



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE
POPULAÇÕES DAS VARIEDADES DE OVINOS MORADA
NOVA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES E
MITOCONDRIAIS**

JOÉLIMA SANTUZA BRITO FERREIRA

MOSSORÓ/ RN – BRASIL
Agosto/2012

JOÉLIMA SANTUZA BRITO FERREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE
POPULAÇÕES DAS VARIEDADES DE OVINOS MORADA
NOVA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES E
MITOCONDRIAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientador: Prof^o. Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa

MOSSORÓ /RN – BRASIL
Agosto/2012

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e
catalogação da Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

F383d	Ferreira, Joélina Santuza Brito. Diversidade genética e estrutura de populações das variedades de ovinos morada nova com marcadores microssatélites e mitocondriais. / Joélina Santuza Brito Ferreira. -- Mossoró, 2012. 44 f.: il. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Orientador: Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa. Co-orientador: Dr ^a . Débora Andréa Evangelista Façanha. 1. Marcadores de ovinos. 2. <i>Ovis aries</i> . 3. mtDNA. 4. Recursos genéticos animais. CDD: 636.3
-------	---

Bibliotecária: Vanessa de Oliveira Pessoa

CRB15/453

JOÉLIMA SANTUZA BRITO FERREIRA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE
POPULAÇÕES DAS VARIEDADES DE OVINOS MORADA
NOVA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES E
MITOCONDRIAIS**

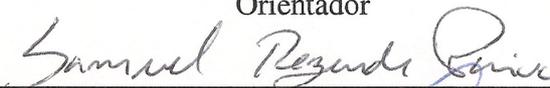
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

APROVADA EM: 30 /08 /2012 .

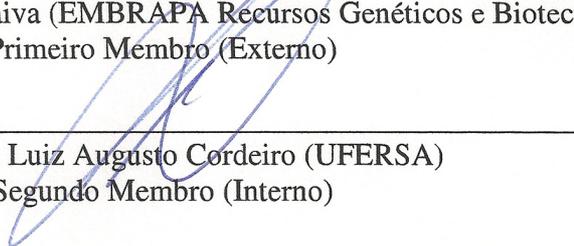
BANCA EXAMINADORA:



Prof.º Dr. Marcos Antonio Nobrega de Sousa (UFERSA)
Orientador



Pesquisador Samuel Rezende Paiva (EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia/DF)
Primeiro Membro (Externo)



Prof.º Dr. Luiz Augusto Cordeiro (UFERSA)
Segundo Membro (Interno)

Dedico

À Deus, por todo o amor e cuidado.

Ofereço

*Aos meus pais, Elizabete e Julimar,
e ao meu noivo, Giliard Soares, por todo
apoio concedido.*

“Somente a ti, ó Senhor Deus, a ti somente, e não a nós, seja dada a glória por causa do teu amor e da tua fidelidade.

Por que é que as outras nações nos perguntam: Onde está o Deus de vocês?

Nós respondemos: O nosso Deus está no céu; ele faz tudo o que quer.”

Salmo 115:1-3.

"Escolhi a alegria. [...] Convidarei meu Deus para ser o Deus da circunstância. Recusarei a tentação de ser sarcástico... a ferramenta do pensador preguiçoso e me recusarei a enxergar as pessoas como qualquer coisa menos do que seres humanos criados por Deus. Recusarei ver qualquer problema se não com uma oportunidade para ver a Deus."

Max Lucado

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus pelo amor, cuidado, conforto e ensinamentos que me fortaleceram e me guiaram na realização desse sonho.

Aos meus pais Elizabete e Julimar pelo incentivo e dedicação.

A minha irmã Stherfaninne e seu esposo André pelo acolhimento e cuidado.

Ao meu irmão Ítalo Falcão e sua noiva Onara pelo apoio.

A todos os demais familiares (avós, tios, primos...) que me apoiaram e incentivaram.

Ao meu noivo Giliard pelo amor, carinho, compreensão, por está ao meu lado nos momentos mais difíceis e por me auxiliar em tudo quanto lhe fosse possível.

A Eunice e sua família, que me hospedou em Brasília, por todo carinho e apoio que me ofereceu.

A todos os irmãos na fé pelas orações e carinho. Em especial a Joedna, Cássio, Juliana, Diego, Kaiza e Eder. Obrigada por todos os momentos vividos.

As “Severinas” Dinnara e Karla, companheiras de trabalho, pelo encorajamento, motivação e momentos de alegria.

Aos meus colegas de mestrado Luana, Paulo, Jacinara, Dowglish, Dinnara, Karla, Vanessa, Susana, Ruth, Elizangela, Andressa Suênia, Miguel e Kelly.

A meu orientador Marcos Antonio e sua esposa Vitória pelo aprendizado, momentos de alegria, caronas e todo tempo gasto para minha orientação. Obrigada!

As minhas colegas do LAGENE, Naama, Edigleyce e Laís pelos momentos de alegria.

A minha Co-orientadora Débora Andrea pelo apoio, incentivo, conselhos e momentos de felizes.

Ao professor e amigo Sérvulo Heber, pelo incentivo e pelos conselhos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Produção Animal Liz Carolina, Luis Aroeira, Alexandre P. Braga e Luis Augusto pelos momentos dispensados à minha formação.

Ao pesquisador Samuel Rezende Paiva pela oportunidade de desenvolver esse trabalho na Embrapa, pela instrução nas atividades de laboratório, por todo o tempo disponibilizado para minha orientação. Também a sua esposa Danielle que me ajudou sempre que possível.

A doutoranda Elizabete Cristina que me auxiliou tanto no laboratório como nas análises estatísticas e na discussão da dissertação. Também agradeço pela força e incentivo. Deus lhe abençoe "Bete"!

Aos colegas do Laboratório de Genética Animal (LGA) Cecília Carreiro (que também me ajudou nas análises), Iassudara Garcia, Lílian Cardoso (que considero uma irmã), Diana, Suellen Rezende, Larissa Venancio, Renato, Cácio, Samuel David, e Ronyere Olegário, por todos os momentos vividos e por todas as contribuições dadas a esse trabalho.

A todos os funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/DF que de alguma forma me ajudaram, em especial ao laboratorista Gleison Biazio, a laboratorista Lorena, a analista Naiara Silva, a pesquisadora Patrícia Ianella e aos funcionários Ana e Helídio.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido pelas oportunidades!

Ao Programa de Pós-graduação em Produção Animal- UFERSA/UFRN por todo auxílio destinado ao desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/DF pela oportunidade de estágio e por toda estrutura e recurso que disponibilizou para realização dessa pesquisa.

A todos os produtores que disponibilizaram seus animais para a coleta. Sem o apoio destes, esse trabalho não poderia ser realizado.

Muito Obrigada!

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÉLIMA SANTUZA BRITO FERREIRA - JOÉLIMA SANTUZA BRITO FERREIRA - filha de Julimar Ferreira de Brito e Elizabete Rodrigues Ferreira de Brito, nascida em 05 de junho de 1987, na cidade de Mossoró-RN. No ano de 2005 foi aprovada para ingressar na antiga ESAM (Escola Superior de Agricultura de Mossoró), atual UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido), no curso de Zootecnia. Durante o curso de graduação foi orientada pela professora Dra. Patrícia Tholon na área de Melhoramento Animal, e foi bolsista no ano 2009 do PIVIC (Programa Interno Voluntário de Iniciação Científica). Aluna laureada na turma de zootecnia 2009.1. No ano de 2010 ingressou no Programa de Pós Graduação em Produção Animal na UFERSA sob a orientação do professor Marcos Antonio Nobrega de Sousa na subárea de Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais, submetendo-se a defesa no dia 30 de Agosto de 2012.

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DAS VARIEDADES DE OVINOS MORADA NOVA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES E MITOCONDRIAIS

FERREIRA, Joélina Santuza Brito. **Diversidade genética e estrutura de populações das variedades de ovinos Morada Nova com marcadores microssatélites e mitocondriais.** 2012.44f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal: Caracterização, Conservação e Melhoramento Genético de Recursos Locais) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

RESUMO O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética e estrutura de população das variedades Branca (N=40), Vermelha (N=32) e Negra (31) da raça ovina Morada Nova, em rebanhos do semiárido nordestino Brasileiro através do uso de 17 marcadores nucleares microssatélites e duas regiões do DNA mitocondrial (mtDNA), o gene ND5 e a região controle (D-loop). A análise da variabilidade intrapopulacional demonstrou que a variedade Branca apresentou maiores valores de diversidade, enquanto a Vermelha apresentou os menores valores. A análise bayesiana para avaliar a estrutura genética populacional permitiu diferenciar entre as variedades Branca, Vermelha e Negra e uma tendência de subestruturação relacionada aos rebanhos da variedade Branca. Os resultados das Análises de Variância Molecular (AMOVA) evidenciaram que a maior estruturação genética foi observada quando se compararam rebanhos ao invés de variedades (8,59% versus 6,64% da variação total observada, $P < 0,001$). Tanto a análise de Coordenadas Principais como o dendrograma, por meio da distância genética Dtl, mostraram a formação de dois grupos principais, um composto por indivíduos brancos e outro por indivíduos vermelhos e Negros. Seis haplótipos foram encontrados para região D-loop e dois para o gene ND5. Um haplótipo exclusivo para variedade vermelha e outro para variedade Negra foram encontrados na região D-loop e um haplótipo exclusivo para variedade Negra no gene ND5, mas as frequências destes foram baixas e, portanto existe necessidade de validação adicional. Os resultados obtidos reforçam a existência de diferenças significativas entre as variedades Vermelha e Branca da raça e poderão ser utilizados para o aperfeiçoamento de programas de conservação e uso de recursos genéticos.

Palavras-chave: Microssatélites; *Ovis aries*; mtDNA; recursos genéticos animais

**GENETIC DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE OF THE VARIETY
OF SHEEP MORADA NOVA WITH MICROSATELLITE MARKERS AND
MITOCHONDRIAL**

FERREIRA, Joélina Santuza Brito. **Genetic diversity and population structure of varieties of Morada Nova sheep with microsatellite markers and mtDNA.** 2012.48f. Master Science in Animal Production: Characterization, Conservation and Breeding of Local Resources - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2012.

ABSTRACT: The aim of this study was to analyze the genetic diversity and population structure of varieties White (N = 40), Red (N = 32) and Black (31) of Morada Nova breed of sheep, herds in the northeastern Brazilian semiarid through the use of 17 nuclear microsatellite markers and two regions in the mitochondrial DNA (mtDNA), the ND5 gene and the control region (D-loop). The analysis of intra-population demonstrated that the variety White had higher diversity, while Red had the lowest values. The Bayesian analysis to assess the population genetic structure allowed differentiation between varieties White, Red and Black and a tendency to sub-structuring related to the flocks of White variety. The results of analyzes of molecular variance (AMOVA) showed that the greatest genetic structure was found when comparing herds rather than varieties (8.59% versus 6.64% of the total variation, $P < 0.001$). Both the analysis of the dendrogram as Principal Coordinates, through genetic distance Dtl, showed the formation of two main groups, one composed of whites and another for blacks and reds individuals. Six haplotypes were found for D-loop region and two for the ND5 gene. A haplotype unique to other red variety to variety and Black were found in the D-loop region and a variety haplotype unique to the Black ND5 gene, but these frequencies were low and therefore there is need for further validation. The results support the existence of significant differences between the varieties Red and White breed and can be used for the improvement of conservation programs and use of genetic resources.

Keywords: Microsatellite; *Ovis aries*; mtDNA; animal genetic resources

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Fotografias de exemplares de variedades da Raça Morada Nova: A) Exemplar da variedade Vermelha; B) Exemplar da Variedade Branca; C) Exemplar da provável variedade Negra..... 5

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Representação bidimensional da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das três variedades da raça ovina Morada Nova. OMN_V=Variedade vermelha; OMN_B= Variedade branca;OMN_P= Variedade negra. 28
- Figura 2.** Dendrograma obtido a partir do método UPGMA baseado na distância Dtl, com uso de 15 marcadores microssatélites para verificação da relação entre as três variedades estudadas. 29
- Figura 3.** Estimativa do melhor K pela distância estatística DeltaK para as populações inferidas com o programa Structure, que variou de K=1 a K=20, para as variedades estudadas. 31
- Figura 4.** Distribuição das proporções de cada indivíduo em cada cluster inferido pelo Structure com k=2, 3 e 4 . As variedades estão separadas pelas linhas Negras verticais. 32
- Figura 5.** Distribuição das proporções de cada indivíduo em cada cluster inferido pelo Structure com k= 4. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical. Os números entre parêntese indicam a variedade: 1= OMN_B; 2= OMN_N; 3= OMN_V. 33
- Figura 6.** Rede Median-Joining (MJ) gerada a partir de 460 pb da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial por meio do programa Network. Os círculos dos haplótipos possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição das mutações que diferenciam cada haplótipo..... 39

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Número de amostras conforme a fazenda, estado onde foi coletado e variedade da raça.	23
Tabela 2. Nome dos loci, cromossomo (Cr.), sequência dos primers (F: forward e R: reverse), tamanho observado dos alelos (To), multiplex (M) e Referência.	24
Tabela 3. Número de acesso das sequências de <i>Ovis aries</i> obtidas no GenBank para análises comparativas com o grupo Ovino Morada Nova. Os haplótipos (H) descritos correspondem aos identificados nas amostras de Morada Nova analisadas neste estudo em negrito, estão os haplótipos comuns entre os identificados neste trabalho e os da raça brasileira Somali obtidos a partir da análise de 460 pb e descritos na análise do Network.	25
Tabela 4. Estimativa por locus de diversidade genética para os 15 loci de microssatélites estudados em três variedades de ovinos Morada Nova.	26
Tabela 5. Estimativa de diversidade genética para as variedades de ovinos Morada Nova em estudo através dos 15 loci de microssatélites.	27
Tabela 6. Estimativa do índice de fixação dentro das populações (FIS) nas três variedades de ovinos Morada Nova estudadas.	30
Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estrutura das três variedades de ovinos Morada Nova estudadas.	34
Tabela 8. Haplótipos encontrados no sequenciamento da região D-loop em 92 amostras, sendo 36 animais da variedade Branca, 26 animais da variedade Vermelha e 30 animais da variedade Negra.	35
Tabela 9. Frequências haplotípicas para as regiões D-loop e ND5 do mtDNA nas três variedades de ovinos Morada Nova estudadas.	36
Tabela 10. Frequências haplotípicas para as regiões D-loop e ND5 do mtDNA nas oito fazendas estudadas.	37
Tabela 11. Parâmetros da variabilidade para a região D-loop e o gene ND5 do mtDNA dentro das variedades de ovino Morada Nova.	38

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO I	4
1. REFERENCIAL TEÓRICO	4
1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
CAPÍTULO II	10
RESUMO	12
INTRODUÇÃO	12
MATERIAL E MÉTODOS	13
Coleta, processamento e armazenamento das amostras	13
Extração e quantificação de DNA	13
Amplificações das regiões genômicas e mitocondriais	13
<i>Marcadores nucleares</i>	13
<i>Marcadores mitocondriais</i>	14
Obtenção de dados brutos dos microssatélites e das sequências de mtDNA	14
Análises dos dados	15
<i>Microssatélites</i>	15
<i>Marcadores mitocondriais</i>	15
RESULTADOS	16
Marcadores Microssatélites	16
<i>Amplificação</i>	16
<i>Varição intra e inter-populacional</i>	16
<i>Estrutura populacional</i>	17
Marcadores mitocondriais	17
DISCUSSÃO	18
CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

CAPÍTULO I

1. REFERENCIAL TEÓRICO

A evolução dos animais domésticos tem sido moldada pelo homem ao longo das gerações, bem como, a expansão das espécies seguiu a rota migratória e o estabelecimento do ser humano nas mais diversas regiões. Assim sendo, quando a América foi colonizada, as raças Ibéricas (incluindo ovinos e caprinos), foram trazidas pelos portugueses e espanhóis (Egito et al., 2002). Paiva (2005a) examinando haplótipos de DNA mitocondrial (mtDNA) em raças ovinas naturalizadas e comerciais no Brasil, observou que todas as raças naturalizadas estudadas (Santa Inês, Bergamácia, Rabo Largo, Morada Nova, Somalis e Crioula Lanada) foram relacionadas aos haplótipos do tipo Europeu, confirmando com isso tais acontecimentos históricos.

No Brasil, com sua dimensão continental e enorme variedade de ecossistemas, as diferentes espécies de animais domésticos trazidos pelos primeiros colonos começaram a se estabelecer. Através de séculos de seleção natural, esses animais fixaram características de adaptação específicas para o nicho ecológico onde se desenvolveram (Pantanal Mato-Grossense, Agreste Nordestino, Pampa Rio Grandense do Sul, etc) (Marienate et al., 1999).

O século XX tornou-se um ponto de viragem para a forma como os animais são criados. A cultura industrial criada durante este período influenciou tanto o ambiente no qual os animais eram criados como o aumento da intensidade de produção e as consequências disto incluíam alterações nos sistemas de produção e das raças utilizadas (MacManus et al., 2011). No Brasil, a busca por raças mais produtivas fez com que houvessem importações de raças consideradas exóticas, que embora fossem altamente produtivas haviam sido selecionadas em regiões de clima temperado. Estas raças, por cruzamentos absorventes, causaram uma rápida substituição e erosão nas raças locais, as quais apresentam níveis de produção mais baixos mas distinguem-se destas por estarem totalmente adaptadas aos trópicos, onde sofreram uma longa seleção natural (Egito et al., 2002).

Para evitar a perda deste importante material genético, em 1983, o Centro de Pesquisa Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) decidiu incluir a conservação dos recursos

genéticos animais em seu programa de pesquisa Conservação e Utilização dos Recursos Genéticos, que, até então, tinha contemplado apenas plantas (Mariante e Egito, 2002).

No ano de 2007 a Embrapa Caprinos e Ovinos, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos da Raça Morada Nova (ABMOVA) e outras instituições de pesquisa e ensino iniciaram o projeto de pesquisa e desenvolvimento intitulado "Núcleo de Conservação e Melhoramento Genético da Raça Morada Nova" e no ano de 2008 aprovaram um outro projeto intitulado "Caracterização e bases para o melhoramento genético de ovinos da raça Morada Nova".

O interesse por este grupo genético foi despertado a partir da conscientização de sua ameaça de extinção (Mariante et al., 2003) bem como pelo conhecimento de sua adaptação as regiões semiáridas. Santos et al.(2006) e Ribeiro et al.(2008) verificaram alta capacidade fisiológica dos ovinos Morada Nova de manter a homeotermia em ambiente quente. Villaroel e Fernandes (2000) observaram, para esta raça, um desempenho reprodutivo e prolificidade superior a outras raças de ovinos deslanados do nordeste do Brasil.

A Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO, 2012) reconhece a existência de duas variedades da raça, a variedade de pelagem vermelha e a de pelagem branca (Figura 1), entretanto, no mercado comercial de ovinos do Brasil circulam animais conhecidos morfologicamente por ser uma variedade de cor negra da raça Morada Nova.



Figura 1. Fotografias de exemplares de variedades da Raça Morada Nova: A) Exemplar da variedade Vermelha; B) Exemplar da Variedade Branca; C) Exemplar da provável variedade Negra.

O Serviço de Registro Genealógico das Raças Ovinas (SRGRO), não reconhece a variedade Negra como pertencente à raça Morada Nova. A impossibilidade de obtenção de registro para os animais desta provável variedade promove a restrição de sua reprodução.

Esses animais acabam por serem descartados dos rebanhos, sendo levados para o abate ou comercializados a baixo preço para proprietários de rebanhos de ovinos SPRD (Sem Padrão Racial Definido). Estudos em caracterização, diversidade genética e estrutura de populações estão sendo realizados dentro dos projetos desenvolvidos para raça e irão auxiliar na resolução desta problemática e ainda fornecer outras informações necessárias aos programas de conservação e melhoramento da raça.

Por muito tempo a caracterização de diferentes raças de animais domésticos no Brasil foi baseada, quase exclusivamente, em dados fenotípicos (morfologia e produção) (Mariante e Egito, 2002). Avanços da biologia molecular nas últimas décadas trouxeram consigo uma nova ferramenta de amplo campo de atuação que passou a ser utilizada nas pesquisas relacionadas a conservação e melhoramento de recursos genéticos, os marcadores moleculares. Ferreira e Grattapalia (1998) definem-nos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma.

Os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente variam quanto ao custo, facilidade de uso, habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, consistência e repetibilidade. Dentre esses marcadores, podem ser citados: Microsatélites, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Longos Fragmentos Polimórficos de Restrição), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados ao Acaso) e SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms - Polimorfismo de Base individual). Os marcadores podem ser classificados quanto a sua localização (genoma mitocondrial ou nuclear) como marcadores mitocondriais ou nucleares.

O genoma mitocondrial, por apresentar características únicas, como DNA circular, herança materna e alta taxa de mutação, se tornou popular em estudos evolutivos e filogenéticos, providenciando informações sobre estrutura de populações e fluxo gênico, hibridização, biogeografia, e relações filogenéticas (Avice, 1986).

Polimorfismos observados no gene mitocondrial NADH Desidrogenase 5 (ND5) mostraram-se eficientes para a diferenciação de animais da raça Crioula das variedades Serrana (comum em Santa Catarina) e Fronteira (comum no Rio Grande do Sul), variedades ainda não oficializadas (Gonçalves *et al.*, 2010). Tal estudo juntamente com o estudo desenvolvido por Tserenbataa *et al.*(2004) apontaram a possibilidade da aplicação do gene ND5 em estudos com as variedades de ovino Morada Nova.

A sequência da região controle do genoma mitocondrial (D-loop) tem sido de constante utilização em estudos de diversidade genética de ovinos (Meadows et al.,2005; Wang et al.,2007; Meadows et al.,2007; Pariset et al.,2011). Haplótipos específicos para as variedades Branca e Vermelha da raça ovina Morada Nova foram encontrados por Paiva (2005b) através do sequenciamento da região D-loop demonstrando que estas variedades apresentam variabilidade genética diferente entre si.

Os marcadores nucleares microssatélites também apresentam alta potencialidade de serem utilizados em estudos envolvendo raças e variedade de raças. Podem ser definidos como regiões de DNA em que sequências de um a seis nucleotídeos estão presentes em unidades repetitivas em todo genoma de eucariotos e que tendem a ocorrer em regiões não codificantes. Além de serem tipicamente de natureza co-dominante, possuem alto polimorfismo genético, riqueza de alelos por lócus e alta heterosigiosidade (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Dorji et al. (2010) através de dados genotípicos de oito marcadores microssatélites avaliaram a diversidade genética e as relações entre cinco populações de ovelhas butaneses nativas. Niu et al. (2011) caracterizaram seis raças ovinas chinesas com uso de 19 marcadores microssatélites. Liguiza (2007) analisou a diversidade genética de animais de um núcleo de conservação da raça Santa Inês, localizado no Distrito Federal e em Goiás, a partir do uso de 13 lócus de microssatélites localizados no cromossomo 20. Através do uso de 19 marcadores microssatélites Paiva (2005b) estudando raças de ovinos exóticos e localmente adaptados do Brasil, incluindo ovinos das variedades Branca e Vermelha da raça Morada Nova do rebanho da Embrapa Caprinos e Ovinos/CE, concluiu que essas variedades poderiam ser consideradas grupos genéticos distintos.

Diante do que foi acima exposto, o presente estudo teve como objetivo investigar a diversidade genética, a estrutura de população, bem como a existência de diferença significativa entre as variedades de ovinos da raça Morada Nova com base na utilização conjunta de duas classes de marcadores (mitocondriais - gene ND5 e região controle D-loop - e marcadores nucleares microssatélites). Os resultados deste estudo serão de grande importância para os programas de conservação e melhoramento dessa raça.

1.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES OVINOS. **Padrões raciais**. Disponível em: < <http://www.arcoovinos.com.br> >. Acesso em: 29 jan. 2012.

AVISE, J. C.; HELFMAN, G. S.; SAUNDERS, N. C.; STANTON HALES, L. Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: Population genetic consequences of an unusual life history. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 4350-4354, 1986.

DORJI, T.; JIANLIN, H.; WAFULA, P.; YAMAMOTO, Y.; SASAZAKI, S.; OYAMA, K.; HANOTTE, O.; LIN, B.Z.; MANNEN, H. Sheep genetic diversity in Bhutan using microsatellite markers. **Animal science journal**, v. 81, p.145-51, 2010.

EGITO, A A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p. 39-52, 2002.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. BRASÍLIA: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

GONÇALVES, G.L.; MOREIRA, G.R.P.; FREITAS, T.R.O. *et al.* Mitochondrial and Nuclear DNA Analyses Reveal Population Differentiation in Brazilian Creole Sheep. **Animal Genetics**, v.41, p.308-10, 2010.

LIGUIZA, C.D.P. **Marcadores microssatélites no MHC de ovinos: estudos de associação e diversidade genética na raça Santa Inês**. 2007. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2007.

MCMANUS, C.; COBUCCI, J.; J. NETO, B.; PAIVA, S.R. Decision making in animal breeding programs and their consequences for animal production. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.35, p.69-76, 2011.

MARIANTE, A. DA S.; ALBUQUERQUE, M.DO S.M.; EGITO, A.A.; MCMANUS, C. Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. **Animal Genetic Resources Information**, v.25, p. 107-121, 1999.

MARIANTE, A. Da S.; EGITO, A.A. Animal Genetic Resources In Brazil: Result Of Five Centuries Of Natural Selection . **Theriogenology**, v.57, p.223-235, 2002.

MARIANTE, A. DA S.; MCMANUS, C.;MEDONÇA, J.F. Country Report on the State of Animal Genetic Resources Brasil. Brasília: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, 2003. 92p.(Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Documentos, 99).

MEADOWS, J. R. S.; CEMAL, I.; KARACA, O.; GOOTWINE, E.; KIJJAS, J.W. Five Ovine Mitochondrial Lineages Identified From Sheep Breeds of the Near East. **Genetics**, v.175, p.1371–1379, 2007.

MEADOWS, J. R.S.; LI, K.; KANTANEN, J.; TAPIO, M.; SIPOS, W.; PARDESHI, V.; GUPTA, V.; CALVO, J.H.; WHAN, V.; NORRIS, B.; KIJAS, J.W. Mitochondrial Sequence Reveals High Levels of Gene Flow Between Breeds of Domestic Sheep from Asia and Europe. **Journal of Heredity**, v.96, p.494–501, 2005.

NIU, L. L.; LI, H. B.; MA, Y.H.; DU, L. X. Genetic variability and individual assignment of Chinese indigenous sheep populations (*Ovis aries*) using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 43, p.108-111, 2011.

PAIVA, S.R.; SILVÉRIO, V.C.; PAIVA, D.A.F.; MCMANUS, C.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A. da S.; CASTRO, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; DERGAM, J.A. Origin of the Main Locally Adapted Sheep Breeds of Brazil: A Rflp-Pcr Molecular Analysis. **Arch. Zootec.**, v. 54, p.395-399, 2005a.

PAIVA, S.R. **Caracterização Da Diversidade Genética De Ovinos No Brasil Com Quatro Técnicas Moleculares**. f. 108. Doutorado em Genética e Melhoramento, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005b.

PARISET, L.; MARIOTTI, M.; GARGANI, M.; PEREZ, TRINIDAD; BRUFORD, MICHAEL; MARSAN, P. A.; VALENTINI, A. Genetic Diversity of Sheep Breeds from Albania, Greece, and Italy Assessed by Mitochondrial DNA and Nuclear Polymorphisms (SNPs). **The Scientific World Journal**, v.11, p.1641–1659, 2011.

RIBEIRO, N.L.; FURTADO, D.A.; MEDEIROS, A.N.; RIBEIRO, M.N.; SILVA, R.C.B.; SOUZA, C.M.S. Avaliação dos índices de conforto térmico, parâmetros fisiológicos e gradiente térmico de ovinos nativos. **Eng. Agríc.**, v.28, p.614-623, 2008.

SANTOS, J.R.S.; SOUZA, B.B.; SOUZA, W.H.; CEZAR, M.F.; TAVARES, G.P. Respostas fisiológicas e gradientes térmicos de ovinos das raças Santa Inês, Morada Nova e de seus cruzamentos com a raça Dorper às condições do semi-árido nordestino. **Ciênc. agrotec.**, v. 30, p. 995-1001, 2006.

TSERENBATAA, T.; RAMEY, R.R.; RYDER, O.A. et al. A Population Genetic Comparison of Argali Sheep (*Ovis Ammon*) in Mongolia Using the Nd5 Gene of Mitochondrial DNA; Implications for Conservation. **Molecular ecology**, v.13, p.1333-39, 2004.

VILLARROEL, A.B.S.; FERNANDES, A.A.O. Desempenho reprodutivo de ovelhas deslanadas Morada Nova no Estado do Ceará. **Rev. Cient. Prod. Anim.**, v.2, p. 65-70, 2000.

CAPÍTULO II

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA DE POPULAÇÕES DAS VARIETADES DE OVINOS MORADA NOVA COM MARCADORES MICROSSATÉLITES E MITOCONDRIAIS

Trabalho submetido a revista:
Genetics and Molecular Research
Página eletrônica:
geneticsmr.com
ISSN: 1676-5680

Diversidade genética e estrutura de populações das variedades de ovinos Morada Nova com marcadores microssatélites e mitocondriais

Diversidade genética e estrutura de populações de ovinos

J.S.B. Ferreira¹, S.R. Paiva⁵, E.C.Silva³, C.M. McManus⁴, A. R. Caetano⁵, D.A.E. Façanha^{1,2} e M.A.N. Sousa^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Produção Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil,

² Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brasil,

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil,

⁴ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil,

⁵ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

Corresponding author: S.R. Paiva

E-mail: samuel.paiva@embrapa.br

Resumo. O objetivo desse trabalho foi analisar a diversidade genética e estrutura de população das variedades Branca (N=40), Vermelha (N=32) e Negra (31) da raça ovina Morada Nova, em rebanhos do semiárido nordestino Brasileiro através do uso de 17 marcadores nucleares microssatélites e duas regiões do DNA mitocondrial (mtDNA), o gene ND5 e a região controle (D-loop). A análise da variabilidade intra-populacional demonstrou que a variedade Branca apresentou maiores valores de diversidade, enquanto a Vermelha apresentou os menores valores. A análise bayesiana para avaliar a estrutura genética populacional permitiu diferenciar entre as variedades Branca, Vermelha e Negra e uma tendência de sub-estruturação relacionada aos rebanhos dos Estados da Paraíba e Ceará da variedade Branca. Os resultados das Análises de Variância Molecular (AMOVA) evidenciaram que a maior estruturação genética foi observada quando se compararam rebanhos ao invés de variedades (8,59% versus 6,64% da variação total observada, $P < 0,001$). Tanto a análise de Coordenadas Principais como o dendrograma, por meio da distância genética Dtl, mostraram a formação de dois grupos principais, um composto por indivíduos brancos e outro por indivíduos vermelhos e Negros. Cinco haplótipos foram encontrados para região D-loop e dois para o gene ND5. Um haplótipo exclusivo para variedade vermelha foi encontrado na região D-loop e um haplótipo exclusivo para variedade Negra no gene ND5, mas as frequências destes foram baixas e, portanto existe necessidade de validação adicional. Os resultados obtidos reforçam a existência de diferenças significativas entre as variedades Vermelha e Branca da raça e deverão ser utilizados para o aperfeiçoamento dos programas de conservação e uso de recursos genéticos.

Palavras-chave: Microssatélites; *Ovis aries*; mtDNA; recursos genéticos animais

INTRODUÇÃO

O Brasil possui diversas raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses, logo após o descobrimento. Desde então, as populações desses animais foram sendo selecionadas naturalmente, pelas condições climáticas locais, dando origem às raças naturalizadas brasileiras, também conhecidas como locais ou crioulas (Mariante et al., 2009). A cultura industrial criada durante o século XX induziu a alterações nos sistemas de produção e das raças utilizadas nesses sistemas (MacManus et al., 2011). Raças consideradas exóticas, altamente produtivas, mas selecionadas em regiões de clima temperado, foram importadas e por cruzamentos absorventes, causaram uma rápida substituição e erosão das raças locais (Egito et al., 2002).

Para evitar a perda deste importante material genético, em 1983, o Centro de Pesquisa Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) decidiu incluir a conservação dos recursos genéticos animais em seu programa de pesquisa Conservação e Utilização dos Recursos Genéticos, que, até então, tinha contemplado apenas plantas (Mariante e Egito, 2002). No ano de 2007 a Embrapa Caprinos e Ovinos, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a Associação Brasileira dos Criadores de Ovinos da Raça Morada Nova (ABMOVA) e outras instituições de pesquisa e ensino iniciaram o projeto de pesquisa e desenvolvimento intitulado "Núcleo de Conservação e Melhoramento Genético da Raça Morada Nova" e no ano de 2008 aprovaram um outro projeto intitulado "Caracterização e bases para o melhoramento genético de ovinos da raça Morada Nova". O interesse por este grupo genético foi despertado a partir da conscientização de sua ameaça de

extinção (Mariante et al., 2003) e pelo conhecimento de sua adaptação as regiões semiáridas (Villaruel e Fernandes, 2000; Santos et al., 2006; Ribeiro et al., 2008). A associação brasileira de criadores de ovinos (ARCO) reconhece a existência de duas variedades da raça: a variedade de pelagem Vermelha e a de pelagem Branca. No entanto no mercado comercial de ovinos do Brasil circulam animais conhecidos morfológicamente como a variedade Negra da raça Morada Nova. O Serviço de Registro Genealógico das Raças Ovinas (SRGRO) não reconhece essa variedade como pertencente a raça e em consequência da ausência de registro destes animais os produtores rurais restringem sua reprodução e muitas vezes optam pelo descarte. Estudos realizados por Paiva (2005a) com a utilização da região D-loop e 19 marcadores microssatélites demonstraram que as variedades Branca e Vermelha da raça ovina Morada Nova apresentavam variabilidade genética diferente entre si e poderiam ser consideradas grupos genéticos distintos. Contudo esse estudo englobou apenas um rebanho de cada variedade, Branca e Vermelha, e não incluiu a provável variedade Negra. Assim, o presente trabalho teve como objetivos principais validar em outros rebanhos a diferenciação genética entre as variedades Vermelha e Branca da raça Morada Nova e testar se os animais de pelagem Negra também podem ser diferentes através do uso de marcadores nucleares microssatélites e mitocondriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, processamento e armazenamento das amostras

Foram coletadas amostras de sangue de 103 indivíduos das variedades Vermelha, Branca e Negra da raça ovina Morada Nova (Tabela 1), por meio de punção venosa na jugular, em tubos de 10 mL com vácuo, contendo anticoagulante ácido etileno diaminotetracetato de sódio (EDTA). As amostras de sangue foram mantidas sob refrigeração a (4 - 8 °C) até o processamento para separação dos linfócitos. O processamento de separação e armazenamento dos linfócitos seguiu as seguintes etapas: a) Centrifugação a 3000 rpm/10 minutos e posterior remoção do plasma sanguíneo; b) Adição de soro fisiológico e centrifugação a 3000 rpm/10 minutos (procedimento repetido por três vezes); c) Remoção da camada de linfócitos com pipeta Pasteur e deposição em microtubos de 1,5 mL identificados; d) Armazenamento em freezer a -20°C.

Extração e quantificação de DNA

O DNA foi extraído de linfócitos a partir de modificações de um protocolo não orgânico proposto por Miller et al. (1988). As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop ND1000®) com a finalidade de verificar a qualidade e a quantidade do DNA.

Amplificações das regiões genômicas e mitocondriais

Marcadores nucleares

Para as reações de PCR foram selecionadas 17 *loci* microssatélites cujas condições de amplificações já haviam sido padronizadas no LGA: *D5S2*, *MAF214*, *MAF65*, *OLADRB*, *OarAE129*, *OarFCB304*, *OarHH35*, *SPS113*, *ILSTS11*, *INRA05*, *INRA35*, *INRA63*, *INRABERN172*, *SRCRSP5*, *MCM527*, *ILST87e* *OarCP49*. As reações de PCR

para os primers *INRA63*, *INRABERN172* e *MAF65* foram realizadas separadamente. Os demais primers, para diminuir o número de reações, foram distribuídos em 6 multiplexes de acordo com o tamanho do fragmento (pb) esperado para cada *locus* e o tipo de fluorescência (Tabela 2).

Foi utilizado o Kit para PCR da Quiagen® (Qiagen Master Mix) conforme recomendações do fabricante. Dessa maneira, as reações foram realizadas para um volume final de 5µL sendo compostas por 2,5 µL do PCR mix (50% do volume final), 0,5 µL do QSolution (10% do volume final), 0,1 µL de cada par de primer a 10 µM (concentração de 0,2µM no volume final) e 1,5 µL de DNA a 3 ng/µL (concentração de 0,9 ng no volume final). A quantidade de água RNase-free na reação variou com o número de primers utilizado nos multiplex, sendo utilizada para completar o volume final da reação.

As amplificações foram realizadas em termocicladores modelo Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) seguindo o programa: 1 ciclo de 95°C por 15 minutos para ativação da enzima Taq DNA Polimerase; 36 ciclos compreendendo uma desnaturação inicial a 94°C por 30 minutos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto; 1 ciclo a 72°C por 30 minutos para extensão final; 1 ciclo de 4°C para conservar o produto de PCR até serem retirados do termociclador.

Marcadores mitocondriais

As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas utilizando-se os primers ND5L (5'-AATAGTTTATCCAGTTGGTCTTAGG-3') e ND5RI (5'-AAGA TTTGTTGGAGATCTCAGGTG-3') (Tserenbataa et al, 2004) , para o fragmento correspondente a parte do gene ND5 e os primers mtCR-F2 (5'-AACTGCTTGACCGTACATAGTA 3' e mtCR-R1 (5'-AGAAGGGTATAAAGCACCGCC-3') (Meadows et al, 2005) para a região controle ou D-loop.

Para a região ND5 as reações foram realizadas para um volume final de 10 µL seguindo as seguintes condições: 0,5µM de cada primer, 1,0 mM dNTP, 5,0mM MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase, 0,45 ηg de DNA e tampão 1X (Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl). As amplificações foram realizadas em termocicladores modelo Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems) seguindo o programa: ciclo inicial de desnaturação à 95°C por 5 minutos, 36 ciclos de desnaturação à 95°C por 1 minuto, anelamento dos primers à 56°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final dos produtos à 72°C por 4 minutos.

As reações para amplificação da região D-loop foram realizadas para um volume de 10 µL seguindo as seguintes condições: 0,1µM de cada primer, 0,15 mM de dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 0,5U de Taq DNA polimerase , 0,45 ηg de DNA e tampão 1X (Tris-HCl, pH 8.4, 50mM KCl). O programa utilizado no termociclador seguiu o seguinte protocolo: ciclo inicial de desnaturação à 96°C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação à 94°C por 1 minuto, anelamento dos primers à 52°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto e 30 segundos, e uma extensão final dos produtos à 72°C por 20 minutos.

Obtenção de dados brutos dos microssatélites e das sequências de mtDNA

Para realização da genotipagem dos microssatélites foi utilizado à eletroforese capilar em sequenciador automático modelo ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). O sequenciamento das regiões mitocondriais foi realizado com o uso de

eletroforese capilar em sequenciador modelo ABI 3730 DNA Analyzer® (Applied Biosystems).

Análises dos dados

Microsatélites

Os dados gerados pelo sequenciador foram analisados utilizando-se os software GeneScan v.3.1. e Genotyper v. 3.7.0.1 (Applied Biosystems). A identificação das classes alélicas foi realizada com software FlexiBin v.2.0 (Amos et al., 2007). A partir do programa GenAlex v.6.4 (Peakall e Smouse, 2006) e Molkin v. 3.0 (Gutiérrez et al., 2005) foram obtidos em cada *locus* e população, os número efetivo de alelos (N_E), o número médio de alelos (N_M), heterozigosidade esperada (H_E), heterozigosidade observada (H) e conteúdo de informações polimórficas (PIC).

Também foram calculadas para cada *locus* e população as estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}) (Weir e Cockerhan, 1984), bem como o teste de significância de F_{IS} com o uso do programa Fstat v. 2.9.3.2 (Goudet, 2002). A avaliação da existência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro dos loci e populações analisadas foi realizada com o programa Genepop v.4.0.10 (Rwymond e Rousset, 1995).

Para análise de Coordenadas Principais (PCoA) foi calculada a distância genética Dtl (Tomiuk et al., 1998) baseada nas frequências genotípicas com o Molkin v.3.0 (Gutiérrez et al., 2005) entre cada par de indivíduos. Esta distância foi inserida no GenAlex (Peakall et al., 2006), substituindo a distância genética calculada com o mesmo para realização da PCoA. A matriz obtida a partir da distância Dtl foi utilizada no software SplitsTree v. 4.12.3 (Huson e Bryant, 2006) para construção do dendrograma pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

O software Structure v 2.3.4 (Prichard et al., 2000) foi utilizado para estimar qual o número mais provável de populações em que os genótipos analisados das variedades em estudo poderiam ser distribuídos. O programa estima o logaritmo natural da probabilidade que um dado genótipo X seja membro de uma determinada população K, ou seja, $K: \ln P(X/K)$. Foram estimadas as probabilidades para valores de K de 1-18. A consistência dos resultados foi avaliada utilizando para cada K, cinco repetições a partir de 100.000 iterações para a etapa de burn-in e 400.000 iterações das Cadeias de Markov e Simulações de Monte Carlo (MCMC). Os *loci* *MAF214*, *OLADRB*, *OarAE129* e *MAF214* foram excluídos da análise do número mais provável de populações por não estarem em equilíbrio de Hardy Weinberg(EHW) para a maioria das variedades em estudo.

A quantificação da estrutura de populações foi realizada por meio da análise de variância molecular (AMOVA). Três diferentes contrastes foram testados com o uso do programa Arlequin v.3.1 (Excoffier et al., 2006): Contraste I: os indivíduos foram separados por rebanhos (n=8); Contraste II: os indivíduos foram agrupados por estado (N=3); Contraste III: os indivíduos foram agrupados por variedade (N=3).

Marcadores mitocondriais

As sequências obtidas foram analisadas e editadas com auxílio do programa SeqScape® versão 2.7 (Applied Biosystems) utilizando com referência a sequência [AF010406] (Hiendleder et al., 1998). Após a edição, utilizou-se o programa MEGA versão 5.05 (Tamura et al., 2011) para alinhamento das sequências obtidas com as sequências do GenBank (Tabela 3) e também para produção dos arquivos de entrada para cálculos de diversidade das sequências.

Por meio do programa DNAsp versão 5 (Librado e Rozas, 2009) foram calculados, para cada variedade e região do mtDNA em estudo, os seguintes parâmetros de variabilidade: número de sítios polimórficos, número de haplótipos, cálculo de diversidade haplotípica e de diversidade nucleotídica.

A relação entre o número de haplótipos gerados e os haplótipos encontrados na raça brasileira Somali foi analisada através da construção de uma rede haplotípica pelo programa Network versão 4.1.1.2 (Fluxus Technology Ltd – www.fluxus-engineering.com) por meio do método Median-Joining – MJ (Bandelt et al., 1999).

RESULTADOS

Marcadores Microssatélites

Amplificação

Os dados brutos dos *loci* *OarCP49* e o *ILSTS87* não apresentaram qualidade suficiente na declaração dos alelos (genotipagem) e por isso foram excluídos das análises. Deste modo, foram utilizadas nas análises as informações de genotipagem de 103 indivíduos de ovinos Morada Nova para 15 *loci* microssatélites (*D5S2*, *MAF214*, *MAF65*, *OLADRB*, *OarAE129*, *OarFCB304*, *OarHH35*, *SPS113*, *ILSTS11*, *INRA05*, *INRA35*, *INRA63*, *INRABERN172*, *SRCRSP5*, *MCM527*).

Variação intra e inter-populacional

Foram detectados 81 alelos a partir dos 15 *loci* analisados para as três variedades da raça ovina Morada Nova em estudo, todos os *loci* foram polimórficos (Tabela 4). O número de alelos observado por *locus* variou de dois para *MAF214* a oito para *OLADRB*. Para o número médio de alelos a variação foi de 2 (*MAF214*) a 6,667 (*OLADRB* e *OARHH35*), com média de 2,794. A média observada para conteúdo de informações polimórficas (PIC) foi de 58,64% e os *loci* *D5S2*(40,46) e *OLADRB*(78,21) apresentaram os menores e os maiores valores respectivamente. Dos 15 *loci* analisados, 12 apresentaram valores de H_O menores do que de H_E . O menor valor de H_O foi de 0,263 para *OarAE129* e o maior 0,740 para *OarHH35*, de maneira que a média observada foi de 0,533. A variedade Branca apresentou os maiores valores para os índices de diversidade genética calculados, seguida da variedade Negra (Tabela 5). O desequilíbrio entre a H_O e a H_E foi causada por uma deficiência significativa de heterozigotos em cada *locus* como confirmado pelo teste de significância do F_{IS} (Tabela 6). Os valores médios para F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} foram respectivamente 18,5, 7 e 12,4 %. Dentro das análises inter-populacionais pode-se observar que os primeiros três componentes da análise das coordenadas principais explicaram 62,67% da variação entre as variedades de Morada Nova em estudo, sendo que o primeiro, o segundo e o terceiro componente corresponderam respectivamente a 27,93%, 18,86% e 15,88% da variação total. A partir da representação do PCoA (Figura 1) podemos observar a existência de dois grupos bem definidos, um correspondente a variedade Branca e outro

a variedade Vermelha. Os indivíduos que representavam a variedade Negra ficaram dispersos entre os indivíduos da variedade Branca e principalmente da variedade Vermelha.

Um dendrograma individual baseado no método de UPGMA (Figura 2) foi construído utilizando a estimativa da distância Dtl. A partir do dendrograma foi possível visualizar dois grupos principais, um formado principalmente por indivíduos da variedade Branca e outro formado por indivíduos das variedades Vermelha e "Negra", com algumas exceções. Esses resultados corroboram os obtidos na análise de PCoA (Análise de Coordenadas Principais).

Estrutura populacional

Os testes estatísticos realizados, utilizando a AMOVA, para o estudo da distribuição da estrutura populacional mostraram os valores de F_{ST} verificados para os grupos formados por rebanhos, Estados e variedades, respectivamente, de: 8,59, 3,19 e 6,64% ($P < 0,001$) (Tabela 7)

A análise realizada com software Structure partiu da existência de quatro populações subdivididas nas três variedades estudadas (Figura 3), entretanto, a distribuição das populações conforme a estrutura genética para $k= 2, 3$ também é descrita neste trabalho (Figura 4).

Considerado $K=2$ verificamos um grupo formado pela variedade Branca e outro pelas variedades Vermelha e Negra. As três variedades de Morada Nova (Vermelha, Branca e Negra) que representam as três populações neste estudo se agruparam em diferentes clusters para $K=3$ mostrando que apenas uma pequena proporção dos indivíduos de cada variedade encontra-se miscigenada, uma vez que as três variedades estão compartilhando alelos. Uma sub-estruturação dentro da variedade Branca, entre os animais dos Estados da Paraíba e Ceará foi observada com $K=4$ (Figura 5).

Marcadores mitocondriais

Após a edição das sequências foram obtidos 524 pares de base da região controle (D-loop) correspondentes a posição 16094 a 16616 do mtDNA de *Ovis aries* [AF010406] e dentro do mesmo foi identificada a presença de 8 SNPs, sendo todos caracterizados como transição, uma deleção e cinco haplótipos distintos (Tabela 8). O haplótipo mais frequente foi o H1, os haplótipos H2 e H4 foram exclusivos da raça morada Nova, não sendo verificado em sequências publicadas no GenBank. Com relação às variedades, o haplótipo H5 foi o único específico para variedade Vermelha, no entanto apresentou baixa frequência (0,033) na amostragem geral e os indivíduos que o representam são pertencentes a mesma fazenda (FF-PB), esse haplótipo também foi encontrado em raças Ibéricas(Bordaleira E.D.M., Alcarreña e Lacaune) (Pedrosa et al., 2007). As frequências haplotípicas por variedade e por fazenda estão descritas nas Tabelas 9 e 10. Analisando um fragmento de 460 pb em conjunto com sequências da raça brasileira Somali disponíveis no GenBank verificamos, nas sequências deste estudo, a existência de três haplótipos correspondentes ao haplótipos H9, H11 e H12 identificados por Paiva et al. (2011) na raça Somali.

A região D-loop sequenciada apresentou valor de diversidade haplotípica (H_d) igual a 0,721 ($\pm 0,025$) e diversidade nucleotídica (π) igual a 0,00349 ($\pm 0,00012$). Entre as variedades estudadas a diversidade H_d e π variaram respectivamente de 0,782($\pm 0,042$; variedade Vermelha) a 0,66($\pm 0,057$; variedade Negra) e de 0,0436($\pm 0,00028$; variedade Negra) a 0,00395($\pm 0,00017$; variedade Branca)(Tabela 11).

Para o fragmento correspondente a região ND5 foram obtidos, após a edição, 435 pares de base e identificado um SNP, do tipo transição, e dois haplótipos. A região está localizada entre as posições 11846-12281 da sequência do mtDNA completo de *Ovis aries* (GenBank:AF010406) (Hiendleder et al., 1998). As sequências dessa região que se agruparam no haplótipo H1 são idênticas a sequência de *O. aries*[AF010406]. Apenas um indivíduo da variedade Negra da fazenda G - RN foi agrupado no haplótipo H2. O haplótipo H2 diferiu do H1 apenas em um par de base (T/C) na posição 11883 do mtDNA de *O. aries*.

Os valores de diversidade haplotípica (H_d) e nucleotídica (π) para região ND5 foram respectivamente 0,024(\pm 0,023) e 0,00006(\pm 0,00005). Para as variedades Vermelha e Branca os valores de H_d e π foram iguais a zero e para variedade Negra foram respectivamente de 0,083(\pm 0,075) e 0,00019(\pm 0,00017)(Tabela 11).

DISCUSSÃO

O princípio básico da conservação de raças e suas variedades é a manutenção da máxima variabilidade genética de forma a garantir uma exploração sustentável de longo prazo (MacManus et al., 2011), principalmente frente às mudanças climáticas previstas (Fiore et al., 2012).

Estudos de raças ovinas localmente adaptadas a diferentes regiões no Mundo e a descrição de suas combinações genéticas únicas por meio de ferramentas moleculares (Dalvit et al., 2009; Qwabe e Marle-Köster, 2012) tem sido utilizadas como forma de orientação para tomada de decisão em programa de conservação, na formação, inclusão e/ou exclusão de grupos genéticos em bancos de germoplasma. O uso dos resultados dos marcadores genéticos serve não apenas para prever a "melhor" estratégia de acasalamento para criação de animais, mas também para individualizar a gestão dos animais (MacManus et al., 2011).

Para estes tipos de estudos relacionados à conservação e melhoramento de recursos genéticos têm sido utilizados a análise de diferentes classes de marcadores moleculares (Činkulov et al., 2008; Pariset et al., 2011).

Esse procedimento é importante, pois cada marcador possui um tipo de informação genética diferente. Segundo Paiva et al. (2011) a utilização de apenas uma classe de marcador (em geral, microssatélites) para auxiliar políticas de conservação e manejo não é desejável, pois não fornecem todas as informações genéticas.

Deste modo, alguns trabalhos envolvendo a raça Morada Nova foram desenvolvidos com o uso de marcadores RFLP (Paiva et al., 2005c), RAPD (Paiva et al., 2005b), microssatélites e mtDNA (Paiva et al., 2005a).

Neste último trabalho, Paiva e colaboradores (2005a) observaram a diferenciação entre as variedades Branca e vermelha da raça ovina Morada através mtDNA, fato que foi reafirmado neste estudo, e que justifica a manutenção de bancos de germoplasma distintos para estas as duas variedades.

A constatação da existência de dois grupos dentro da variedade Branca, um do Estado do Ceará e outro da Paraíba ($K=4$) chama a atenção para inclusão de animais da fazenda F do Estado da Paraíba em núcleos de conservação, uma vez que, os indivíduos das fazendas D e E do Ceará já são oriundos de núcleos de conservação da raça existentes. Com relação à variedade Negra, os resultados das análises do Structure, da análise de coordenadas principais e árvore filogenética pelo método UPGMA apontam para validação da hipótese de que os ovinos de coloração negra são um subgrupo da variedade Vermelha. Entretanto, este sub-grupo apresenta combinações genéticas exclusivas. Portanto, mais estudos são necessários com estes animais de coloração de

pelame negra, visto que existe uma forte seleção contra estes animais, pois não são reconhecidos pela ARCO como pertencentes a raça Morada Nova.

Entre os produtores a coloração negra em ovinos Morada Nova é reconhecida como uma característica recessiva, pois apesar da intensa seleção contra esta característica, ela volta a aparecer na população a partir do acasalamento entre indivíduos da variedade Vermelha.

A cor do pelame dos mamíferos depende fundamentalmente da proporção entre dois pigmentos: a eumelanina e a feomelanina. A produção destes pigmentos é controlada pelos loci Extension (E), que corresponde ao gene MC1R, e pelo Agouti (A), que corresponde ao gene ASIP. Em alguns mamíferos, o locus extensão mostra efeito epistático sobre o locus Agouti. Alelos dominantes neste locus são responsáveis pela cor negra da pelagem. Mutações em outro gene o TYRP1 também foram associadas com variação de cor em uma série de mamíferos domésticos incluindo bovinos (Berryere et al., 2003).

Noriis e Whan, 2008 observaram que uma duplicação em tandem de 190-kb envolvendo as regiões codificantes do gene ovino ASIP, região codificante AHCY e a região promotora ITCH é a causa genética da cor branca dominante da ovelha. Portanto observa-se que vários estudos estão sendo realizados para elucidar o estudo da cor da pelagem de ovinos e estes indivíduos negros estudados neste trabalho estão sendo excluídos por não serem enquadrados na raça Morada Nova.

Com relação a análise mitocondrial dois haplótipos específicos da região D-loop (H2 e H4) foram identificados nos ovinos Morada Nova desta análise. Esta informação pode auxiliar no monitoramento de famílias dentro dos rebanhos amostrados de forma que a máxima variabilidade genética seja mantida. A região ND5 analisada neste trabalho não foi eficiente na análise da diversidade genética das variedades de Morada Nova em estudo.

CONCLUSÃO

1. A diferenciação genética, entre as variedades Branca e Vermelha da Morada Nova, é significativa. Portanto, elas podem ser consideradas grupos genéticos distintos;
2. A variedade Negra é um subgrupo da variedade Vermelha e deve ser inserido nos programas de conservação da raça Morada Nova;
3. A variedade Branca se apresenta subestruturada em dois grupos, um formado pelos indivíduos do Estado do Ceará e outro pelos indivíduos da Paraíba;
4. Os dois haplótipos exclusivos do ovino Morada Nova encontrados na região D-loop podem ser utilizados no monitoramento de famílias dentro dos rebanhos;
5. A região do Gene ND5 sequenciada nesse trabalho não foi eficiente no estudos de diversidade entre as variedades dos ovinos Morada Nova.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amos W, Hoffman A, Frodsham A, Zhang L, et al. (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solution. *Mol. Ecol.* 7: 10-14.
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999). Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16: 37-48.
- Berryere TG, Schmutz SM, Schimpf RJ, Cowan CM, Potter J, et al. (2003). TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *International Society for Animal Genetics, Animal Genetics*, 34: 169–175.

- Brezinsky L, Kemp SJ, Teale AJ (1993). 5 polymorphic bovine microsatellites (ILSTS010-014). *Animal Genetics*. 24: 75-76.
- Buchanan FC and Crawford AM (1992). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF214 Locus. *Animal Genetic*. 23:393-394.
- Buchanan FC, Swarbrick PA, Crawford AM (1991). Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF65 Locus. *Animal Genetic*. 23:85-85.
- Ćinkulov M, Tapio M, Ozerov M, Kiselyova T, et al. (2008). Genetic differentiation between the old and new types of Serbian Tsigai sheep. *Genetic Selection Evolution*. 40:321–331.
- Dalvit C, De Marchi M, Zanetti E, Cassandro M (2009). Genetic variation and population structure of Italian native sheep breeds undergoing in situ conservation. *J. Anim. Sci.* 87:3837-3844.
- De Gortari MJ, Freking BA, Kappes SM, Leymaster KA, et al. (1997). Extensive genomic conservation of cattle microsatellite heterozygosity in sheep. *Animal Genetics*. 28: 274-290.
- Ede AJ, Pierson CA, Crawford AM (1995). Ovine microsatellites at the OarCP34, OarCP38, OarCP43, OarCP49, OarCP73, OarCP79 and OarCP99 loci. *Animal Genetics*. 26:130-131.
- Egito AA, Mariante AS, Albuquerque MSM (2002). The brazilian resources conservation program. *Arch. Zootec*, 51:39-52.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006). Arlequin (version 3.1): an integrated software package for population genetics data analysis. Berne: University of Berne, 2006.
- Fiore AM, Naik V, Spracklen DV, Steiner A, et al. (2012). Global air quality and climate. *Chem Soc Rev*, 41: 6663-6683.
- Goudet J (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available at: [<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.htm>] Accessed June 2012.
- Gutiérrez JP, Royo LJ, Álvarez I, Goyache F (2005). MolKin v2.0: a computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity*. 96:718-721.
- Henry HM, Penty JM, Pierson CA, et al. (1993). Ovine microsatellites at the OARHH35, OARHH41, OARHH44, OARHH47 and OARHH64 loci. *Animal Genetic*, 24: 222.
- Hiendleder S, Mainz K, Plante, Y. et al. (1998) Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two different ancestral maternal sources: no evidence for contributions from Urial and Argali sheep. *Journal of Heredity*. 89: 113.
- Hoffmann I, Ajmone Marsan P, Barker JSF, Cothran EG, et al. (2004). New MoDAD marker sets to be used in diversity studies for the major farm animal species: recommendations of a joint ISAG/FAO working group. Proceedings of the 29th International Conference on Animal Genetics, Tokyo, Japan, 11–16 September, 2004: 123.
- Hulme DJ, Silk JP, Redwin JM, Barendse W, et al. (1994). Ten polymorphic ovine microsatellites. *Anim Genet*. 25: 434-5.
- Huson DH and Bryant D (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 254-267.
- Kemp SJ, Hishida O, Wambugu J, Rink A, et al. (1995). A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Animal Genetics*. 26: 299 - 306.

Librado P and Rozas J (2009). Dnasp V5: a software for comprehensive analysis of dna polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.

Maddox JF, Schibler L, Cribiu EP, Kang N (2000). Linkage mapping of goat ChirUCO, LSCV and SR-CRSP microsatellites in sheep. *Animal Genetics*. 31: 292-293.

Mariante AS and Egito AA (2002). Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology*. 57: 223-235.

Mariante AS, Albuquerque MSM, Egito AA, McManus C et al. (2009). Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. *Livestock Science*. 120: 204–212.

Mariante AS, McManus C, Medonça JF (2003). Country report on the state of animal genetic resources Brasil. Brasília: Embrapa Genetic Resources and Biotechnology (Embrapa Genetic Resources and Biotechnology. Documentos, 99).

McManus C, Cobuci J, Braccini Neto J, Paiva S (2011). Decision making in animal breeding programs and their consequences for animal production. *Rev. Bras. Reprod. Anim*. 35: 69-76.

Meadows JRS, LI K, Kantanen J, Tapio M, et al (2005). Mitochondrial sequence reveals high levels of gene flow between breeds of domestic sheep from Asia and Europe. *Journal of Heredity*. 96: 494-501.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting dna from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16:1215.

Norris BJ and Whan VA (2008). A gene duplication affecting expression of the ovine ASIP gene is responsible for white and black sheep. *Genome Res*. 18: 1282-1293.

Paiva SR (2005a). Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares. Doctoral thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Paiva SR, Facó O, Faria DA, Lacerda T, et. al. (2011). Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. *Trop Anim Health Prod*. 43: 1449–1457.

Paiva SR, Silvério VC, Paiva DAF, McManus C (2005c). Origin of the main locally adapted sheep breeds of Brazil: a RFLP-PCR molecular analysis. *Arch. Zootec*. 54: 395-399.

Paiva SR, Silvério VC, Egito AA, McManus, C, et al. (2005b). Genetic variability of the brazilian hair sheep breeds. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 40: 887-893.

Pariset L, Mariotti M, Gargani M, Joost S, et al. (2011). Genetic diversity of sheep breeds from Albania, Greece, and Italy assessed by mitochondrial dna and nuclear polymorphisms (SNPs). *The Scientific World Journal*. 11: 1641–1659.

Peakall ROD and Smouse PE (2006). Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol*. 6: 288-295.

Pedrosa S, Arranz JJ, Brito N, Molina A, et al. (2007). Mitochondrial diversity and the origin of Iberian sheep. *Genet. Sel. Evol*. 39: 91–103.

Penty JM, Henry HM, Ede AJ, Crawford AM (1993). Ovine microsatellites at the OarAE16, OarAE54, OarAE57, OarAE119 and OarAE129 loci. *Animal Genetic*. 24: 219.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945–959.

Qwabe SO, van Marle-Köster E, Visser C (2012). Genetic diversity and population structure of the endangered Namaqua Afrikaner sheep. *Trop Anim Health Prod*.

Raymond M and Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*. 86: 248-249.

- Ribeiro NL, Furtado, DA, Medeiros, AN, et al. (2008). Avaliação dos índices de conforto térmico, parâmetros fisiológicos e gradiente térmico de ovinos nativos. *Eng. Agríc*, 28: 614-623.
- Saitbekova N, Gaillard C, OBEXER-RUFF G, DOLF G (1999) Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics*. 30: 36-41.
- Santos JRS, Souza BB, Souza WH, et al. (2006). Respostas fisiológicas e gradientes térmicos de ovinos das raças santa Inês, Morada Nova e de seus cruzamentos com a raça Dorper às condições do semi-árido nordestino. *Ciênc. agrotec*. 30: 995-1001.
- Schwaiger FW, Weyers E, Epplen C, Brün J (1993). The paradox of MHC-DRB exon/intron evolution: α -helix and β -sheet encoding regions diverge while hypervariable intronic simple repeats coevolve with β -sheet codons. *Journal of Molecular Evolution*. 37: 260-272.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al (2011). Mega5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol*. 28: 2731-2739.
- Tomiuk J, Guldbbrandtsen B, Loeschke V (1998). Population differentiation through mutation and drift – a comparison of genetic identity measures. *Genetica*. 102/103: 545-558.
- Tserenbataa T, Ramey RR, Ryder OA, et al. (2004). A population genetic comparison of Argali sheep (*Ovis ammon*) in mongolian using the ND5 gene of the mitochondrial DNA; implications for conservation. *Mol. Ecol*. 13: 1333-1339.
- Vaiman D, Mercier D, Moazami-Goudarzi K, Eggen A (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization; synteny mapping; and polymorphism. *Mamm Genome*. 5: 288-297.
- Villarroel ABS and Fernandes AAO (2000). Desempenho reprodutivo de ovelhas deslanadas Morada Nova no estado do Ceará. *Revista Científica de Produção Animal*. 2: 65-70.
- Weir BS and Cockerham CC (1984). Estimating F'statistics for the analysis of the population structure. *Evolution*. 38: 1358–1370.

Tabela 1. Número de amostras conforme a fazenda, estado onde foi coletado e variedade da raça.

Fazenda	Posicionamento Geográfico	Estado	OMN_V	OMN_B	OMN_N	T
A	5°6'20"S 38°22'2"W	CE	04	-	-	04
B	5°6'20"S 38°22'2"W	CE	04	-	02	06
C	5°6'20"S 38°22'2"W	CE	04	-	-	04
D*	4°58'41"S 39°1'8"W	CE	-	13	-	13
E*	3°47'29"S 39°15'58"W	CE	-	08	-	08
F	7°17'53"S 35°28'41"W	PB	20	19	08	47
G	5°40'18"S 36°36'17"W	RN	-	-	14	14
H	5°34'38"S 36°54'30"W	RN	-	-	07	07
Total			32	40	31	103

OMN_V = Variedade Vermelha; OMN_B = Variedade Branca; e OMN_N = Variedade Negra; T = número total de animais coletados; *=Fazenda experimental representante de um núcleo de conservação.

Tabela 2. Nome dos loci, cromossomo (Cr.), sequência dos primers (F: forward e R: reverse), tamanho observado dos alelos (To), multiplex (M) e Referência.

<i>Loci</i>	<i>Cr.</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>	<i>To (pb)</i>	<i>M</i>	<i>Referência</i>
<i>D5S2</i>	5	F:tactcgtagggcaggctgcctg R:gagacctcaggggttgatcag	181-192	A	Hoffmann et al., (2004)
<i>MAF214*</i>	16	F:aatgcaggagatctgaggcagggacg R:gggtgatcttagggaggtttggagg	185-188	B	Buchanan e Crawford,(1992)
<i>OLADRB</i>	20	F:tgtgcagcggcgaggtgag R:cgtaccagagaktgagtgaagtac	265-281	A	Schwaiger et al., (1993)
<i>MAF65*</i>	15	F:aaaggccagagtatgcaattggag R:ccactcctctgagaatataacatg	121-134	-	Buchanan et al.,(1991)
<i>INRA05</i>	10	F:cttcaggcatacctacaccacatg R:aatattagccaactgaaaactggg	124-145	B	Vaiman et al., (1994b)
<i>OarAE129*</i>	5	F:aatccagtgtgtgaaagactaatccag R:gtagatcaagatatagaatattttcaacacc	132-147	C	Penty et al., (1993)
<i>SPS113</i>	10	F:cctccacacaggcttctctgactt R:cctaacttgcttgagttattgcc	230-245	D	Hoffmann et al., (2004)
<i>OarFCB304*</i>	19	F:ccctaggagctttcaataaagaatcgg R:cgtgctgctgtcaactgggtcaggg	160-184	D	Buchanan e Crawford,(1991)
<i>ILSTS11*</i>	9	F:gcttgctacatgaaagtgc R:ctaaaatgcagagccctacc	266-281	E	Brezinsky et al., (1993b)
<i>INRA35</i>	12	F:atcctttgcagcctccacattg R:ttgtgctttatgacactatccg	114-131	E	De Gotari et al., (1997)
<i>INRA63*</i>	14	F:atttgacacaagctaaatctaacc R:aaaccacagaaatgcttggaag	152-172	-	De Gotari et al., (1997)
<i>OarHH35</i>	4	F:aattgcattcagtatctttaacatctggc R:atgaaaatataaagagaatgaaccacacgg	109-133	F	Henry et al.,(1993)
<i>SRCRSP5*</i>	18	F:ggactctaccaactgagctacaag R:tgaatgaagctaaagcaatgc	145-152	F	Maddox et al.,(2000)
<i>MCM527</i>	5	F:gtccattgcctcaaatcaattc R:aaaccacttgactactcccaa	161-178	F	Hulme <i>et al.</i> (1994)
<i>INRABERN172</i>	22	F:ccacttcctgtatcctct R:gggtgctccattgtgtagac	145-167	-	Saitbekova et al., (1999)
<i>OarCP49</i>	17	F:cagacacggcttagcaactaaacgc R:gtgggatgaatattcctcataagg	-	C	Ede et al., (1995)
<i>ILSTS87</i>	6	F:agcagacatgatgactcagc R:ctgcctctttcttgagag	-	D	Kemp et al.,(1995)

**Loci* recomendados pela FAO para estudos de caracterização genética em ovinos (FAO, 2011).

Tabela 3. Número de acesso das sequências de *Ovis aries* obtidas no GenBank para análises comparativas com o grupo Ovino Morada Nova. Os haplótipos (H) descritos correspondem aos identificados nas amostras de Morada Nova analisadas neste estudo em negrito, estão os haplótipos comuns entre os identificados neste trabalho e os da raça brasileira Somali obtidos a partir da análise de 460 pb e descritos na análise do Network.

Acesso	Raça	Origem	H	Referência
DQ791076.1	Churra	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791074.1	Rasa Aragonesa	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791050.1	Rasa Aragonesa	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791049.1	Manchega	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791033.1	Churra Ga. Bragança	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791030.1	Merino de Grazalema	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791020.1	Manchega	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791010.1	Ojalada	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791009.1	Alcarreña	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791006.1	Churra Ga. Bragança	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791005.1	Montesina	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791004.1	Rasa Aragonesa	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791002.1	Manchega	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ790910.1	Merino Preto	Região Ibérica	H1	Pedrosa et al., 2007
DQ791166.1	Ojalada	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
DQ791161.1	Castellana	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
DQ791160.1	Castellana	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
DQ791135.1	Castellana	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
DQ791061.1	Bordaleira E.D.M.	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
DQ790934.1	Merino Branco	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
DQ790918.1	Merino Preto	Região Ibérica	H3	Pedrosa et al., 2007
JQ286338.1	Rambouillet	Região Ibérica	H3	Não publicado
DQ791183.1	Bordaleira E.D.M.	Região Ibérica	H5	Pedrosa et al., 2007
DQ791170.1	Alcarreña	Região Ibérica	H5	Pedrosa et al., 2007
DQ791169.1	Lacaune	Região Ibérica	H5	Pedrosa et al., 2007
DQ791168.1	Bordaleira E.D.M.	Região Ibérica	H5	Pedrosa et al., 2007
AF010406.1	Merino Landschaf	Alemanha	-	Hiendleder et al., 1998
HQ593514.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593515.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593516.1	Somali	Brasil	H4	Paiva et al., 2011
HQ593517.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593518.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593519.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593520.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593521.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593522.1	Somali	Brasil	H10	Paiva et al., 2011
HQ593523.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593524.1	Somali	Brasil	H12	Paiva et al., 2011
HQ593525.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593526.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593527.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593528.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011
HQ593529.1	Somali	Brasil	-	Paiva et al., 2011

Tabela 4. Estimativa por lócus de diversidade genética para os 15 loci de microssatélites estudados em três variedades de ovinos Morada Nova.

<i>Loci</i>	N_T	N_M	N_E	H_O	H_E	PIC(%)	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	^a EHW
<i>D5S2</i>	3	2,333	1,955	0,43	0,483	40,46	0,130	-0,004	0,131	1
<i>OLADRB</i>	8	6,667	4,282	0,688	0,752	78,21	0,175	0,073	0,154**	3
<i>OarAE129</i>	4	4	2,116	0,263	0,498	52,73	0,602	0,245	0,567**	3
<i>OarFCB304</i>	7	5,333	3,297	0,686	0,691	66,66	0,043	0,000	0,043	-
<i>SPS113</i>	7	6,333	3,662	0,663	0,723	72,08	0,140	0,044	0,127**	-
<i>INRA05</i>	6	4,667	1,926	0,381	0,411	45,57	0,225	0,158	0,182**	-
<i>INRABERN172</i>	6	5	1,827	0,394	0,427	40,48	0,118	0,021	0,112	1
<i>MAF65</i>	5	4,333	3,575	0,703	0,698	70,67	0,088	0,067	0,068	1
<i>INRA35</i>	5	5	2,617	0,646	0,618	60,46	0,000	0,031	-0,01	-
<i>ILSTS11</i>	4	4	2,577	0,52	0,588	58,58	0,206	0,073	0,186**	1
<i>MAF214</i>	2	2	1,823	0,266	0,446	36,41	0,443	0,104	0,423**	2
<i>INRA63</i>	7	4,667	3,048	0,616	0,659	63,04	0,116	0,035	0,105*	-
<i>OarHH35</i>	7	6,667	3,395	0,74	0,702	74,22	0,095	0,123	0,057	-
<i>SRCRSP5</i>	3	3	2,164	0,351	0,521	48,44	0,375	0,027	0,369**	2
<i>MCM527</i>	7	5,333	3,65	0,646	0,722	71,54	0,153	0,039	0,142**	1
Total	5,4	4,622	2,794	0,533	0,596	58,64	0,185	0,070	0,166**	

N_T = Número total de alelos; N_M = Número médio de alelos; N_E = Número efetivo de alelos; H_E = Heterozigosidade Esperada; H_O = Heterozigosidade observada; PIC = Conteúdo de informações Polimórficas; F_{IS} = índice de fixação dentro das populações; F_{IT} = índice de fixação referente à população global; F_{ST} = coeficiente de parentesco entre indivíduos de populações diferentes; EHW = Número das variedades estudadas que desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P < 0,05); * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

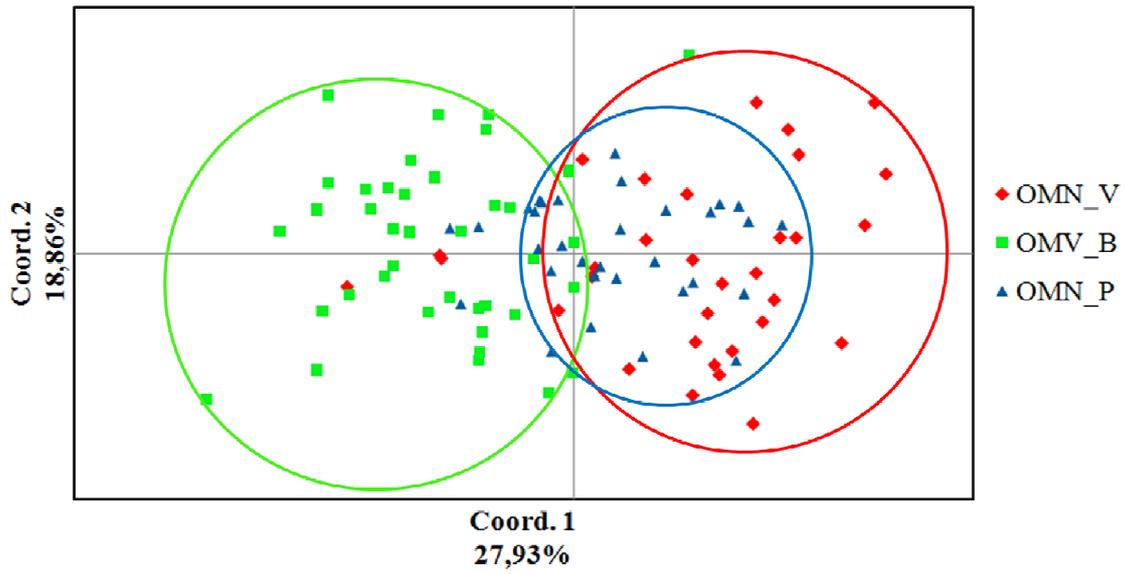
Tabela 5. Estimativa de diversidade genética para as variedades de ovinos Morada Nova em estudo através dos 15 loci de microssatélites.

Variedade	N	N_M	N_E	H_O	H_E	PIC	^aEHW
OMN_V	32	4,467	2,637	0,5	0,588	40,55	5
OMN_B	40	4,8	2,995	0,568	0,617	46,13	7
OMN_N	31	4,6	2,751	0,53	0,583	40,34	3
Média		4,622	2,794	0,533	0,596	42,34	

N = Número de amostras utilizadas nas análises; *N_M* = Número médio de alelos; *N_E* = Número efetivo de alelos; *H_E* = Heterozigosidade Esperada; *H_O* = Heterozigosidade observada; *PIC* = Conteúdo de informações polimórficas; ^aEHW = Número de *loci* que desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05\%$); OMN_V = Variedade Vermelha; OMN_B = Variedade Branca; OMN_N = Variedade Negra.

Figura 1. Representação bidimensional da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das três variedades da raça ovina Morada Nova. OMN_V=Variedade vermelha; OMN_B= Variedade branca;OMN_P= Variedade negra.

A)



B)

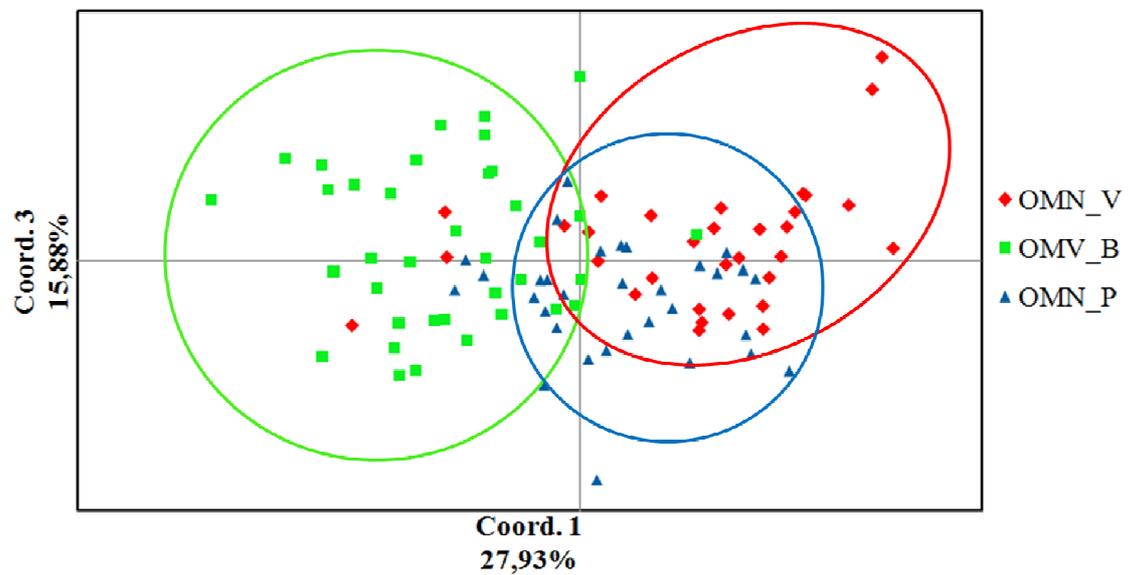


Figura 2. Dendrograma obtido a partir do método UPGMA baseado na distância Dtl, com uso de 15 marcadores microssatélites para verificação da relação entre as três variedades estudadas.

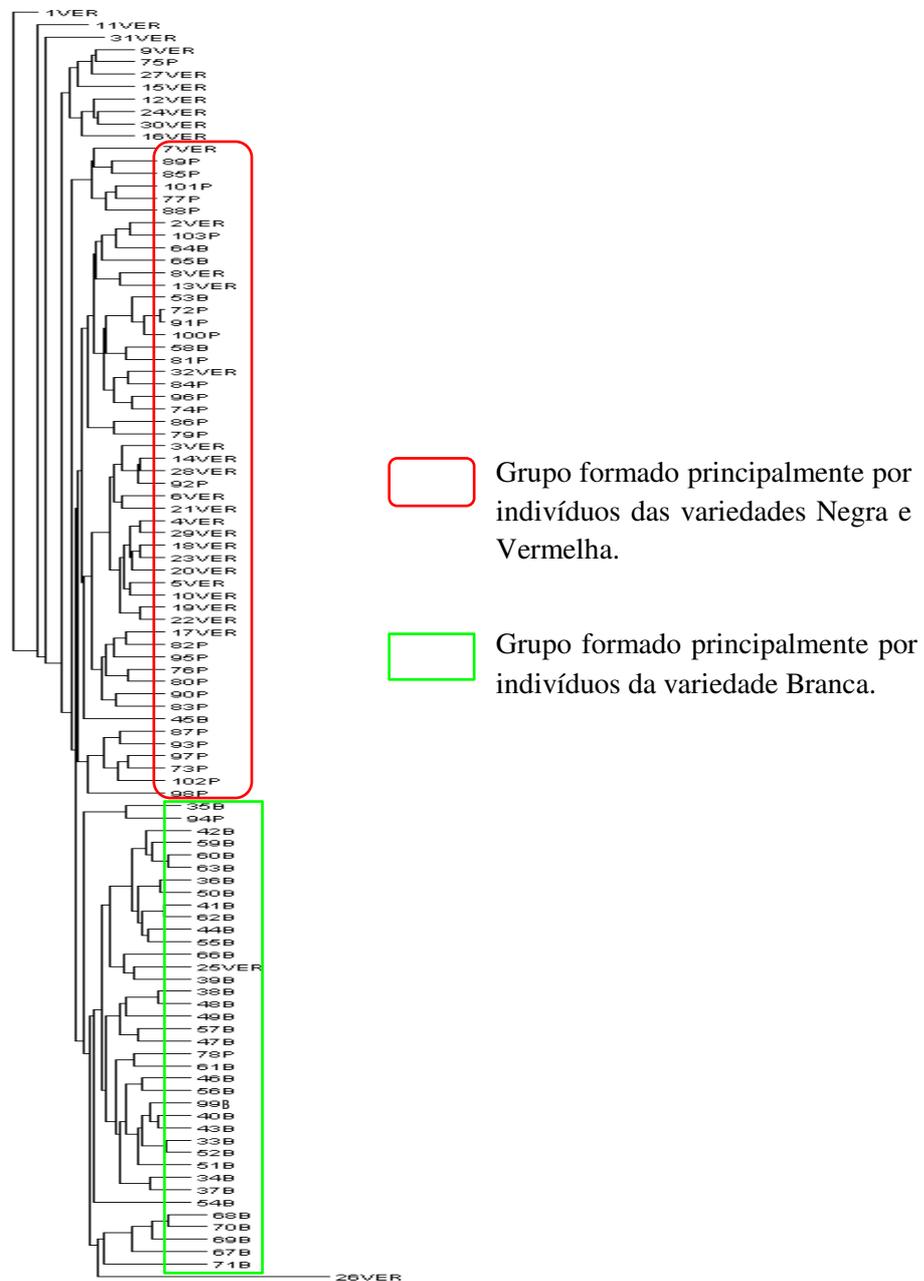


Tabela 6. Estimativa do índice de fixação dentro das populações (FIS) nas três variedades de ovinos Morada Nova estudadas.

Loci	OMN_B	OMN_N	OMN_V
D5S2	0,2	0,065	0,094
OLADRB	0,182*	-0,099	0,193*
OARAE129	0,275*	0,546***	0,534***
OARFCB	-0,185	0,043	0,269*
SPS113	0,1	0,064	0,138
INRA05	0,011	0,231	0,122
INRABERN172	0,189	0,174	-0,011
MAF65	-0,316	0,024	0,247**
INRA35	-0,044	-0,094	0,045
ILSTS11	0,285**	0,093	-0,059
MAF214	-0,031	0,642***	0,532**
INRA63	0,139	0,07	0,019
OARHH3	0,033	-0,121	-0,022
SRCRSP5	0,536***	0,146	0,265*
MCM527	0,097	0,175	0,095
Média	0,093***	0,108***	0,167***

* P · 0,05; ** P · 0,01; *** P · 0,001.

Figura 3. Estimativa do melhor K pela distância estatística DeltaK para as populações inferidas com o programa Structure, que variou de K=1 a K=20, para as variedades estudadas.

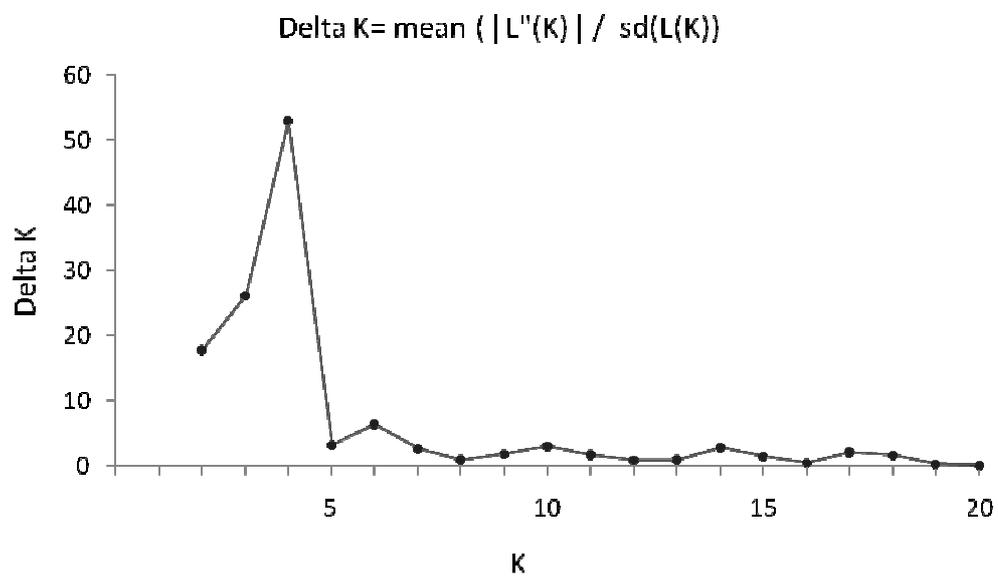


Figura 4. Distribuição das proporções de cada indivíduo em cada cluster inferido pelo Structure com k=2, 3 e 4 . As variedades estão separadas pelas linhas Negras verticais.

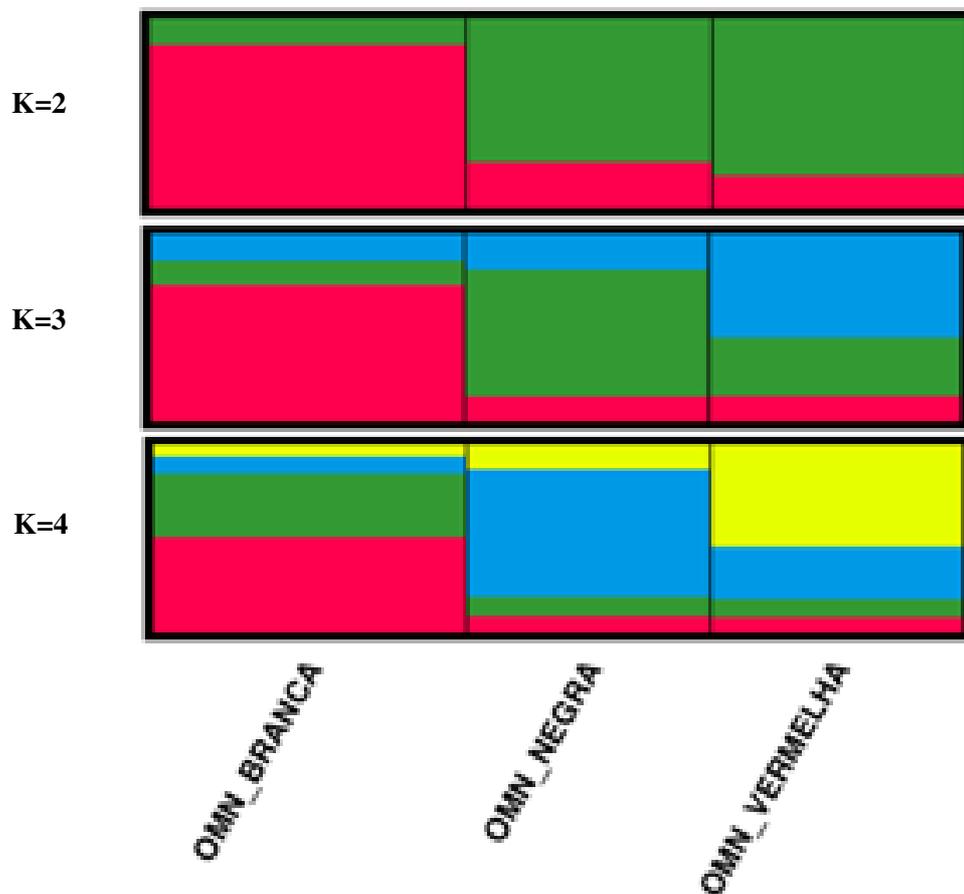


Figura 5. Distribuição das proporções de cada indivíduo em cada cluster inferido pelo Structure com k=4. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical. Os números entre parêntese indicam a variedade: 1= OMN_B; 2= OMN_N; 3= OMN_V.

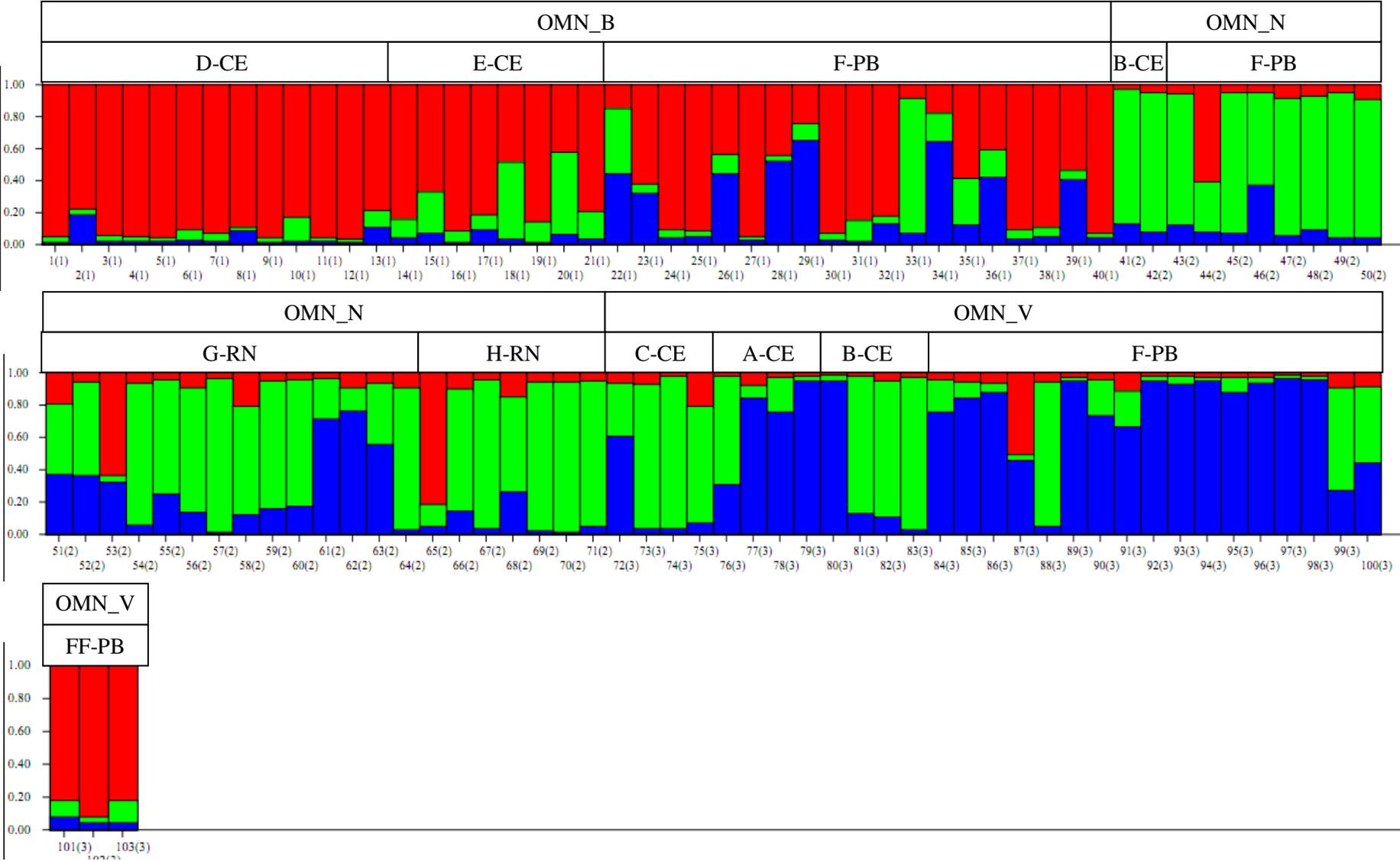


Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estrutura das três variedades de ovinos Morada Nova estudadas.

Estrutura	Fonte de variação	GL	SQ	CV	% de variação	F _{ST}
Análise I	Entre rebanhos	7	83,289	0,36685 Va	8,59	0,08586*
	Dentro dos rebanhos	198	773,391	3,90601 Vb	91,41	
	Total	205	856,680	4,27287		
Análise II	Entre Estados	2	25,798	0,13469 Va	3,19	0,03186*
	Dentro dos Estados	203	830,882	4,09301 Vb	96,81	
	Total	205	856,680	4,22771		
Análise III	Entre variedades	2	46,671	0,28368 Va	6,64	0,06638*
	Dentro das variedades	203	810,008	3,99019 Vb	93,36	
	Total	205	856,680	4,27387		

GL=graus de liberdade; SQ= soma de quadrados; CV= componente de variação; F_{ST}=índice de fixação; *P<0,001.

Tabela 8. Haplótipos encontrados no sequenciamento da região D-loop em 92 amostras, sendo 36 animais da variedade Branca, 26 animais da variedade Vermelha e 30 animais da variedade Negra.

	1	1	1	1	1	1	1	1
Posição no	6	6	6	6	6	6	6	6
mtDNA	0	1	2	3	3	4	4	6
	9	2	1	4	9	2	5	0
	7	8	7	3	2	9	3	2
GenBank: AF010406.1	A	C	C	T	T	C	G	C
H1	.	T	T	C
H2	G	T	.	C	.	T	A	.
H3	.	T	.	C	C	.	.	.
H4	.	T	.	C	.	T	A	.
H5	.	T	T	C	.	.	.	T

Tabela 9. Frequências haplotípicas para as regiões D-loop e ND5 do mtDNA nas três variedades de ovinos Morada Nova estudadas.

Região do mtDNA	Frequência Haplotípica na População						
	D-loop					ND5	
Variedade / Haplótipo	H1	H2	H3	H4	H5	H1	H2
Vermelha	5	9	2	7	3	28	-
Branca	16	13	1	6	-	31	-
Negra	8	15	6	1	-	23	1
Total	29	37	9	14	3	82	1

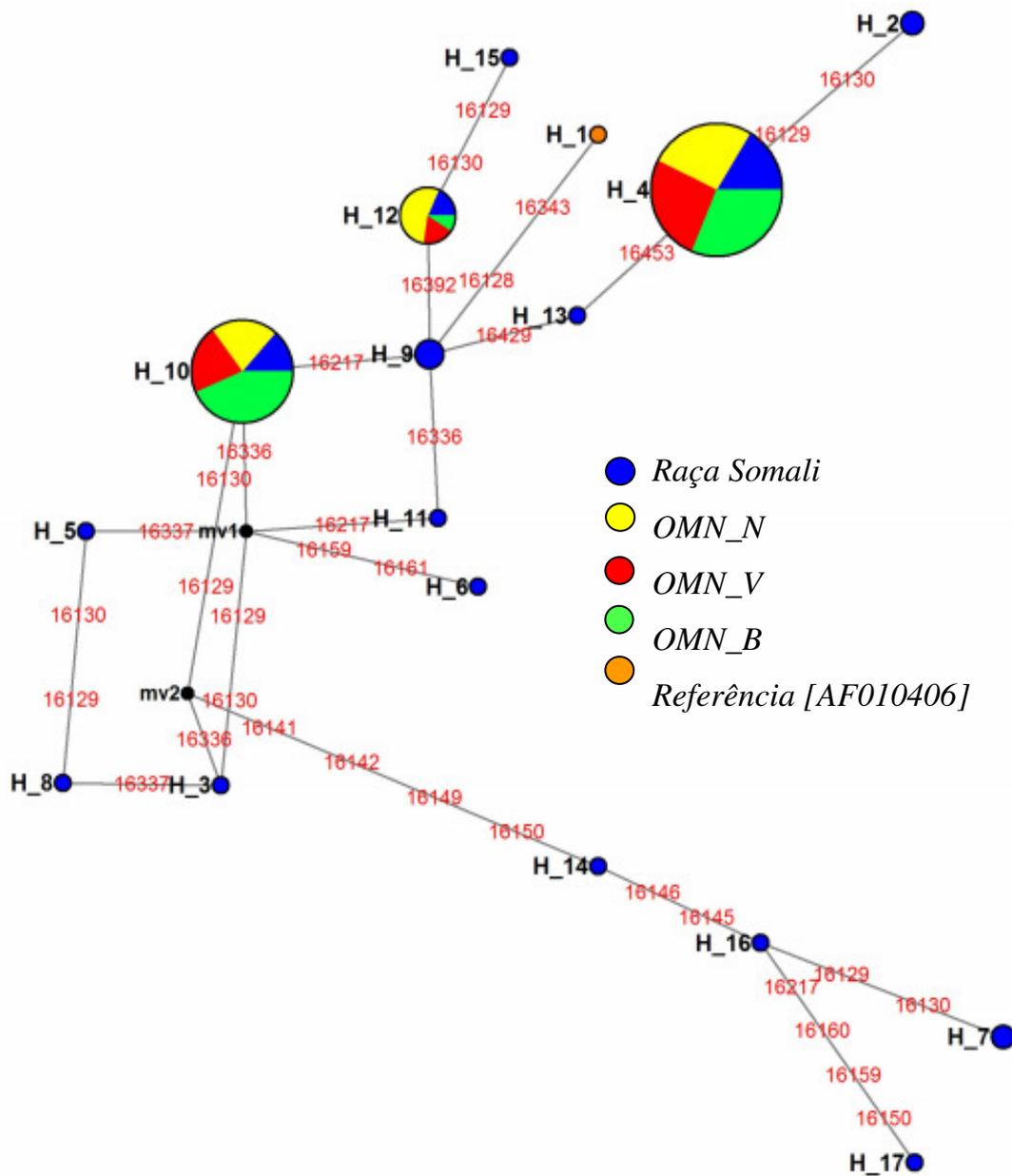
Tabela 10. Frequências haplotípicas para as regiões D-loop e ND5 do mtDNA nas oito fazendas estudadas.

Região do mtDNA	Frequência Haplotípica por Fazenda						
	D-loop					ND5	
	H1	H2	H3	H4	H5	H1	H2
Fazenda / Haplótipo							
A	-	1	-	-	-	3	-
B	3	1	2	-	-	5	-
C	1	-	1	2	-	2	-
D	2	5	-	4	-	8	-
E	2	3	1	2	-	6	-
F	18	12	3	6	3	40	-
G	3	10	-	-	-	11	1
H	-	5	2	-	-	7	-
Total	29	37	9	14	3	82	1

Tabela 11. Parâmetros da variabilidade para a região D-loop e o gene ND5 do mtDNA dentro das variedades de ovino Morada Nova.

Parâmetros	D-loop			ND5		
	OMN_V	OMN_B	OMN_N	OMN_V	OMN_B	OMN_N
Nº de indivíduos	26	36	30	28	31	24
Nº de haplótipos	5	4	5	1	1	2
Nº de sítios polimórficos	6	5	5	0	0	1
Diversidade haplotípica (<i>Hd</i>)	0,782 (0,042)	0,662 (0,041)	0,660 (0,057)	0	0	0,083 (0,075)
Diversidade nucleotídica (π)	0,00432 (0,00044)	0,00395 (0,00017)	0,00436 (0,00028)	0	0	0,00019 (0,00017)

Figura 6. Rede Median-Joining (MJ) gerada a partir de 460 pb da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial por meio do programa Network. Os círculos dos haplótipos possuem tamanho proporcional a sua frequência e os números em vermelho representam a posição das mutações que diferenciam cada haplótipo.



ANEXO:

Normas da Revista Genetics and Molecular Research

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

SUBMISSION OF PAPERS

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

1. Manuscripts must be submitted through our online submission platform hosted at: <http://mc.manuscriptcentral.com/gmb>

The cover letter should be addressed to:

Marcio C. Silva-Filho, Editor-in-Chief, Genetics and Molecular Biology

2. For submission the following instructions must be observed:

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

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

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

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page. The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

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

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

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

The text includes the following elements:

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

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study.

Statistical methods should be explained at the end of this section.

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

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

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

e) **The References Section:** References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>).

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

Sample journal article citation:

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

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

Sample book citation:

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

Sample chapter-in-book citation:

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

Sample electronic article citation:

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

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

Sample Internet resource citation:

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

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

g) **Tables:** must be in Word format prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator). A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered

consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

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

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

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

j) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

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

l) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

m) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

Supplementary material - the following online material is available for this article:

- *Table S1 – < short title >*
- *Figure S1 – < short title >*

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications;

- should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited;
- should include an Abstract;
- but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion; all in a single section and without headers.
- up to four items (tables and/or figures) may be submitted;

Note: The title page, abstract and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.m.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor should be contacted prior to submission.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding other. The latter will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by fax to the Editorial Office.

5. Reprints

Reprints are free of charge and will be provided as a pdf-file.