

## DNA mitocondrial e nuclear revelam diferenciação populacional na Ovelha Crioula Brasileira\*

Gislene L. Gonçalves\*\*, Gilson R.P. Moreira†,  
Thales R.O. Freitas\*, Diego Hepp‡, Daniel T.  
Passos‡ e Tânia. A. Weimer‡

\*\*Departamento de Genética, Instituto de  
Biociências, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500.  
Porto Alegre, RS 91501-970  
lopes.goncalves@ufrgs.br

†Departamento de Zoologia, Instituto de  
Biociências, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500.  
Porto Alegre, RS 91501-970

‡Laboratório de Biotecnologia, Hospital  
Veterinário, Universidade Luterana do Brasil.  
Av. Farroupilha, 8001. Canoas, RS 92420-280

\*Tradução do artigo original *Mitochondrial and nuclear DNA analyses reveal population differentiation in Brazilian Creole sheep* publicado em 2010 no periódico *Animal Genetics*, volume 41, 3 edição, páginas 308 a 310.

A ovelha crioula é criada há séculos no sul do Brasil (Rio Grande do Sul, RS e Santa Catarina, SC), onde dois principais fenótipos são reconhecidos. Alguns traços morfológicamente distintos permitem que as variedades sejam diferenciadas (Fig. S1), incluindo tamanho corporal e comprimento e cor da lã (Henkes *et al.* 1993; Vaz 2000). Também, existe uma diferença histórica na distribuição dos rebanhos para os quais as duas variedades foram originalmente nominadas por Vaz (2000), como Fronteira e Serrana. Ambas as variedades são criadas no sul do Brasil, porém, enquanto o tipo Fronteira é encontrado nas áreas planas, na metade sul do Estado do RS, os rebanhos de Serrana estão no Planalto do Sul do Brasil, o qual se estende ao longo da metade norte do RS e os Estados de SC e Paraná (Fig. 1).

Neste estudo investigou-se a diferenciação genética destas duas variedades utilizando informações de seqüências do gene subunidade 5 da álcool desidrogenase (ND5) e 10 loci nucleares.

Um total de 225 indivíduos foram amostrados a partir de 4 rebanhos de Fronteira (n= 69) e 8 de Serrana (n=156) localizados nos Estados do RS e SC (Fig. 1; Tabela S1). Amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA e congeladas a -20 C. O DNA total foi isolado de acordo com o método de Miller *et al.* (1988). O DNA foi amplificado e seqüenciado utilizando os *primers* e as condições de reações de PCR descritos por Tserenbataa *et al.* (2004).

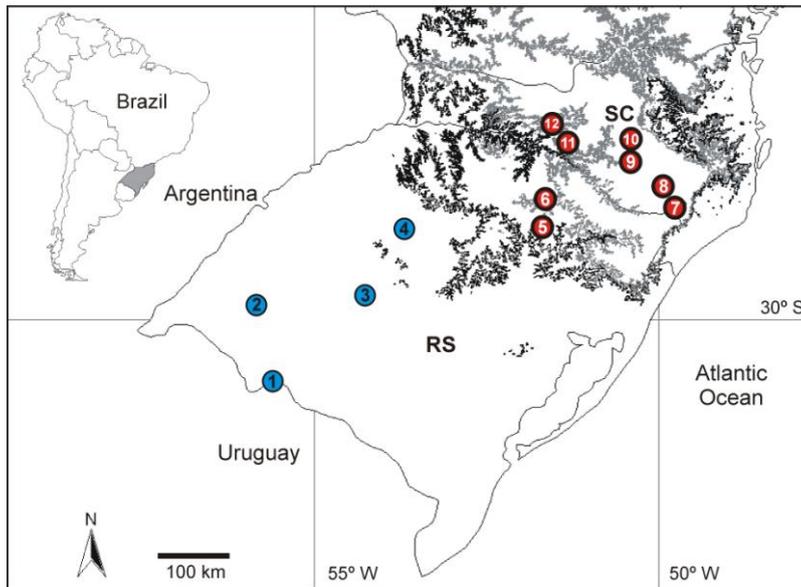


Figura 1. Localização de rebanhos de ovelhas crioulas amostrados nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil (gerado utilizando o software ArcView®). O Planalto do Sul do Brasil é representado por linhas de contorno preto a altura de 500 metros, e cinza a 800 metros (dados de: [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br), acessado em 9 de setembro de 2008). Rebanhos de Fronteira e Serrana são indicados, respectivamente, por círculos azuis e vermelhos; as localidades estão listadas na Tabela 1.

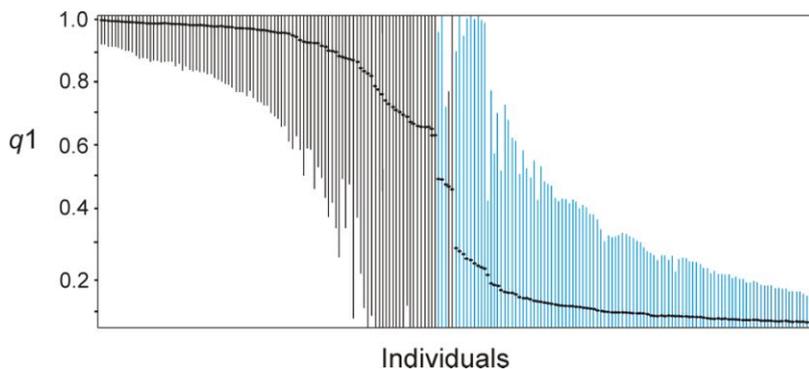


Figura 2. Análise Bayesiana da mistura de duas variedades de ovinos, tendo  $K = 2$ . Os círculos pretos representam o valor médio de  $q_1$  para cada indivíduo. As linhas verticais representam o intervalo de confiança (IC). As linhas pretas correspondem aos indivíduos que foram identificados morfologicamente como Serrana, e as azuis a Fronteira. Os indivíduos foram classificados de acordo com o valor médio de  $q_1$ .

As seqüências de haplótipos foram depositadas no banco de dados GenBank sob os números de acesso EU85459-EU854610. A genealogia foi construída para estimar a probabilidade posterior da distribuição das árvores. Em adição a filogenia, uma rede de haplótipos foi criada utilizando a abordagem de *median-joining* de Bandelt *et al.* (1999). Foram calculadas medidas de variabilidade padrão de DNA mitocondrial, como diversidade haplotípica ( $h$ ) e nucleotídica ( $\pi$ ),

para cada variedade. Para fazer inferências considerando os atuais níveis de diferenciação genética foram analisados 10 marcadores nucleares (6 *short strand repeats* e 4 *single nucleotide polymorphisms*; Tabela S2). Para identificar a presença de uma real diferença na estrutura genética populacional entre as duas variedades aplicou-se o método de agrupamento bayesiano.

Os resultados indicaram uma clara distinção genotípica entre os dois tipos de ovelha crioula no Sul do Brasil, tanto a partir

das frequências nucleares como os haplótipos mitocondriais. As medidas padrão de diversidade, como diversidade haplotípica e nucleotídica, riqueza alélica e heterozigosidade média observada indicaram um padrão maior de variabilidade para o tipo Serrana (Tabela S3).

O procedimento de cluster bayesiano detectou o maior valor de verossimilhança para o modelo de duas populações geneticamente distintas (Fig. 2).

A proporção de genótipos individuais ( $q$ ) pertencendo a cada um dos dois agrupamentos inferidos indica que todos os indivíduos de Fronteira e Serrana foram associados a sua população fonte com um valor de  $q > 0.75$  (Fronteira,  $q = 0.78$ ; Serrana,  $q = 0.86$ ). Cinco indivíduos (2 de Fronteira e 3 de Serrana) demonstraram valores intermediários de  $q$ , sugerindo uma mistura genética. No entanto, não houve evidência de hibridização com os dados de DNA mitocondrial.

A árvore bayesiana não-enraizada com base em 18 haplótipos de ND5 (Tabela S4) indicou a existência de uma estrutura geográfica; os haplótipos de Fronteira foram agrupados em um clado monofilético, enquanto Serrana apresentou dois grupos parafiléticos (Fig. 3A). Tal padrão, com aparência do tipo 'estrela', e sugestivo de um evento de expansão populacional recente. Para alcançar uma compreensão mais detalhada das relações genealógicas entre os haplótipos de DNA mitocondrial construiu uma rede de haplótipos (Fig. 3B). O padrão tipo 'estrela' pode ser observado na porção do cluster de Serrana, com um haplótipo comum em uma posição central, conectado a múltiplas seqüências raras por ramos curtos. Tal padrão não pode ser discernido no filogruppo

de Fronteira, indicando que o sinal para uma expansão populacional recente e menos claro em relação ao tipo Serrana. Nenhum haplótipo foi compartilhado entre as duas variedades, e os dois clados foram separados por apenas duas substituições nucleotídicas.

Os rebanhos estão sujeitos a uma variedade de forças evolutivas durante a sua história.

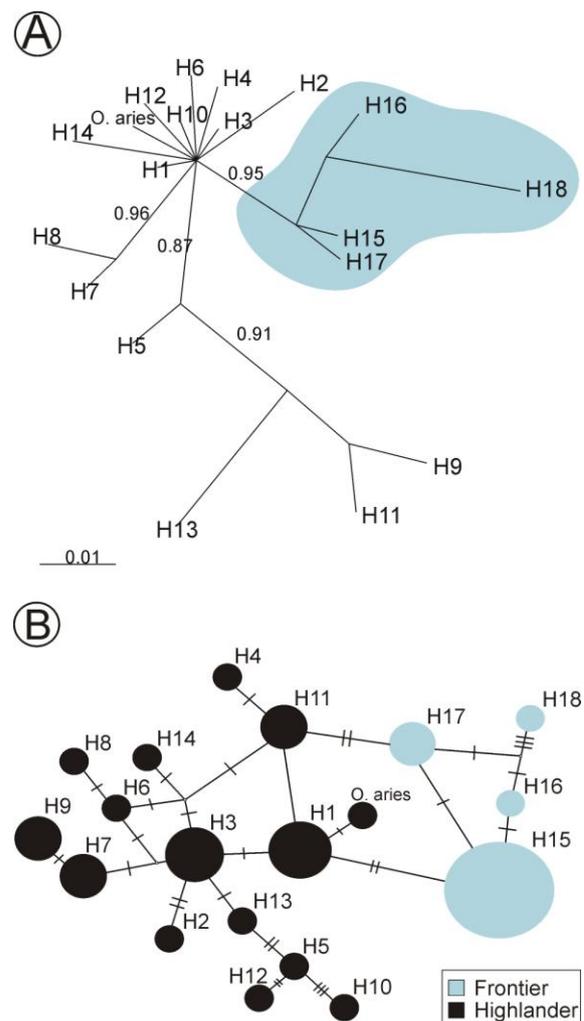


Figura 3. A) Árvore de consenso não-enraizada com base na análise Bayesiana de haplótipos ND5 de ovelhas crioulas. Os valores de suporte da probabilidade posterior estão indicados nos ramos. O sombreado azul representa o clado de Fronteira. B) rede de haplótipos MJ que descreve as relações entre as variedades de ovelhas. As substituições de nucleotídeos estão indicadas nos ramos por pequenas barras transversais.

fundadores, da deriva genética e seleção natural ou artificial conduz a formação de distintas raças ou variedades (Berthouly *et al.* 2008).

Em resumo, os resultados aqui apresentados demonstram significativa diferenciação genética entre as ovelhas crioulas Fronteira e Serrana, especialmente suportado pelos dados de polimorfismo ancestral (DNA mitocondrial). Tal fato pode ter resultado a partir do isolamento geográfico, associado com diferenças na forma que os rebanhos foram manejados, ou mais provavelmente a partir da introdução de diferentes estoques há séculos atrás. A topologia da rede de haplótipos sugere diferença em eventos demográficos históricos para ambos os tipos de ovelhas, como uma expansão populacional recente para Serrana, e um provável cenário mais complexo para a Fronteira, o que reforça a idéia de duas linhagens evolutivamente distintas.

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos a Magda Benavides e Clara M.S.L. Vaz (EMBRAPA) pelas amostras de DNA e sangue de Ovelha Crioula, e ao Kim Barão e Heinrich Hasenack (UFRGS) pela ajuda na elaboração da Figura 1. G.L.Gonçalves foi financiada pelo CNPq através de uma bolsa de pós-graduação. G.R.P. Moreira, T.R.O. Freitas, e T.A.Weimer receberam financiamento para pesquisa do CNPq.

### **Referencias bibliográficas**

Bandelt H.J., Forster P. & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48

Berthouly C., Bed'Hom B., Tixier-Boichard M., Chen C.F., Lee Y.P., Laloë D., Legros H.,

Verrier E. & Rognon X. (2008) Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. *Animal Genetics* 39,121-129.

Henkes L.E., Weimer T.A., Franco M.H.L.P. & Moraes J.C.F. (1993) Genetic characterization of the Crioula Lanada sheep from Southern Brazil. *Revista Brasileira de Genética* 16, 449-455.

Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky H.F (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.

Sambrook J. & Russell D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.

Tserenbataa T., Ramey R.R., Ryder O.A., Quinn T.W. & Reading R.P. (2004) A population genetic comparison of argali sheep (*Ovis ammon*) in Mongolia using the ND5 gene of mitochondrial DNA; implications for conservation. *Molecular Ecology* 13, 1333 -1339.

Vaz C.M.S.L. (2000) *Morfologia e aptidão da ovelha crioula lanada*. EMBRAPA Pecuária Sul, Bagé.

### **Informações suplementares**



Figura S1. Ovelha Crioula Fronteira (A, B) e Serrana (C, D). À esquerda estão os carneiros, e à direita, as ovelhas com cordeiros.

Tabela S1. Descrição dos locais de amostra de ovinos crioulos no Sul do Brasil.

Variedade	População			Município / Estado	Proprietario
	<i>Numero</i>	<i>Tamanho</i>	<i>Abreviatura</i>		
Fronteira	1	18	CRV	Santana do Livramento / RS	Wladimir Mothci
	2	11	CAV	Alegrete / RS	Joaquim Assis Brasil
	3	12	SPR	São Pedro do Sul / RS	Walter Sala
	4	28	FVL	Fortaleza dos Vales / RS	Dirceu Pombo
Serrana	5	20	ADR	André da Rocha / RS	Sinval Machado
	6	20	ESM	Esmeralda / RS	Maurício Souza da Luz
	7	23	BJA	Bom Jardim da Serra / SC	Cirne Lima
	8	7	BJB	Bom Jardim da Serra / SC	Cleber Segato
	9	25	PTA	Ponte Alta / SC	Antônio Camargo
	10	11	COP	Correia Pinto / SC	Edson Martins
	11	25	CNV	Campos Novos / SC	Osni Conick
	12	25	CTB	Curitibanos / SC	Zico Pellizzaro

Tabela S2. Marcadores nucleares marcadores utilizados neste estudo.

Tipo de marcador	Abreviatura	Referencia
SSR	<i>FSHB</i>	Crawford <i>et al.</i> 1995
	<i>MAF33</i>	Crawford <i>et al.</i> 1995
	<i>MAF209</i>	Crawford <i>et al.</i> 1995
	<i>OMHC1</i>	Crawford <i>et al.</i> 1995
	<i>TYRP1 intron 5</i>	Berryere <i>et al.</i> 2003
	<i>MCM140</i>	Hulme <i>et al.</i> 1995
SNP	<i>B2A</i>	Kuczek & Rogers 1999
	<i>M73K- MC1R</i>	Vage <i>et al.</i> 1999
	<i>D121N- MC1R</i>	Vage <i>et al.</i> 1999
	<i>Q171R - PRNP</i>	Yuzbasiyan-Gurkan <i>et al.</i> 1999

### Referencias bibliograficas

- Crawford A.M., Dodds K.G., Ede A.J., Pierson C.A., Montgomery G.W., Garmomway H.G., Beattie A.E., Davies K., Maddox J.F., Kappes S.W., Stone R. T. , Nguyen T. C., Penty J. M., Lord E. A., Broom J. E., Buitkamp J., Schwaiger W., Epplen J. T., Matthew P., Matthews M. E., Hulme D. J., Beh K. J., McGraw R. A. & Beattie C. W. . (1995) An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics* 140, 703-724.
- Berryere T.G., Schmutz S.M., Schimpf R.J., Cowan C.M. & Potter J. (2003) TYRP1 is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow? *Animal Genetics* 34, 169–175.
- Hulme D.J., Smith A.J., Silk J.P., Redwin J.M. & Beh K.J. (1995) Polymorphic sheep microsatellites at the McM2, McM131, McM135, McM136, McM140, McM200, McM214, McM373, McM505, McM507 and McM512 loci. *Animal Genetics* 26, 369-370.
- Kuczek E. & Rogers G.E. (1999) Sheep keratins: characterization of cDNA clones for the glycine + tyrosine-rich wool proteins using a synthetic probe. *European Journal of Biochemistry* 146, 89-93.
- Vage D.I., Klungland H., Lu D. & Cone R.D. (1999) Molecular and pharmacological characterization of dominant black coat color in sheep. *Mammalian Genome* 10, 39–43.
- Yuzbasiyan-Gurkan V., Krehbiek J.D., Cao Y. & Venta P.J. (1999) Development and usefulness of new polymerase chain reaction-based tests for detection of different alleles at codons 136 and 171 of the ovine prion protein gene. *American Journal of Veterinary Research* 60, 884-887.

Tabela S3. A diversidade genética de ovinos crioulos no Brasil com base em locos nucleares e dados de mtDNA. Para locus nuclear: n, tamanho da amostra; A, número médio de alelos por loco; H, valor médio de diversidade alélica (sobre todos os locos), P%, porcentagem de locos polimórficos, H<sub>o</sub>, heterozigosidade média observada; H<sub>E</sub>, heterozigosidade média esperada. Para mtDNA; s, número de sítios polimórficos, n, o número de seqüências, nh, o número de haplótipos, hD, diversidade haplotípica e  $\pi$ , diversidade de nucleotídeos. Os testes de neutralidade D de Tajima e F<sub>s</sub> de Fu também são mostrados.

Fenotipo	Locus nuclear						mtDNA						
	n	A	H	% P	H <sub>o</sub>	H <sub>E</sub>	n	s	nh	Hd	$\pi$	D	F <sub>s</sub>
Fronteira	69	4.8	1.38	70	0.59	0.69	17	5	4	0.0020 ± 0.0016	0.002	-1.50*	-1.39
Serrana	156	5.4	1.61	75	0.50	0.62	23	16	14	0.0094 ± 0.0054	0.008	0.02	-6.22*

\*  $P < 0.05$

Tabela S4. Sítios polimórficos (excluindo os ambíguos) no gene mitocondrial ND5 da ovelha crioula do Brasil (n = 40). Os nucleotídeos são numerados de 1 a 524, utilizando *Ovis aries* referência. As frequências de haplótipos também são mostradas para as duas variedades de ovinos.

Haplótipos (N° Genbank)	2 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 4 4 4 4 4 4																		Frequência haplótipo				
	2	3	1	5	0	3	3	4	5	6	6	7	7	0	1	1	1	2	2	Fronteira	Serrana		
<i>O. aries</i> (NP008416)	C	A	T	Y	T	T	C	T	C	G	C	G	C	A	A	T	G	A	T	C	A		
1 (EU854593)	T	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	4
2 (EU854594)	T	.	A	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	0	1
3 (EU854595)	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	4
4 (EU854596)	T	.	.	T	.	.	.	T	.	.	G	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	0	1
5 (EU854597)	T	.	C	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1
6 (EU854598)	T	G	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	0	1
7 (EU854599)	T	G	.	T	.	C	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	2
8 (EU854600)	T	G	.	T	.	C	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	2
9 (EU854601)	.	.	C	C	C	C	A	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	0	1
10 (EU854602)	T	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	0	2
11 (EU854603)	T	.	C	C	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	0	1
12 (EU854604)	T	.	.	T	C	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0	1
13 (EU854605)	T	.	C	C	C	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	A	A	.	.	.	.	0	1
14 (EU854606)	T	.	.	T	.	.	.	T	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	0	1
15 (EU854607)	T	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	13	0
16 (EU854608)	T	.	.	T	.	.	G	T	C	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	1	0
17 (EU854609)	T	.	.	T	.	.	.	T	C	.	.	.	.	.	T	.	C	.	.	.	.	2	0
18 (EU854610)	T	.	.	T	.	.	G	T	C	.	T	.	G	.	C	.	T	.	C	.	.	1	0