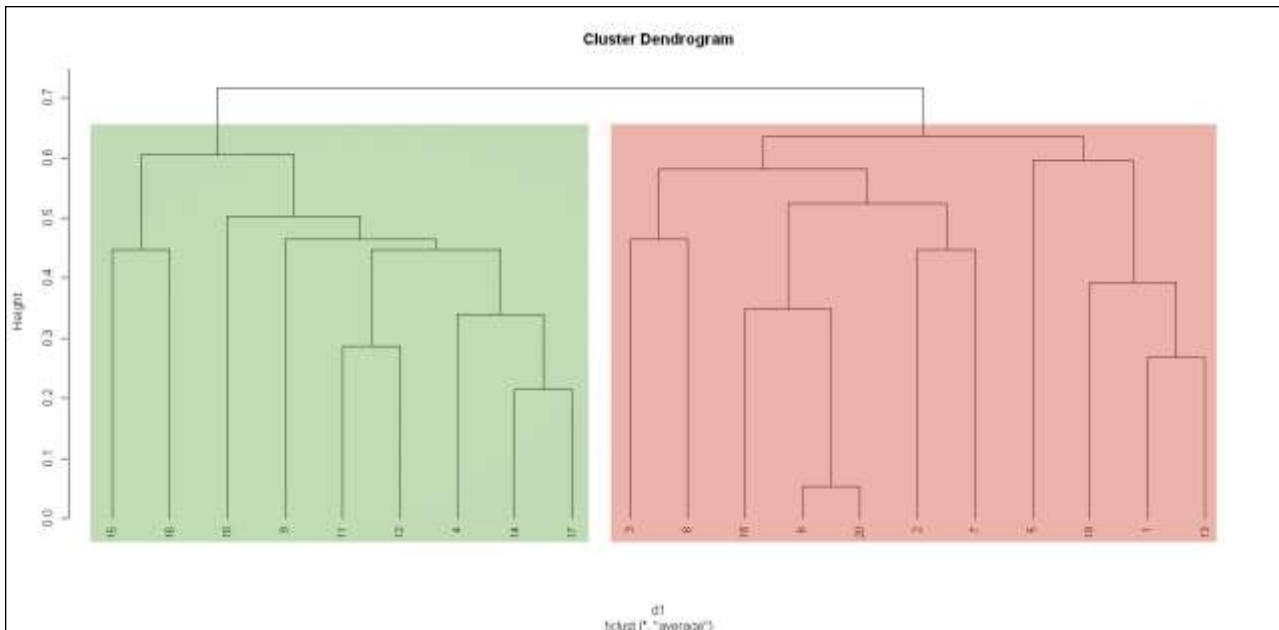


Figura 2. Dendrograma da fazenda Lagoa de Cima, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 2 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada, com base na metodologia UPGMA (*Dendrogram of Lagoa de Cima farm, northern Rio de Janeiro, of the northern of the state of Rio de Janeiro, showing 2 groups of genetic similarity within the analyzed population, based on UPGMA methodology*).

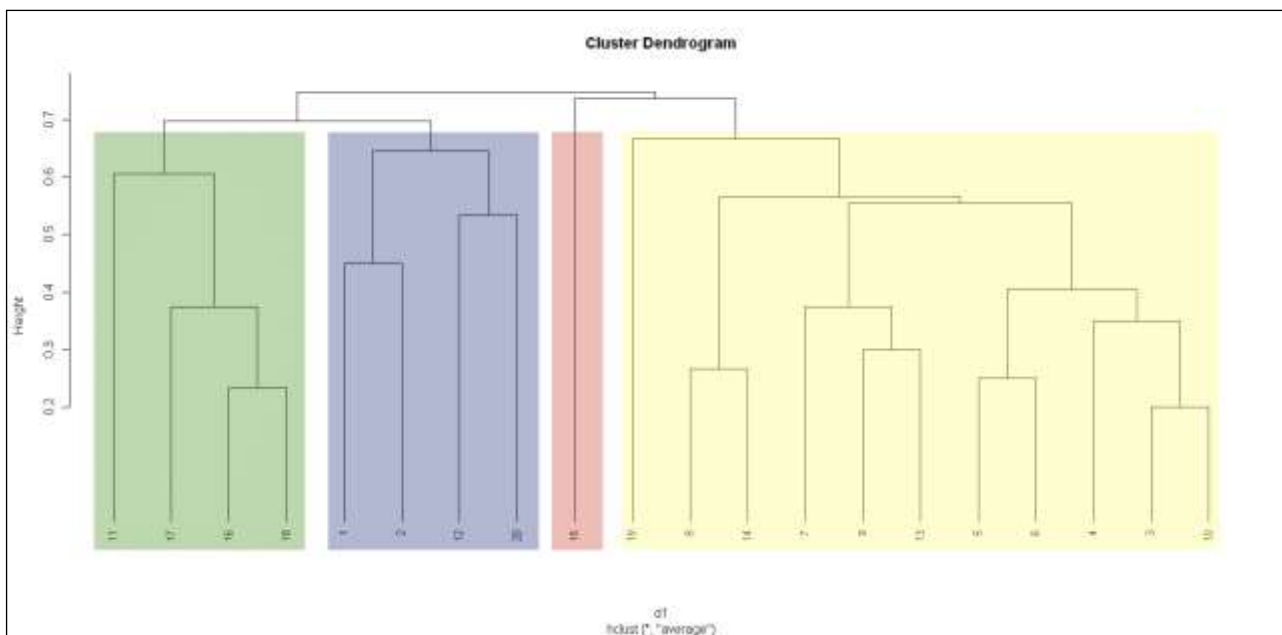


Figura 3. Dendrograma da fazenda Farol de São Tomé, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada, com base na metodologia UPGMA (*Dendrogram of Farol de São Tomé farm, northern Rio de Janeiro, of the northern of the state of Rio de Janeiro, showing 4 groups of genetic similarity within the analyzed population, based on UPGMA methodology*).

Na Figura 3, observa-se o dendrograma da fazenda Farol de São Tomé onde um corte aproximadamente em 0,685 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos. O indivíduo “15”, destacado em vermelho, apresenta a menor similaridade com os outros grupos de indivíduos da população analisada. Em verde, os indivíduos destacados compartilharam 6 alelos diferentes dos *loci*

estudados. O *locus* menos polimórfico foi OarFCB304. Os *loci* que apresentam maior polimorfismo foram MAF214 e Inra63, ambos com 3 alelos.

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

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

Na Figura 4, é apresentado o dendrograma da fazenda São Fidélis onde um corte aproximadamente em 0,685 foi o suficiente para separar os genótipos em apenas dois grupos distintos.

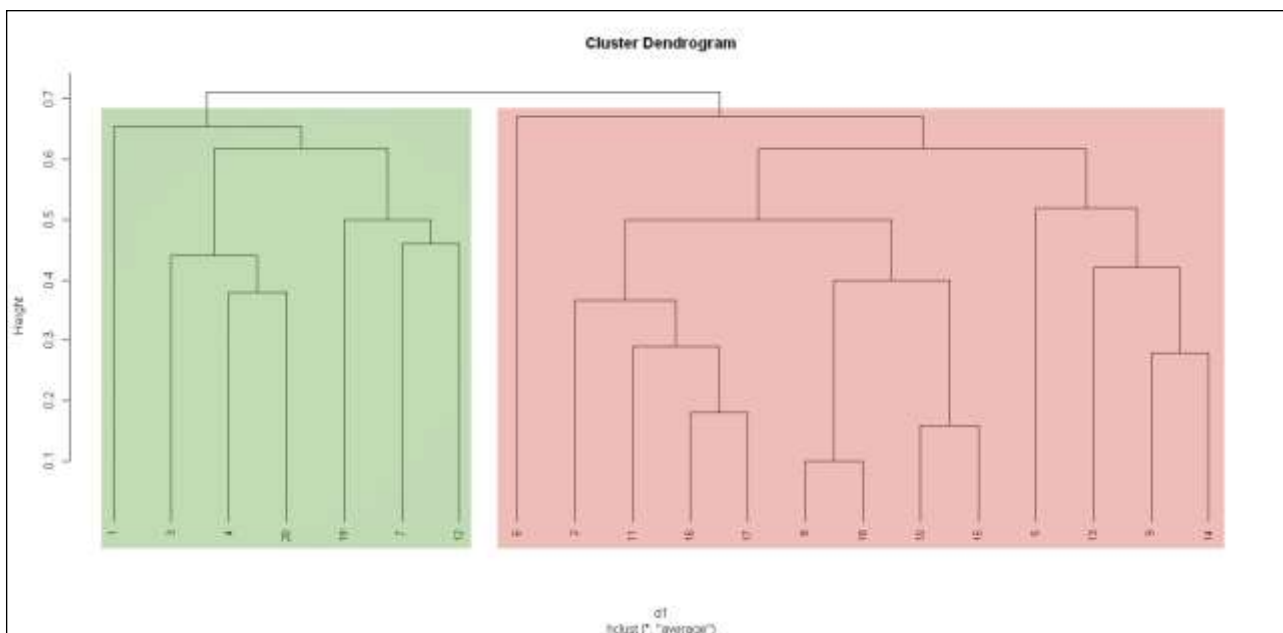


Figura 4. Dendrograma da fazenda São Fidélis, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 2 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada, com base na metodologia UPGMA (*Dendrogram of São Fidélis farm, northern Rio de Janeiro, of the northern of the state of Rio de Janeiro, showing 2 groups of genetic similarity within the analyzed population, based on UPGMA methodology*).

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

Na Figura 5, no dendrograma da fazenda São João da Barra identifica-se que um corte aproximadamente em 0,65 foi o suficiente para separar os genótipos em apenas dois grupos distintos. O primeiro grupo, destacado em verde, conta com oito indivíduos que apresentam maior similaridade nos alelos encontrados dos *loci* s analisados. Compartilhando, na maior parte dos indivíduos, quatro alelos, o *locus* menos polimórfico foi MAF214, com dois alelos, e o mais polimórfico foi SRCRSP05 com cinco alelos distribuídos nos oito animais.

O grupo destacado em azul apresenta doze indivíduos com diferentes graus de similaridade genética entre si. Os indivíduos mais similares em termos de ocorrência de alelos são “7” e “18”, não compartilhando apenas um alelo entre todos os *loci* observados. O grupo destacado em azul compartilha na maioria dos animais estudados 3 alelos, sendo o *locus* menos polimórfico Inra63, com dois alelos, e o mais polimórfico OarFCB011, com 5 alelos.

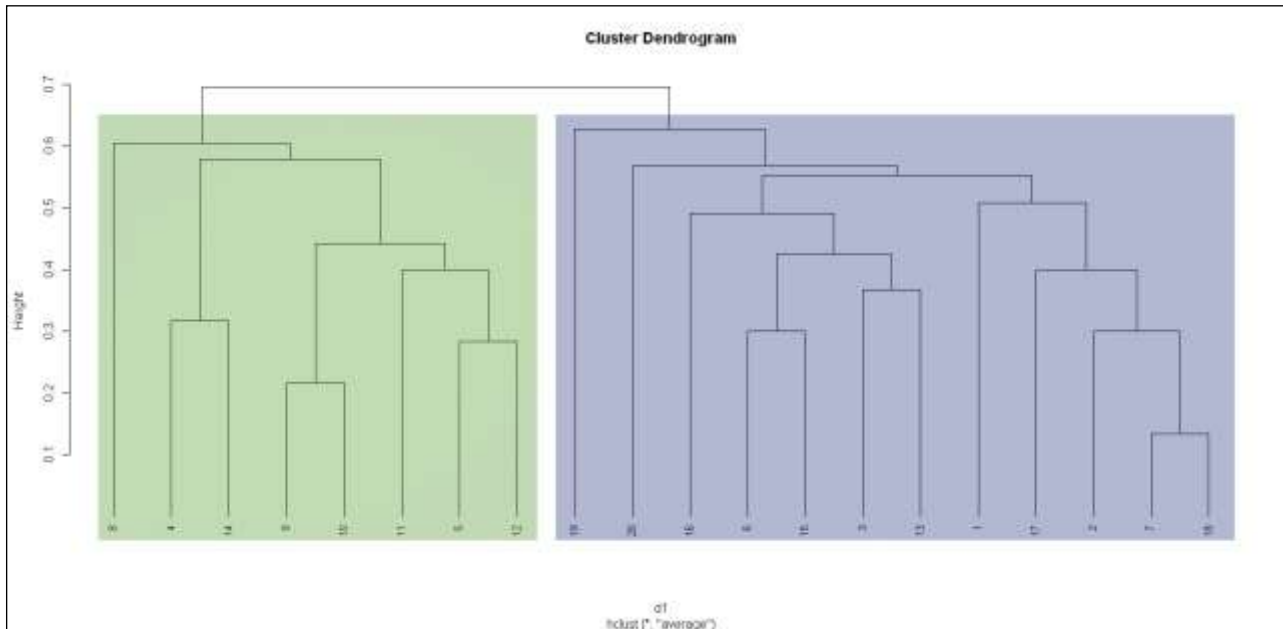


Figura 5. Dendrograma da fazenda São João da Barra, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 2 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada, com base na metodologia UPGMA (*Dendrogram of São João da Barra farm, northern Rio de Janeiro, of the northern of the state of Rio de Janeiro, showing 2 groups of genetic similarity within the analyzed population, based on UPGMA methodology*).

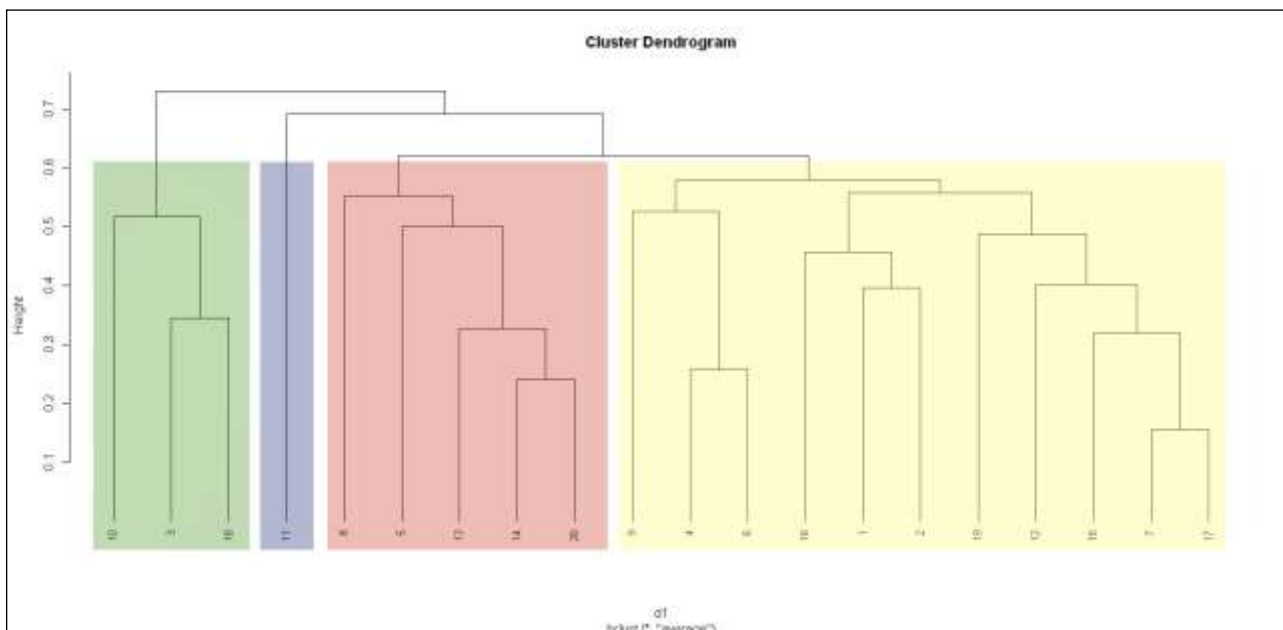


Figura 6. Dendrograma da fazenda Universidade Estadual do Norte Fluminense, do norte do estado do Rio de Janeiro, mostrando 4 grupos de similaridade genética, dentro da população analisada, com base na metodologia UPGMA (*Dendrogram of Universidade Estadual do Norte Fluminense farm, northern Rio de Janeiro, of the northern of the state of Rio de Janeiro, showing 4 groups of genetic similarity within the analyzed population, based on UPGMA methodology*).

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

Na Figura 6, apresenta-se o dendrograma dos animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense onde um corte aproximadamente em 0,61 foi o suficiente para separar os genótipos em quatro grupos distintos.

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

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

Os animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense são provenientes de outra fazenda onde existia o cuidado com os acasalamentos entre animais de parentesco próximo. Dessa forma, pode se inferir que a variabilidade genética entre os animais dessa fazenda é maior do que os valores encontrados nas fazendas São João da Barra, São Fidélis e Lagoa de Cima.

Na Tabela III, a lista com a Heterosidossidade observada, Heterosidossidade esperada, a Diversidade Alélica e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) de cada *locus* estudado.

Tabela III. Diversidade alélica, heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada, conteúdo de informação polimórfica (PIC) dos *loci* estudados (*Allelic diversity, observed heterozygosity, expected heterozygosity, polymorphic information content (PIC) of the studied loci*).

| <i>Locus</i> | Diversidade Alélica | Ho | He | Conteúdo de informação polimórfica (PIC) | Coefficiente de endogamia |
|--------------|---------------------|--------|--------|--|---------------------------|
| OarFCB020 | 9 | 0,1642 | 0,8551 | 0,8381 | 0,8106 |
| OarAE129 | 3 | 0,0000 | 0,4490 | 0,4065 | 1,0000 |
| OarFCB011 | 8 | 0,2500 | 0,8130 | 0,7881 | 0,6984 |
| OarCP049 | 5 | 0,2124 | 0,6358 | 0,5892 | 0,6684 |
| SRCRSP05 | 5 | 0,2212 | 0,6639 | 0,5994 | 0,6692 |
| MAF65 | 4 | 0,0556 | 0,4367 | 0,3930 | 0,8794 |
| Inra63 | 5 | 0,5974 | 0,6614 | 0,5994 | 0,1032 |
| OarFCB304 | 6 | 0,2947 | 0,7564 | 0,7183 | 0,6137 |
| MAF214 | 7 | 0,2273 | 0,5884 | 0,5439 | 0,6173 |
| Média | 5,78 | 0,2248 | 0,6511 | 0,6084 | 0,6734 |

Ho: heterozigosidade observada e He: heterozigosidade esperada.

O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein *et al.* (1980), é um indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos (segregação, identificação de populações e controle de paternidade). Segundo a classificação de Botstein *et al.* (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. A média de PIC para os nove *loci* avaliados foi de 0,61 e variaram de mediamente informativos a muito informativos, que indica boa qualidade dos marcadores.

A média de alelos por *loci* foi de 5,78 e heterozigosidade média observada (0,2248) muito inferior a heterozigosidade média esperada (0,6511). Estes resultados indicam uma baixa diversidade genética de toda população estudada. Possivelmente, os animais avaliados originaram de uma mesma linhagem e assim, não seria indicado a troca de animais entre os rebanhos para aumentar a diversidade genética.

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

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

Um valor de heterozigiosidade observada inferior à heterozigiosidade esperada significa, que há perda de heterozigiosidade. O alto valor obtido como coeficiente de endogamia indica alta homozigose observada para esse marcador, o que indica a perda de alelos. Em nosso estudo esta observação pode estar associada, principalmente, a formação dos rebanhos com base em poucos indivíduos, a permanência e ao acasalamento dos mesmos reprodutores por longo período, que juntos elevam o nível de homozigose e endogamia da população.

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

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

O *locus* MAF65 apresentou H_o 0,0556 e H_e 0,4367 e 4 alelos diferentes foram encontrados. Com o coeficiente de endogamia de 0,8794, este *locus* mostra também baixa heterozigiosidade e alta endogamia dos animais estudados. Sulabda *et al.* (2012) encontrou para o mesmo *locus* taxas de H_o 0,6538 e H_e 0,6184, mostrando que em seu trabalho, para este *locus*, uma taxa alta de heterozigiosidade foi encontrada.

De modo geral, vários trabalhos atuais atentam para a perda de diversidade de pequenos ruminantes localmente adaptados nas mais distintas áreas do Brasil (Oliveira, 2014; David *et al.*, 2018) e do mundo (Ocampo *et al.*, 2016; Periasamy *et al.*, 2017; Shamsuddin, 2017). Nosso estudo mostrou uma baixa diversidade dentro dos rebanhos e entre rebanhos dos ovinos Santa Inês criados no norte do Estado do Rio de Janeiro. Medidas devem ser tomadas a fim de garantir o acasalamento de animais mais distintos e a introdução de diferentes linhagens para aumentar o nível de diversidade genética. Estas medidas levariam a diminuição da endogamia e possibilitaria a utilização em programas de melhoramento do principal potencial observado nas raças nativas, a adaptabilidade e rusticidade.

CONCLUSÃO

Os nove marcadores microssatélites utilizados foram polimórficos e foram adequados para verificar os níveis de heterosigiosidade e endogamia, desta forma os *loci* são efetivos para análise da diversidade genética e parentesco.

Os ovinos Santa Inês estudados apresentaram baixa diversidade genética, o que impede o melhoramento genético da raça sem a introdução de animais de outras linhagens.

Os elevados valores de coeficiente de endogamia, demonstram alta proximidade de parentesco entre os animais e não é indicado o acasalamento entre os animais da região para evitar as perdas pela depressão endogâmica.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-barzinji Y.M.S., Lababidi S., Rischkowsky B., Al-Rawi A. A., Tibbo M., Hassen H., Baum M. 2011 Assessing genetic diversity of Hamdani sheep breed in Kurdistan region of Iraq using microsatellite markers. In: *African Journal of Biotechnology*. 10, 15109-15116.
- Bolormaa S., Ruvinsky A., Walkden-Brown S., van der Werf J. 2008 Genetic relationships among Australian and Mongolian fleece-bearing goats. In: *Australian Journal of Animal Sciences*, Vol.21.
- Berton, M.P., Medeiros, R., Silva, D.O., Peripolli, E., Stafuzza, N.B., Martin, J.F., Álvarez, M.S., Gavinã, B.V., Toro, M.A., Banchemo, G., Oliveira, P.S., Eler, J.P., Baldi, F., Bento, J., Ferraz, S., 2017. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. *J Anim Sci Biotechnol*. 1–16. doi:10.1186/s40104-017-0190-4
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32, 314–331.
- Coelho, E.G.A., Oliveira, D.A.A., Teixeira, C.S., Sampaio, I.B.M., Rodrigues, S.G., Alves, C., 2004. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pelos e entre técnicas de extração. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec*. 56, 111–115. doi:10.1590/S0102-09352004000100017
- Crispim, B. do A., Matos, M.C., Seno, L.D.O., Grisolia, A.B., 2012. Molecular markers for genetic diversity and phylogeny research of Brazilian sheep breeds. *African J. Biotechnol*. 11, 15617–15625. doi:10.5897/AJB12.2275
- Cruz C.D. 2006. *Programa Genes: Biometria*, Viçosa, MG.
- David, C.M.G., Quirino, C.R., Vega, W.H.O., Bartholazzi Junior, A., Madella-oliveira, A.D.F., Costa, R.L.D., 2018. Diversity of indigenous sheep of an isolated population. *BMC Vet. Res*. 14, 1–7. doi:10.1186/s12917-018-1682-y
- Egito, A., Mariante, A. S., Albuquerque, M., 2002. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. *Arch. Zootec*. 51, 39–52.
- FAO (2001). In: DAD-IS 2. Domestic Animal Diversity Information System. Roma, Itália: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em <http://dad.fao.org>
- GebreMichael, S.G., 2008. Sheep resources of Ethiopia: genetic diversity and breeding strategy.
- Issakowicz, J., Issakowicz, A.C.K.S., Bueno, M.S., da Costa, R.L.D., Katiki, L.M., Geraldo, A.T., Abdalla, A.L., McManus, C., Louvandini, H., 2016. Parasitic infection, reproductive and productive performance from Santa Inês and Morada Nova ewes. *Small Rumin. Res*. 136, 96–103. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.01.015
- Ibrahim, M., Ahmad, S., Swati, Z.A., Khan, M.S., 2010. Genetic diversity in Balkhi, Hashtnagri and Michni sheep populations using SSR markers. *African Journal of Biotechnology* 9 (45).
- Kevorkian S.E.M., Georgescu S.E., Manea M.A., Zaulet M., Hermenean A.O., Costache M. 2010. Genetic diversity using microsatellite markers in four Romanian autochthonous sheep breeds. In: *Romanian Biotechnological Letters*, 15. 1.
- Liu, K., Muse, S. V., 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21, 2128–2129.
- McManus, C., Hermuche, P., Paiva, S., Ferrugem Moraes, J., de Melo, C., Mendes, C., 2013. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. *Brazilian Journal of Science and Technology* 1, 3. <https://doi.org/10.1186/2196-288X-1-3>
- McManus, C., Hermuche, P., Paiva, S., Ferrugem Moraes, J., de Melo, C., Mendes, C., 2014. Geographical distribution of sheep breeds in Brazil and their relationship with climatic and environmental factors as risk classification for conservation. *Brazilian J. Sci. Technol*. 1, 3. doi:10.1186/2196-288X-1-3

- Musthafa M.M., Aljumah R.S., Alshaik M.A. 2012. Genetic diversity of Najdi sheep based on microsatellite analysis. In: African Journal of Biotechnology, vol. 11, pg 14868-14876.
- Notter, D.R., 1999. The Importance of Genetic Diversity in Livestock Populations of the Future. *J. Anim. Sci.* 77, 61–69.
- Ocampo, R., Cardona, H., Martí-nez, R., 2016. Genetic diversity of Colombian sheep by microsatellite markers. *Chil. J. Agric. Res.* 76, 40–47. doi:10.4067/S0718-58392016000100006
- Oliveira, P.S., 2014. Estudo da diversidade genética e análise de associações de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) com resistência às parasitoses gastrintestinais e prolificidade em ovinos da raça Santa Inês, 9th ed.
- Pandey A.K., Sharma R., Singh Y., Mishra B.P., Mondal K.G., Singh P.K., Singh G., Joshi B.K. 2010. Variation of 18 STR *Loc*i in Shahabadi sheep of India. In: *Russian Journal of Genetics*, Vol. 46, Nº 1, PP. 86-92.
- Periasamy, K., Vahidi, S.M.F., Silva, P., Faruque, M.O., Naqvi, A.N., Basar, M., Cao, J., Zhao, S., Thuy, L.T., Pichler, R., Podesta, M.G., Shamsuddin, M., Boettcher, P., Garcia, J.F., Han, J.-L., Marsan, P.A., Diallo, A., Viljoen, G.J., 2017. Mapping molecular diversity of indigenous goat genetic resources of Asia. *Small Rumin. Res.* 148, 2–10. doi:10.1016/j.smallrumres.2016.12.035
- Qwabe S.O., Van Marle Köster E., Visser C. 2013. Genetic diversity and population of the endangered Namaqua Afrikaner sheep. In: *Tropical Animal Health and Production.* 45, pg 511-516.
- Roberts C. S., Thomas G. 2003. Use of microsatellite markers to include or exclude individuals as Barbados Blackbelly sheep. A paper presented at the National Agricultural Research Conference, Cave Hill Barbados, 5-6 May 2003. Conference hosted by Min of Agriculture & Rural Development, Barbados
- Shamsuddin, M., 2017. Preface: Special issue on “genetic diversity of small ruminants in Asia.” *Small Rumin. Res.* 148, 1. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.02.017
- Sheriff, O., Alemayehu, K., 2018. Genetic diversity studies using microsatellite markers and their contribution in supporting sustainable sheep breeding programs: A review. *Cogent Food Agric.* 4. doi:10.1080/23311932.2018.1459062
- Souza C.A, Paiva S.R., McManus C.M., Azevedo H.C., Mariante A.S., Grattapaglia D. 2012. Genetic diversity and assessment of 23 microsatellite markers for parentage testing of Santa Inês hair sheep in Brazil. In: *Genetics Molecular Research.* 11 pg: 1217-1229.
- Souza, E.S., Falcão, D.R.A., Leal, S.R., Corrêa, T.S., Quirino, C.R. (2010) Métodos para coleta e armazenamento de pêlos em ovinos (*Ovis aries*), visando a obtenção de DNA. In: 10ª Conferência Sul-americana de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, Brasil.
- Souza Carneiro, P.L., Mendes Malhado, C.H., Oliveira De Souza, A.A., Gonçalves Serafim Da Silva, A., Dos Santos, F.N., Ferro Santos, P., Rezende Paiva, S., 2007. Desenvolvimento ponderal e diversidade fenotípica entre cruzamentos de ovinos Dorper com raças locais. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42, 991–998. doi:10.1590/S0100-204X2007000700011.