

TERESA MARIA MONTENEGRO DE ARAÚJO ALMENDRA CORREIA

**ESTUDO DA VARIABILIDADE E RELAÇÕES  
GENÉTICAS EM RAÇAS CAPRINAS AUTÓCTONES  
MEDIANTE MICROSSATÉLITES**



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2004

Este trabalho foi realizado no âmbito do  
PRODEP II, Acção 5.2 – Formação Avançada  
no Ensino Superior, concurso de 1/96

Este trabalho foi expressamente elaborado como dissertação original para o efeito de obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal de acordo de acordo com o disposto no Decreto-Lei 216/92 de 13 de Outubro.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao terminarmos este trabalho, gostaríamos de exprimir o nosso profundo agradecimento a todos os que, de algum modo, contribuíram para a sua realização:

À PRESIDÊNCIA do IPB e ÓRGÃOS DIRECTIVOS da Escola Superior Agrária de Bragança (ESAB), pela oportunidade à candidatura do programa PRODEP.

À Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), na pessoa do seu Magnífico Reitor, Prof. Doutor ARMANDO MASCARANHAS FERREIRA, queremos expressar o nosso reconhecimento pelas condições disponibilizadas para a realização deste trabalho.

À Prof.<sup>ra</sup> Doutora MARIA TERESA RANGEL FIGUEIREDO, da UTAD, nossa orientadora, pela disponibilidade, conselhos, ensinamentos e incentivos, para além da exaustiva revisão crítica do manuscrito.

Ao Prof. Doutor ALFREDO JORGE COSTA TEIXEIRA, Vice Presidente do IPB, por ter aceite ser nosso Co-orientador, pela simpatia e pela forma como sempre nos facilitou os meios ao seu alcance.

Ao Prof. Doutor JUAN JOSE ARRANZ SANTOS, da Universidade de Leon, pela forma como me acolheu, incentivou e apoiou nos momentos mais difíceis. Não esquecendo todos os seus ensinamentos na área da genética e no tratamento estatístico dos dados, para além das facilidades na utilização de todo o equipamento laboratorial e por último, não menos importante, pela amizade sempre demonstrada ao longo de todo o trabalho.

Aos Prof. Doutores FERMIN SAN PRIMITIVO TIRADOS e YOLANDA BAYÓN GONZÁLEZ, da Universidade de León, pelo estímulo, confiança e oportunas opiniões emitidas aquando da revisão deste trabalho.

Ao Prof. Doutor JORGE MANUEL TEIXEIRA DE AZEVEDO, pelo incentivo e disponibilidade.

Ao Prof. Doutor JOSÉ MATOS, pela forma simpática como sempre manifestou as suas opiniões e sugestões críticas, ao longo de todo o período de amostragem e revisão deste manuscrito.

À Doutora FERNANDA SIMÕES, pelo carinho com que nos recebeu na fase de amostragem, uma das mais difíceis deste estudo, para além de todos os ensinamentos teóricos e laboratoriais transmitidos.

Ao Eng. RAMIRO CORUJEIRA VALENTIM, pelo apoio e incentivo ao longo de todo este percurso, pela forma dura como sempre opina, mas com empenho e vontade de ajudar, para além da amizade de longa data.

Ao Prof. Doutor ALEXANDRE NUNO BRITO pelo incentivo e ajuda mútua que se estabeleceu em Leon.

À Dra CLARISSE DO CÉU PAIS, pela ajuda na obtenção de bibliografia e suas referências.

Às ASSOCIAÇÕES DE CRIADORES DE CAPRINOS, pela sua preciosa ajuda na fase de amostragem.

Ao Eng. ALÍPIO COELHO e D. MARIA DO CÉU MATOS, pelas diferentes formas de ajuda, nas horas mais árduas de trabalho.

Aos SERVIÇOS DE IMAGEM, pela composição da capa e toda a disponibilidade demonstrada para resolver os problemas de impressão de última hora.

Ao pessoal da REPROGRAFIA, pela eficiência na impressão e encadernação.

À minha MÃE, peça fundamental e sempre presente...

À memória do meu PAI, que me transmitiu toda a força para terminar este trabalho.

Ao meu MARIDO, pela infinita paciência, incentivo e carinho demonstrados em todos os momentos... pela dura tarefa de algumas vezes ser Pai... sozinho.

Às minhas filhas FRANCISCA e MAFALDA, verdadeiras heroínas, pela compreensão demonstrada nas alturas que as privei da minha companhia.

## RESUMO

Num cenário de declínio de diversidade genética a nível mundial, estamos cientes da necessidade de preservar as raças autóctones portuguesas.

Com este estudo pretendemos fazer face à ausência de caracterização da estrutura e das possíveis relações genéticas entre as diferentes raças autóctones caprinas portuguesas. Assim, na revisão bibliográfica procurou-se dar ênfase às possíveis causas e aos efeitos da erosão genética que se vem operando ao longo dos tempos. Por outro lado, deu-se importância ao género *Capra*, particularizando aspectos relativos às raças autóctones caprinas portuguesas, tais como: caracterização morfológica, distribuição geográfica de origem e principais aptidões. Os dois últimos capítulos foram dedicados às diferentes metodologias laboratoriais e estatísticas disponíveis e necessárias para levar a cabo o trabalho experimental.

Foram recolhidas amostras de sangue de cinco raças autóctones portuguesas (Bravia, Serrana, Charnequeira, Serpentina e Algarvia) e respectivos ecótipos, para além de duas raças exóticas (Saanen e Alpina) que serviram como termo de comparação. A extracção de DNA foi realizada pelo método de MILLER *et al.* (1988). Após a escolha de 23 microssatélites, a sua amplificação foi realizada através da técnica de *Polimerase Chain Reaction* (PCR), utilizando um termociclador. A identificação dos alelos dos marcadores microssatélites realizou-se mediante electroforese vertical em gel de poliacrilamida, em condições desnaturantes. Os marcadores foram analisados num sequenciador automatizado *ALF Express R DNA Sequencer*, utilizando-se para posterior análise genotípica o programa *Allele Links*. As frequências génicas foram calculadas através de contagem directa, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi estimado usando o programa GENETIX 4.02 (BELKHIR, 2000) e os desvios comparados segundo o *Exact Test* (GUO e THOMPSON, 1992), utilizando o programa *GENEPOP 1.2* (RAYMOND e ROUSSET, 1995). A heterozigotia foi calculada segundo NEI (1987). A análise de componentes principais foi realizada recorrendo-se ao programa *STATISTICA* para Windows 5.1. Por fim, as distâncias genéticas e os dendrogramas foram obtidos usando o programa *NJBAFD* (TAKEZAKI, 1997).

Neste estudo foi possível estabelecer um conjunto de microssatélites que podem ser amplificados em *multiplex* e que se revelaram apropriados à realização de estudos populacionais, podendo no futuro serem utilizados em várias vertentes da conservação de raças caprinas.

A variabilidade encontrada entre as raças autóctones caprinas portuguesas foi semelhante e, em alguns casos, superior mesmo à encontrada entre raças autóctones de outros países. A análise de componentes principais, assim como as distâncias utilizadas, revelaram um afastamento das raças Bravia e Algarvia relativamente ao conjunto formado pela Serpentina, pela Charnequeira e pela Serrana. Por outro lado, observou-se um afastamento nítido entre as raças Bravia e Algarvia. A análise dos dendrogramas revelou algumas diferenças relativamente à metodologia multivariante, nomeadamente uma imprecisão no posicionamento das raças Bravia e Serrana e uma proximidade entre as raças Bravia e Charnequeira. Neste tipo de análise, os ecótipos da raça Serrana mostraram-se mais próximos. Por fim, verificou-se uma proximidade entre as raças Algarvia e Serpentina.

Embora se verifique a necessidade de utilizar modelos matemáticos que se ajustem melhor ao comportamento dos microssatélites, estes marcadores moleculares revelaram ser, até ao momento actual, os mais apropriados a estudos de variabilidade genética e de relações populacionais.

## RESUMEN

En el presente estudio se ha realizado un análisis de las relaciones genéticas entre razas autóctonas de ganado caprino portugués utilizando marcadores de tipo microsatélite. En la Revisión bibliográfica se hace especial hincapié en las posibles causas y los efectos de la erosión genética que viene actuando en los últimos años. Por otro lado, se realizó una revisión sobre el origen de los diferentes grupos del género *Capra*, particularizando en los aspectos relativos a las razas autóctonas caprinas portuguesas, tales como la caracterización morfológica, la distribución geográfica, el origen y sus principales aptitudes. Los dos últimos capítulos se dedicaron a las distintas metodologías laboratoriales y estadísticas disponibles y necesarias para llevar a cabo el trabajo experimental.

Para la realización de esta Tesis, se recogieron muestras de sangre de cinco razas autóctonas portuguesas (Bravia, Serrana, Charnequeira, Serpentina y Algarvía) con sus respectivos ecotipos, además de dos razas foráneas (Saanen y Alpina) que se utilizaron como poblaciones de referencia. La extracción del DNA se llevó a cabo por el método de MILLER *et al.* (1998). Se analizaron 23 marcadores de tipo microsatélite mediante amplificación por la técnica de Reacción en cadena mediante la polimerasa (*PCR*) utilizando un termociclador. La identificación de los alelos de los marcadores microsatélites se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes utilizando para ello un secuenciador automático y el programa del análisis *Allele Links*. Se utilizó el programa GENETIX 4.02 (BELKHIR, 2000) para el cálculo de las frecuencias génicas y la heterocigosis. La adecuación de las poblaciones al equilibrio Hardy-Weinberg se estimó utilizando el test exacto propuesto por GUO y THOMPSON (1992) mediante el programa *GENEPOP 1.2* (RAYMOND y ROUSSET, 1995). Las distancias genéticas y los dendrogramas se obtuvieron con el programa *NJBAFD* (TAKEZAKI, 1997) y el análisis de componentes principales y la clasificación poblacional con el paquete estadístico *STATISTICA* para Windows 5.1

En la presente memoria se obtuvo un conjunto de microsatélites que pueden ser amplificados de forma conjunta (*multiplex*) y que se muestran como muy útiles para la realización de estudios poblacionales, pudiendo en un futuro utilizarlos en diferentes aspectos de la conservación de las razas caprinas.

La variabilidad encontrada en las razas caprinas autóctonas portuguesas fue similar, e incluso superior, a la que presentan las poblaciones de cabras de otros países. El análisis de componentes principales puso de manifiesto una separación de las razas Bravía y Algarvía

con respecto al bloque formado por Serpentina, Charnequeira y Serrana. Por otro lado, se observó una separación muy clara entre las poblaciones de Bravía y Algarvía. El análisis de los dendrogramas obtenidos a partir de las distancias genéticas estimadas puso de manifiesto un posicionamiento poco definido de las razas Serrana y Bravía, una relativa proximidad entre las razas Algarvía y Serpentina así como una clara proximidad de las razas Bravía y Charnequeira. En este tipo de análisis los ecotipos de la raza Serrana se mostraron muy próximos entre sí.

Aunque se deben desarrollar modelos matemáticos que se ajusten mejor a los comportamientos mutacionales de los microsatélites, estos marcadores moleculares son, hasta el momento actual los más apropiados para los estudios de variabilidad genética y de relaciones poblacionales.

## ABSTRACT

While biodiversity is decreasing worldwide we are aware of the need to preserve Portuguese autochthonous breeds.

This study aims to face the lack of structural characterization and possible genetics relationships between the different Portuguese autochthonous goat breeds. The bibliographic review focused on possible causes and effects of the genetic erosion taking place throughout time. An especially emphasis was paid to genre *Capra*, particularly to Portuguese autochthonous breeds features as morphological characterization, geographic area of origin and production performances. Lab and statistical methodologies necessities to experimental work were reviewed on the last two chapters.

Blood samples were collected from five Portuguese autochthonous breeds – Bravia, Serrana, Charnequeira, Serpentina and Algarvia – and respective ecotypes and two exotic breeds – Saanen and Alpina – for comparative purposes. DNA extraction was performed according to MILLER *et al.* (1988) protocol. After selecting 23 microsatellites they were amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique using a thermocyclator. Microsatellites markers alleles were identified by polyacrilamide gel vertical electrophoresis under denatured conditions. Markers were assayed on an automatic sequencer and genotype analysis performed using the ALLELE LINKS program. Genomic frequencies were calculated by direct count, Hardy-Weinberg equilibrium (EHW) estimated using the GENETIX 4.02 program (BELKHIR, 2000) and deviations analysis accomplished using the Exact Test (GUO and THOMPSON, 1992) of the GENOPOP 1.2 program (RAYMOND and ROUSSET, 1995). Heterozigosity was calculated according to NEI (1987). Main components analysis was performed using the STATISTICA program for Windows 5.1. At last genetic distances and dendrograms were achieved using the NJBAFD program (TAKEZAKI, 1997).

A conjugation of microsattelites that could be amplified as multiplex was established on this study. It seemed appropriated to study population and it may be used on different aspects of goat breeds conservation in the future.

Portuguese autochthonous goat breeds variability was identical or even higher than those found among other breeds in other countries. Main components analysis as genetic distances used showed a detachment between Bravia and Algarvia breeds and Serpentina, Charnequeira and Serrana set of breeds. A clear detachment between Bravia and Algarvia breeds was also found. Dendrogram analysis showed some diferences toward

multivariate methodology, resulting in an imprecise positioning of Bravia and Serrana breeds and in Bravia and Charnequeira breeds' vicinity. Serrana ecotypes seemed closer under this analysis. Finally proximity between Algarvia and Serpentina breeds was identified.

Although it is necessary to use mathematic models more adjusted to microsatellites conduct, these molecular markers are presently the most appropriated to study genetic variability and population relationships.

## ÍNDICE GERAL

RESUMO	vii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	xi
ÍNDICE DE QUADROS	xxi
ÍNDICE DE FIGURAS	xxv
GLOSSÁRIO	xxvi
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS	5
2.1 – DOMESTICAÇÃO	5
2.2 – PRESERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS EM ANIMAIS DOMESTICADOS	9
2.3 – PERDA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ANIMAIS DOMESTICADOS	11
2.4 – ATITUDES, MEDIDAS E PROGRAMAS PARA A CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS DOS ANIMAIS DOMESTICADOS	13
2.5 – MÉTODOS PARA CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS	17
2.5.1 – ANIMAIS VIVOS ( <i>IN SITU</i> )	17
2.5.2 – CRIOPRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE GERMOPLASMA ( <i>EX SITU</i> )	18
2.5.3 – ARMAZENAMENTO DE DNA ( <i>EX SITU</i> )	18
2.5.4 – NOTA FINAL	19
3 – ORIGEM E SITUAÇÃO NA ESCALA ZOOLOGICA DO GÉNERO <i>CAPRA</i>	21

3.1 – ORIGEM FILOGENÉTICA DAS CABRAS DOMESTICADAS	22
3.2 – DISTRIBUIÇÃO E ESTADO ACTUAL DA CABRA SELVAGEM ( <i>Capra aegagrus</i> )	26
3.3 - SITUAÇÃO NA ESCALA ZOOLOGICA DA CABRA DOMESTICADA	28
3.4 - DESCRIÇÃO E ORIGEM DAS RAÇAS AUTÓCTONES E EXÓTICAS ESTUDADAS	29
3.4.1 - RAÇAS AUTÓCTONES E EXÓTICAS CAPRINAS	31
3.4.1.1 – BRAVIA	31
3.4.1.2 – SERRANA	32
3.4.1.3 – CHARNEQUEIRA	34
3.4.1.4 – SERPENTINA	35
3.4.1.5 – ALGARVIA	36
3.4.2 - RAÇAS EXÓTICAS	37
3.4.2.1 – SAANEN	37
3.4.2.2 – ALPINA	38
3.5 - BREVE REFERÊNCIA À EVOLUÇÃO DA CAPRINICULTURA PORTUGUESA	38
4 – MARCADORES	43
4.1 – MARCADORES MORFOLÓGICOS	44
4.2 – MARCADORES BIOQUÍMICOS	44
4.3 – POLIMORFISMOS DE DNA	45
4.3.1 – POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLPs)	45
4.3.2 – POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE CADEIA SIMPLES (SSCP)	46
4.3.3 – POLIMORFISMOS DE DNA APLICADOS AO ACASO (RAPDs)	46

4.4 – SEQUÊNCIAS DE DNA REPETIDAS EM TANDEM	47
4.4.1 – SATELITES	48
4.4.2 – MINISSATELITES	48
4.4.3 – MICROSSATELITES	48
4.4.3.1 – DETECÇÃO DE MICROSSATÉLITES APÓS AMPLIFICAÇÃO POR PCR	50
4.4.3.1.1 – RADIOACTIVOS	50
4.4.3.1.2 – NÃO RADIOACTIVOS	50
4.4.3.2 – IMPORTÂNCIA DO DNA MICROSSATÉLITE	52
4.4.3.3 – APLICAÇÕES DOS MICROSSATÉLITES	52
4.4.4 – AFLP ( <i>AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS</i> )	55
4.4.5 – SNP ( <i>SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS</i> )	56
4.4.6 – ESTS ( <i>EXPRESSED SEQUENCE TAGGED SITES</i> )	56
4.5 – MAPA DE LIGAMENTO CAPRINO	56
<b>5 – MÉTODOS ESTATÍSTICO</b>	<b>59</b>
5.1 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	59
5.1.2 - PROPORÇÃO DE <i>LOCI</i> POLIMÓRFICOS	59
5.2 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	60
5.3 – HETEROZIGOTIA	63
5.4 - CONTEÚDO DE INFORMAÇÃO DO POLIMORFISMO (PIC) E NÚMERO EFICAZ DE ALELOS ( $N_e$ )	64
5.5 - MEDIDAS DE VARIABILIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL	65
5.5.1 - DIFERENÇA DE MÉDIAS ( $C_Z$ )	66
5.5.2 - COEFICIENTE DE SIMILITUDE RACIAL (CRL) DE PEARSON	66
5.5.3 - DISTÂNCIA DE ROGERS	66
5.5.4 - DISTÂNCIA $D^2$	67
5.5.5 – DISTÂNCIA STANDARD DE NEI ( $D_s$ )	67

5.5.6 – DISTÂNCIA ANGULAR MODIFICADA DE CAVALLI-SFORZA E EDWARDS (1967) OU DISTÂNCIA DE NEI <i>et al.</i> (1983) ( $D_A$ )	67
5.5.7 – DISTÂNCIA ANGULAR DE CAVALLI-SFORZA (1967)	67
5.6 - MEDIDAS DE DISTÂNCIAS UTILIZADAS PARA ESTUDOS EVOLUTIVOS	69
5.6.1 - COEFICIENTE $F_{ST}$	69
5.6.2 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS QUE TÊM POR BASE O NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES DE GENES (NEI, 1972)	70
5.6.3 - DISTÂNCIA GENÉTICA MÍNIMA ( $D_m$ )	71
5.6.4 - DISTÂNCIA GENÉTICA MÁXIMA ( $D'$ )	71
5.7 - ANÁLISE FILOGENÉTICA	73
5.7.1 - MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS	74
5.7.2 - MÉTODO DA MÍNIMA EVOLUÇÃO	74
5.7.3 - ANÁLISE FOUR-CLUSTER	75
5.7.4 - MÉTODO DA VIZINHANÇA PRÓXIMA (NJ)	76
5.7.5 - MÉTODO DAS DISTÂNCIAS MÉDIAS	77
5.7.6 - MÉTODO DE FICH E MARGOLIASH	77
5.7.7 - MÁXIMA VEROSIMILHANÇA	78
5.7.8 - MÁXIMA PARSIMÓNIA	79
5.8 - ANÁLISE MULTIVARIADA	79
5.8.1 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	79
PARTE II - TRABALHO EXPERIMENTAL	83
1 - MATERIAL E MÉTODOS	83
1.1 – ANIMAIS	83
1.2 - METODOLOGIA LABORATORIAL	87
1.2.1 - RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	87

1.2.2 - EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO	88
1.2.3 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA	88
1.2.4 - SELECÇÃO DOS MICROSSATÉLITES E SUA AMPLIFICAÇÃO MEDIANTE PCR	88
1.2.5 - <i>MULTIPLEX</i> ESCOLHIDOS	89
1.2.6 - SEPARAÇÃO ELECTROFORÉTICA EM GEL DE ACRILAMIDA	92
1.2.6.1 - ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	92
1.2.6.2 - ELABORAÇÃO DOS GÉIS	93
1.2.6.3 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA CARREGAR O GEL	93
1.2.6.4 - ELECTROFORESE	94
1.2.7 - IDENTIFICAÇÃO E DENOMINAÇÃO DAS VARIANTES ALÉICAS DOS MICROSATÉLITES	94
1.2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	95
1.2.8.1 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E GÉNICAS	95
1.2.8.2 - ANÁLISE DO EQUILÍBRIO HARDY-WEINBERG	95
1.2.8.3 - HETEROZIGOTIA	95
1.2.8.4 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	96
1.2.8.5 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS E DENDOGRAMAS	96
2 - RESULTADOS	97
2.1 - ANÁLISE DOS DIFERENTES MARCADORES	97
2.1.1 - MULTIPLEX IMCI (INRA006, MCM527, CSSM066 E ILST011)	97
2.1.1.1 - INRA006	97
2.1.1.2 - ILSTS011	98
2.1.2 - MULTIPLEX MRB (MCM53, RM006 E BM6526)	99
2.1.2.1 - McM53	99
2.1.2.2 - RM006	100

2.1.2.3 - BM6526	101
2.1.3 - MULTIPLEX BCIB (BM8125, CSSM031, ILSTS005 E BM1818)	102
2.1.3.1 - BM8125	102
2.1.3.2 - CSSM031	103
2.1.3.3 - ILTS005	104
2.1.3.4 - BM1818	104
2.1.4 - MULTIPLEX MMB (MCM214, MAF65 E BM757)	105
2.1.4.1 - MAF65	106
2.1.4.2 - BM757	106
2.1.5 - MULTIPLEX SR12, 9, 5 (SRCRSP12, SRCRSP9 E SRCRSP5)	107
2.1.5.1 - SRCRSP12	108
2.1.5.2 - SRCRSP9	108
2.1.5.3 - SRCRSP5	109
2.1.6 - MULTIPLEX (SRCRSP15, SRCRSP14 E SRCRSP8)	110
2.1.6.1 - SRCRSP15	110
2.1.6.2 - SRCRSP14	111
2.1.6.3 - SRCRSP8	111
2.1.7 - MULTIPLEX TI (TGLA40 E ILSTS030)	112
2.1.7.1 - TGLA40	113
2.1.7.2 - ILSTS030	113
2.1.8 - MULTIPLEX MI (MAF64 E ILSTS034)	114
2.1.8.1 - MAF64	114
2.1.8.2 - ILSTS034	115
2.1.9 - MULTIPLEX HA (HEL10 E ANPRC)	116
2.1.9.1 - HEL10	116

2.1.9.2 – ANPRC	117
2.2 - ERRO PADRÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA	118
2.3 – ECÓTIPOS	119
2.3.1 - INRA006	119
2.3.2 - ILSTS011	119
2.3.3 - McM53	120
2.3.4 - RM006	120
2.3.5 - BM6526	121
2.3.6 - BM8125	121
2.3.7 - CSSM031	121
2.3.8 - BM1818	121
2.3.9 - ILSTS005	122
2.3.10 - MAF65	122
2.3.11 - BM757	122
2.3.12 - SRCRSP12	123
2.3.13 - SRCRSP9	123
2.3.14 - SRCRSP5	123
2.3.15 - SRCRSP15	123
2.3.16 - SRCRSP14	124
2.3.17 - SRCRSP8	124
2.3.18 - TGLA40	124
2.3.19 - ILSTS030	125
2.3.20 - MAF64	125
2.3.21 - ILSTS034	125
2.3.22 - HEL10	126
2.3.23 – ANPRC	126

2.4 - VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL E RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES DE CAPRINOS	126
2.4.1 - HETEROZIGOTIA MÉDIA OBSERVADA E ESPERADA	126
2.5 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	128
2.6 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS	141
2.7 – DENDROGRAMAS	143
3 – DISCUSSÃO	149
3.1 - AMPLIFICAÇÃO DOS DIFERENTES MICROSSATÉLITES	150
3.2 - ELECTROFORESE E IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS	150
3.3 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE POPULACIONAL	151
3.3.1 - TAMANHO DA AMOSTRA	153
3.3.2 - ALELOS EXCLUSIVOS NAS DIFERENTES RAÇAS ESTUDADAS	153
3.3.3 - NÚMERO EFICAZ DE ALELOS	154
3.3.4 – ECÓTIPOS	155
3.3.5 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	156
3.3.6 – HETEROZIGOTIA	157
3.4 - VARIABILIDADE INTERPOPULACIONAL	159
3.4.1 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS E DENDROGRAMAS	163
4 – CONCLUSÕES	171
PARTE III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	175
ANEXO I	
ANEXO II	

## ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO I – Datas e locais conhecidos relativamente à domesticação de várias espécies animais	5
QUADRO II – Número de diferentes raças europeias incluídas nos diversos censos organizados pela EAAP, entre 1982 e 1999	14
QUADRO III – Tamanho das populações indicativo da possibilidade de perigo de extinção, nalgumas espécies domesticadas	15
QUADRO IV – Géneros da subfamília <i>Caprinae</i>	21
QUADRO V – Origem de algumas raças portuguesas	28
QUADRO VI – Efectivos caprinos (número de fêmeas) em 1990 e 2000e sua distribuição geográfica em Portugal (unidade: 1000 cabeças)	38
QUADRO VII – Principais características das raças autóctones portuguesas caprinas (número de fêmeas inscritas no Registo Zootécnico (RZ) ou Livro Genealógico (LG), número de criadores, dimensão média dos efectivos e distribuição geográfica	39
QUADRO VIII - Locais de amostragens dos caprinos das diferentes raças e ecótipos autóctones estudados	82
QUADRO VIII - Locais de amostragens dos caprinos das diferentes raças e ecótipos autóctones estudados (continuação 1)	83
QUADRO VIII - Locais de amostragens dos caprinos das diferentes raças e ecótipos autóctones estudados (continuação 2)	84
QUADRO IX - Série de nove <i>multiplex</i> utilizados neste trabalho	86
QUADRO IX - Série de nove <i>multiplex</i> utilizados neste trabalho (continuação 1)	87
QUADRO IX - Série de nove <i>multiplex</i> utilizados neste trabalho (continuação 2)	88
QUADRO X – Parâmetros de variabilidade genética entre <i>loci</i> , para as diferentes raças estudadas	124
QUADRO XI - Número médio de alelos/ <i>locus</i> e heterozigotia média	

(observada e esperada) nos diferentes ecótipos estudados	124
QUADRO XII – Análise de componentes principais para os <i>loci</i> microsatélites: variância explicada e proporção de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais (CP) (raças autóctones portuguesas e exóticas)	126
QUADRO XIII – Análise de componentes principais (CP) para os <i>loci</i> microsatélites de cinco raças autóctones e duas exóticas. Valores entre 0,700 e 1,000 dos coeficientes de correlação, entre os alelos e as primeiras componentes principais	127
QUADRO XIV – Análise de componentes principais para os <i>loci</i> microsatélites: variância explicada e proporção de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais (CP) (raças autóctones portuguesas)	129
QUADRO XV - Análise de componentes principais para os <i>loci</i> microsatélites de cinco raças autóctones. Valores mais elevados dos coeficientes de correlação, entre os alelos e as primeiras componentes principais	130
QUADRO XVI – Análise de componentes principais para os <i>loci</i> microsatélites: variância explicada e proporção de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais (CP) (raças e ecótipos autóctones portugueses e raças exóticas)	132
QUADRO XVII - Análise de componentes principais para os <i>loci</i> microsatélites de cinco raças autóctones com respectivos ecótipos e duas raças exóticas. Valores mais elevados dos coeficientes de correlação entre os alelos e as primeiras componentes principais	133
QUADRO XVIII – Análise de componentes principais para os <i>loci</i> microsatélites: variância explicada, proporção de variância explicada e acumulada para as três componentes principais (CP) (raças e ecótipos autóctones portugueses)	135
QUADRO XIX – Análise de componentes principais para os <i>loci</i>	

microssatélites das cinco raças autóctones e respectivos ecótipos e valores mais elevados dos coeficientes de correlação entre os alelos e as três primeiras componentes principais 136

QUADRO XX – Distâncias genéticas obtidas a partir de microssatélites, nas diferentes raças. Sobre a linha diagonal estão representados os valores relativos à distância  $D_S$ , de NEI (1972), e sob a mesma linha os relativos à distância  $D_A$ , de NEI *et al.* (1983) 138

QUADRO XXI – Distâncias genéticas obtidas a partir de microssatélites, nas diferentes populações estudadas. Sobre a linha diagonal estão representados os valores relativos à distância  $D_S$ , de NEI (1972), e sob a mesma linha os relativos à distância  $D_A$ , de NEI *et al.* (1983) 139



## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição geográfica das espécies do género <i>Capra</i>	22
FIGURA 2 – Distribuição geográfica da amostragem e das linhas maternas de mtDNA	26
FIGURA 3 - Áreas geográficas das raças e ecótipos caprinos amostrados	81
FIGURA 4 – Diferentes ciclos de temperatura aplicados durante a hibridação	88
FIGURA 5 – Electroferograma correspondente ao multiplex IMCI (INRA006, McM527, CSSM66 e ILSTS011)	94
FIGURA 6 – Electroferograma correspondente ao multiplex MRB (McM53, RM006 e BM6526)	96
FIGURA 7 – Electroferograma correspondente ao multiplex BCIB (BM8125, CSSM031, ILTS005 e BM1818)	99
FIGURA 8 – Electroferograma correspondente ao <i>multiplex</i> MMB (McM214, MAF65 e BM757)	102
FIGURA 9 - Electroferograma correspondente ao <i>multiplex</i> SR12, 9, 5 (SRCRSP12, SRCRSP9 e SRCRSP5)	104
FIGURA 10 – Electroferograma correspondente ao multiplex SR15, 14, 8 (SRCRSP15, SRCRSP14 e SRCRSP8) e ampliação do marcador SRCRSP14	107
FIGURA 11 – Electroferograma correspondente ao <i>multiplex</i> TI (TGLA40 e ILSTS030)	109
FIGURA 12 – Electroferograma correspondente ao multiplex MI (MAF64 e ILSTS034)	111
FIGURA 13 – Electroferograma correspondente ao <i>multiplex</i> HA (HEL10 e ANPRC)	113
FIGURA 14 - Erro padrão cometido para cada frequência, no caso do tamanho da amostra ser de 100, 50, 25 ou 15 animais	116

FIGURA 15 – Representação gráfica das diferentes raças autóctones e exóticas estudadas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais	128
FIGURA 16 – Representação gráfica das diferentes raças autóctones portuguesas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais	131
FIGURA 17 – Representação gráfica das diferentes raças e ecótipos autóctones e raças exóticas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais	134
FIGURA 18 – Representação gráfica das diferentes raças e ecótipos autóctones, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais	137
FIGURA 19 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância $D_A$ e utilizando o método NJ, em cinco raças autóctones portuguesas e duas exóticas	140
FIGURA 20 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância $D_S$ e utilizando o método NJ, em cinco raças autóctones portuguesas e duas exóticas	141
FIGURA 21 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância $D_A$ e utilizando o método NJ, em 8 populações autóctones e duas exóticas	142
FIGURA 22 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância $D_S$ e utilizando o método NJ, em 8 populações autóctones e duas exóticas	143

## GLOSSÁRIO

A – Adenina

C – Citosina

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphisms*

AGDB – *Animal Genetic Data Bank*

AnGR – *Animal Genetic Resources*

BTA – Cromossoma Bovino

C – Citosina

Char. A – Charnequeira, Ecótipo Alentejano

Char. B – Charnequeira, Ecótipo Beiroa

CHI – Cromossoma Caprino

cM – centiMorgan

CP – Componentes Principais

CRL – Coeficiente de Similitude Racial

CY5 – *Dye Amidite 667*

DAD-IS – *Domestic Animal Diversity Information System*

dCTP – *2’Deoxyeytidine 5’Thriphosphate*

dDGP – *2’Deoxyguanosine 5’Triphosphate*

dNTP – *2’Deoxynucleoside 5’Triphosphate*

DHW – Desequilíbrio de Hardy-Weinberg

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DNAmT – Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial

dNTP – *2’ Deoxynucleoside 5’Triphosphate*

dTTP – *2’Deoxythymidine 5’Triphosphate*

DOP – Denominação de Origem Protegida

EAAP – *European Association of Animal Production*

EDTA – *Ethylene Diamine Tetracetate*

EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg

ESAB – Escola Superior Agrária de Bragança

ESTS – *Expressed Sequence Tagged Sites*

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FN – Número Fundamental

G – Guanina

g – RCF Aceleração Relativa de Centrifugação

H<sub>esp</sub> – Heterozigose Esperada

HLA – *Human Major Histocompatibility Complex*

H<sub>obs</sub> – Heterozigose Observada

HW – Hardy-Weinberg

IAM – *Infinite Alleles Model*

IGP – Indicação Geográfica Protegida

INE – Instituto Nacional de Estatística

LG – Livro Genealógico

MAS – *Marker Assisted Selection*

MHC – *Major Histocompatibility Complex*

ml – Mililitro

2n – Número Diploide

n<sub>a</sub> – Número de Alelos Observados

n<sub>e</sub> – Número Eficaz de Alelos

NGH – *Nordic Gene Bank for Farm Animals*

NJ – *Neighbour Joining*

nm – Nanómetros

OAR – Cromossoma Ovino

°C – Graus Celsius

Pb – Pares de Base

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PHW – Proporção de Hardy-Weimberg

PIC – Conteúdo de Informação Polimorfismo

Qt – Quinta

QTL – *Quantitative Trait Loci*

RADP – *Random Amplification of polymorphic DNA*

RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphic*

RZ – Registo Zootécnico

SDS – *Sodium Dodecil Sulfat*

SMM – *Stepwise Mutation Model*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphisms*

SSCP – *Single-Strand Conformation Polymorphisms*

T – Timina

TBE – *Tris Borate EDTA*

Temp – Temperatura

TIHO – *Department of Animal Breeding at Hanover Veterinary University*

UPGMA – *Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*

UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

µM – MicroMole

UV – Ultravioletas

UVM – Universidade de Vermont

V – Volt

Z-DNA – Conformação Específica do DNA

## PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1 – INTRODUÇÃO

Uma tese não é mais do que um pequeno acto, apoiado em bases científicas, na procura desesperada de compreender o Universo. Por isso, esta pequena história começou há muito tempo atrás.... Apesar de algumas incertezas e controvérsias, os dados arqueológicos actualmente disponíveis indicam que foi há cerca 10.000 anos atrás, numa zona do globo que vários autores denominam de “crescente fértil”, que a cabra domesticada (*Capra hircus*) desempenhou um papel fundamental na revolução agrícola do Neolítico.

O termo “vaca dos pobres”, muitas vezes atribuído à cabra domesticada, devido à sua facilidade de prosperar em zonas marginais, sob rigorosas condições ambientais, pode de certa forma ter desvalorizado a verdadeira importância económica que esta espécie sempre teve em várias regiões do mundo. Segundo MIRANDA do VALE (1946), a cabra domesticada desempenhou igualmente um papel admirável em rituais de imolação, tanto religiosos como pagãos: “Os gregos sacrificavam a Baco o bode devastador dos vinhedos, para satisfazer os intentos vingativos deste deus, para além de imolarem a cabra a Júpiter porque, segundo a mitologia pagã, o deus dos deuses tinha sido amamentado por este animal. Os egípcios sacrificavam a cabra a Júpiter e davam-lhe o nome de *or*. Os lacedemônios veneravam a cabra e o bode, oferecendo-os a Juno e Apolo. O simbolismo católico fez do bode a imagem do pecador, enquanto que a ovelha representa o justo. O paganismo classificava o bode como animal imundo, cujo contacto deveria ser seguido de lavagens e purificações, enquanto que a cabra era um animal puro. A repugnância que, em todos os tempos, se sentiu pelo bode, deu origem à expressão “bode expiatório”, pelo qual se designam os indivíduos a quem se imputam culpas próprias e alheias”. Ainda hoje, a importância económica dos caprinos é posta em manifesto, com um censo mundial de aproximadamente 700 milhões de animais, continuando a fornecer carne, leite, pele e fibras aos pequenos produtores, principalmente em países em desenvolvimento (MACHUGH e BRADLEY, 2001).

O elevado número de raças caprinas actualmente existente teve a sua origem na intervenção do homem, ao longo de várias gerações. Para tal, contribuíram factores tão distintos quanto: variações climatéricas, doenças, nutrição, critérios de selecção e deriva genética, entre outros. Contudo, o aumento demográfico humano e a necessidade crescente de uma maior produção a custos inferiores impulsionaram a proliferação de uma produção

animal, altamente industrializada, que induziu uma redução de diversidade genética. Em alguns casos, mais graves, originaram-se mesmo extinções massivas de populações animais. Esta erosão dos recursos genéticos animais levou a maioria dos países a estabelecer programas para a sua preservação. Também no nosso país se implementaram diferentes projectos para a preservação de raças autóctones, de entre os quais destacamos o “PRAXIS XXI – Preservação de Raças Autóctones”, embora os caprinos não estivessem contemplados.

Estamos cientes da necessidade de preservar as nossas raças autóctones, uma vez que elas ocupam um importante lugar nos sistemas de produção natural e possuem várias implicações no meio rural: permitem o aproveitamento de zonas marginais, contribuindo para a não desertificação, animam a paisagem, estimulam e defendem a biodiversidade e enriquecem, com produtos tradicionais, o património histórico, cultural e social português (PORTUGAL, 2001). Para que estes sistemas se mantenham terão que se tornar mais eficientes, de forma a serem rentáveis. Esta rentabilidade não deverá nunca pôr em causa as características do produto final, nem sair de um contexto de “produção animal sustentável”. Esta será uma das formas mais eficiente de preservarmos o património genético nacional, para além de poderem ser adoptadas outras formas bastante mais polémicas de preservação, como seja a do germoplasma, eventualmente justificáveis nalgumas situações específicas.

Para que os sistemas de produção natural se tornem uma realidade, é necessário conhecer profundamente os animais tanto a nível genético como produtivo e reprodutivo.

Com este estudo pretendemos fazer face à ausência de caracterização da variabilidade da estrutura e das possíveis relações genéticas entre as diferentes raças autóctones caprinas portuguesas. Procuramos assim estabelecer uma base, constituída por um conjunto de microssatélites facilmente amplificáveis, sob a forma de *multiplex*, para a realização de futuros trabalhos.

De acordo com CAVALLI-SFORZA *et al.* (1994), os resultados dos estudos populacionais devem, sempre que possível, ser interpretados num contexto histórico, razão pela qual introduzimos neste trabalho um capítulo contendo dados históricos relativos às cinco raças autóctones portuguesas.

O recurso à genética molecular, assim como a utilização de novas tecnologias como a de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a identificação de microssatélites e sua utilização, permitiu a “navegação” na molécula de DNA. Desta forma, conseguiu-se dar um passo significativo no conhecimento nos diferentes genomas.

De todos os marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites têm-se revelado os mais utilizados em estudos ligados à genética de populações. A popularidade destes marcadores relaciona-se com a sua densa distribuição ao longo do genoma, com a sua grande variabilidade, com o facto de terem uma herança co-dominante, não serem influenciados por factores ambientais, gozarem de neutralidade (possuem pouco ou nenhum valor de adaptação ou selecção) e serem facilmente amplificados por PCR, necessitando-se de quantidades ínfimas de DNA.

A utilidade dos microssatélites, na estimação das distâncias genéticas entre populações relativamente próximas, foi testada por diferentes investigadores como ESTOUP *et al.* (1995), FORBES *et al.* (1995), ARRANZ (1996), BARKER *et al.* (1997) e MACHUGH *et al.* (1997). Apesar das múltiplas vantagens apresentadas pelos microssatélites, alguns autores como STEPHAN (1997) referem que as propriedades estão longe de ser compreendidas.

A necessidade de conhecimento e utilização da metodologia estatística disponível e apropriada ao estudo realizado, levou à inclusão de um capítulo, na revisão sobre este tema.

Em função dos factos expostos anteriormente, propusemo-nos alcançar os seguintes objectivos:

- Desenvolver a metodologia necessária para a realização de estudos populacionais em caprinos mediante a utilização de marcadores de microssatélites.
- Conhecer a estrutura genética das raças caprinas autóctones portuguesas e seus ecótipos mais importantes, mediante a utilização de 23 marcadores do tipo microssatélite. As raças consideradas no presente trabalho (e ecótipos no caso de existirem) foram as seguintes:

Raça Bravia

Raça Serrana

Ecótipo Transmontano

Ecótipo Jarmelista

Ecótipo Ribatejano

Raça Charnequeira

Ecótipo Alentejano (Char. A)

Ecótipo Beiroa (Char. B)

Raça Serpentina

## Raça Algarvia

- Estudar as relações genéticas entre as diferentes populações analisadas (raças e ecótipos) utilizando como comparação as raças exóticas mais estudadas, a Alpina e a Saanen.

Numa perspectiva de opções em termos de preservação de recursos genéticos, este estudo representará uma contribuição que, no futuro, deverá ser complementada por resultados que permitam uma associação entre genes e características raciais, nunca esquecendo a possibilidade de informação na variação quantitativa das características de adaptação. Neste sentido e por esta tese não pretender ser um trabalho acabado, existe ainda um longo caminho a percorrer, que só será possível com a continuada paixão pelo saber....

## 2 – RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS

### 2.1 – DOMESTICAÇÃO

A “Revolução Neolítica” foi, certamente, uma das etapas mais decisivas na história das sociedades humanas. Entendamos esta revolução como a passagem da apropriação de recursos espontâneos, à produção destes mesmos recursos domesticados. Desta forma, o homem garantiu, em termos de recursos necessários à sua sobrevivência, uma melhor disponibilidade e acessibilidade, ao mesmo tempo que foi moldando essas plantas e esses animais de forma a adaptá-los a novos ecossistemas, para além de os ajustar às suas necessidades (ENCICLOPÉDIA EINAUDI, 1989).

QUADRO I – Datas e locais conhecidos relativamente à domesticação de várias espécies animais (adaptado de UVM, 2002)

Espécies	Data (A.C.)	Localização
Cão	10.000	Sudoeste Asiático, China, América do Norte
Ovinos	8.000	Sudoeste Asiático
Caprinos	8.000	Sudoeste Asiático
Suínos	8.000	Sudoeste Asiático, China
Asininos	4.000	Egipto
Equídeos	4.000	Ucrânia
Búfalo de Água	4.000	Sul da Ásia ou China
Lama/alpaca	3.500	América do Sul
Galináceos	3.500	Ásia central
Camelo Árabe	3.500	Arábia

A primeira evidência da existência de um animal domesticado – o cão –, diz respeito há 14.000-12.000 anos atrás (TURNBULL e REED, 1974 e RYDER, 1984). Porém, o início da domesticação, em termos espaciais e/ou temporais, não é muito preciso. Em primeiro lugar, porque a domesticação não pode ser entendida como um facto, mas sim como um processo que foi iniciado no passado e se prolongou até aos dias de hoje. Quanto ao local, talvez tenham surgido vários focos de domesticação, em diferentes pontos do globo terrestre. Do ponto de vista arqueológico, alguns desses pontos estão melhor documentados do que outros (RYDER, 1984). Contudo, a maioria dos autores apontam o “Crescente Fértil”, do Sudoeste Asiático, entre o mar mediterrâneo e o golfo Pérsico, como o berço

das civilizações agrárias (TURNBULL e REED, 1974 e CALDAS, 1991). Nesta região do globo, um clima adequado e um solo fértil terão sido os pré-requisitos que ditaram o desenvolvimento dos processos de domesticação dos animais. Como consequência, a maioria das espécies domesticadas e actualmente utilizadas na agricultura de todo o mundo, tem origem na Euro-Asiática (Quadro I).

Muito se tem escrito acerca da domesticação, embora frequentemente num plano de meras suposições. À medida que a ciência avança, com melhores meios auxiliares de análise, nomeadamente na área da Biologia Molecular, para além de novas descobertas arqueológicas, todas as suposições referidas poderão ser reforçadas, rejeitadas ou recreadas. A juntar a tudo isto, será sempre necessária uma análise crítica que equacione as diferentes vertentes da domesticação e o seu enquadramento na época.

Antes de avançar com alguns fundamentos de suporte ao início da domesticação, há que ter presente as alterações climáticas entretanto ocorridas. Na altura, assistia-se ao fim do último período glacial, a terra aquecia e conseqüentemente a erva selvagem proliferava, principalmente o trigo e a cevada (REED, 1969). Este aumento na densidade das plantas fornecia uma maior fonte alimentar, que podia ser armazenada durante meses sob a forma de sementes. Este tesouro não podia ser deixado a saque e assim pequenos grupos familiares tornaram-se sedentários (REED, 1969). O homem continuava a caçar, mas a mulher podia dedicar-se ao armazenamento de alimentos. Nem sempre a necessidade faz a habilidade, ou seja, não foi a escassez de alimento que levou o homem à domesticação de plantas e animais, mas muito provavelmente foi a sua abundância que lhe abriu novos horizontes para poder criar e implementar uma nova relação com plantas e animais (SAUER, 1969 e UVM, 2002). Contudo, o processo da domesticação envolveu certamente várias motivações e condicionantes, que embora possam ser consideradas “condições necessárias”, nenhuma delas por si só é suficiente para explicar o porquê da domesticação. De entre as mais plausíveis salientamos a convivência prolongada entre o homem, o vegetal e o animal (fisiologicamente pré-adaptado à domesticação) e a aprendizagem empírica que daí resultou num conhecimento mais profundo do comportamento animal, de forma a poder manipulá-lo. O estabelecimento de ligações mais estreitas, quando crianças e mulheres “adoptaram” pequenas crias como animais de estimação, nalguns casos pode ter sido fortemente impulsionado por fenómenos comportamentais como o *imprinting* (RYDER, 1983; MAIJALA, 1997 e COMPTON’S ENCYCLOPEDIA, 2000). A magia e motivações religiosas poderão também ter contribuído para a domesticação. Porém, talvez um dos factores mais importantes envolvidos na génese da domesticação tenha sido a

possibilidade de transferir animais do seu habitat selvagem para meios ambientes diferentes, onde estes se tornaram mais vulneráveis à acção do homem (MAIJALA, 1997). É muito possível que a origem deste processo tenha sido perfeitamente “acidental”. Assim, por exemplo, pode-se referir o caso de uma mulher que, habitando nas colinas de Niza, na Fenícia, por volta do ano 5.000 A.C., depois de colher distraidamente algumas sementes de ervas espontâneas (cevada e trigo) acabou por as largar numa clareira onde, humedecidas pelos nevoeiros que desciam do monte Herman, acabaram por germinar e frutificar. O facto foi de tal forma relevante, que a dita mulher foi imortalizada pelos Egípcios como Isis, pelos povos da Ásia Menor como Cybeles, Agdestes e Dindima, pelos Gregos como Demeter e pelos Romanos como Ceres, ou seja, a deusa das searas (CALDAS, 1991).

Aparentemente, a domesticação foi iniciada de uma forma inconsciente. Mais tarde, a pressão que o aumento demográfico exerceu sobre os recursos alimentares e em especial sobre o terreno cultivável, terá feito o homem tomar consciência sobre os reais benefícios da sua utilização (SMITH e CUYLER YOUNG, 1972).

Segundo CALDAS (1991), nos espaços mediterrânico e atlântico do ocidente Ibérico, o pastoreio jamais poderá ser considerado separado da agricultura. Contudo, noutros pontos do globo terrestre (por exemplo, na China), os aluviões férteis de grandes rios tornaram possível o estabelecimento e a evolução de uma agricultura carente de fauna.

Os ovinos e os caprinos foram as primeiras espécies a serem domesticadas com o intuito de servirem de alimento (UVM, 2002). Grande parte dos autores refere a domesticação da cabra como sendo simultânea à dos ovinos, embora alguns afirmem que, dado o seu temperamento bravio, os primeiros foram domesticados mais tarde, preferencialmente em regiões acidentadas e montanhosas. Segundo ARALA PINTO, em “Gado Caprino” (citado por CALDAS, 1991), foi a partir de diferentes cabras selvagens, como a *Capra falconeri*, das montanhas da Índia, ou da *Capra prisca*, presente no espaço Euro-Asiático, que os rebanhos de pastoreio se organizaram. Até à relativamente pouco tempo atrás, em Portugal, mais precisamente na Serra do Gerês, existia uma espécie selvagem de caprinos. Estes caprinos, segundo alguns autores, pertenciam à *Capra pyrenaica* Schinz, da qual seria uma variedade de menor estatura. Outros autores agruparam-nos aos caprinos existentes nas serras espanholas, denominando-os de *Capra hispanica* Schimp. Finalmente, os caprinos do Gerês acabaram por ser considerados distintos dos das serras espanholas e passaram a ser denominados por *Capra lusitanica* (CALDAS, 1991). Estas cabras viviam nos mais arriscados penhascos, alimentando-se de matos silvestres. Talvez por tudo isso e devido à sua herança ancestral, a cabra doméstica

seja uma enamorada do campo e da liberdade: “ao seguir o homem fá-lo por gosto, por capricho e não por vileza ou conveniência, como a ovelha e a maior parte dos animais domesticados” (CALDAS, 1991).

No início da domesticação, embora não tivessem sido criados novos génotipos, as mudanças ambientais permitiram a manifestação de diferenças genéticas até então imperceptíveis, tornando-as seleccionáveis para o homem. Estas diferenças genéticas, aliadas à redução da pressão exercida pela selecção natural (LUSH, 1945), determinaram um aumento considerável na taxa e na extensão da variabilidade genética (BELYAEV, 1979). Este aumento da variabilidade genética possibilitou a “criação” do actual elevado número de raças animais domesticadas (4.500-5.000), ainda que destas menos de 30 sejam presentemente utilizadas de uma forma considerável na agricultura (FAO, 1999).

Se por um lado, o homem ao domesticar conseguiu libertar-se de certos constrangimentos impostos pelos ecossistemas, por outro lado, esta capacidade de os controlar, aliada a uma busca incessante de supremacia sobre eles, levou o homem a esquecer-se de que ele próprio fazia parte integrante desses ecossistemas, destruindo grande parte dos recursos naturais (ENCICLOPÉDIA EINAUDI, 1989). O homem afirmou-se, no fim do Pleistoceno e no decurso dos últimos 10.000 anos, impondo o seu domínio em todo o Mundo. Durante este período, revelou-se bastante mais destruidor das outras espécies animais do que qualquer outra força natural (ATLAS GEOGRÁFICO, 1991). Desde então, o número de espécies eliminadas pelo homem tem vindo sempre a aumentar. Actualmente, assiste-se a um ritmo de extinção de animais e plantas que só pode comparar-se àquele que ocorreu à 65 milhões de anos, altura em que se produziu uma espectacular catástrofe natural (ou várias), responsável pelo desaparecimento de múltiplas espécies, entre elas as dos dinossauros. Se no início e durante milhares de anos, o impacto do *Homo sapiens* sobre a natureza foi quase imperceptível, nos últimos séculos as alterações ambientais por ele provocadas cresceram exponencialmente (VIDA, 1994). A história do homem na terra é relativamente curta, mas o seu efeito sobre a biosfera é devastador.

A domesticação conduziu igualmente ao crescimento desmedido de ecossistemas não “usuais”, os quais acabaram por determinar uma menor diversidade de espécies, com uma significativa perda de variabilidade genética (REICHERT, 1982 e FAO, 1999). Esta perda global de diversidade está patente tanto no número de espécies como na diversidade genética destas (VIDA, 1994). De facto, à medida que o processo de domesticação avançou, mais se acentuou a tendência para a homogeneização e para a especialização, tendo-se chegado aos actuais sistemas de produção em estabulação mono raciais

(REICHERT, 1982). Em 1867, MARX referiu-se ao conceito de raça como uma criação do homem, fruto do seu esforço contínuo de transformação, acumulado ao longo de séculos. Embora os sistemas intensivos de produção sejam mais facilmente controlados e explorados, as leis da ecologia impõem ao homem, em contrapartida, o fornecimento de grandes quantidades de energia para que a produtividade se mantenha elevada. Por outro lado, desliza-se rapidamente para um processo de erosão genética (ENCICLOPÉDIA EINAUDI, 1989). A perda de diversidade genética poderá conduzir a situações difíceis de contornar, face a mudanças imprevisíveis das condições ambientais. Porém, seria profundamente injusto apontar a domesticação como principal ou única causa do processo de erosão genética, até porque este processo determinou o aparecimento de novas populações, ditas domesticadas, a partir de espécies selvagens (LUSH, 1945). Talvez a degradação do meio ambiente, sem critério, a que se assiste diariamente, apenas para servir certos interesses de uma civilização altamente industrializada, seja efectivamente a grande causadora de tal erosão genética (RUTTAN, 1999).

Um novo tipo de domesticação, assente em bases mais conscientes de que o homem e a natureza formam um todo, ou seja, num melhor equilíbrio entre a satisfação das necessidades humanas e as limitações impostas pela natureza, deverá ser aplicado de futuro. Que cada vez mais a “agricultura do passado” dê lugar a uma “agricultura sustentada” (RUTTAN, 1999). Este será o grande desafio futuro, com o qual se deverão deparar os agricultores, os agro-industriais, os investigadores e os governantes (SCHILHORN, 1999). Programas educacionais que conduzam a esta mudança de atitude e à criação de uma verdadeira “agricultura sustentada” deverão ser desde já implementados (TILMAN, 1999 e SCHILHORN, 1999).

## 2.2 – PRESERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS EM ANIMAIS DOMESTICADOS

O futuro de cada nação e da humanidade, em geral, depende do modo como a presente geração conduz o desenvolvimento de estratégias para uma produção sustentada de alimentos. Os recursos genéticos animais proporcionam uma grande contribuição para a produção mundial de alimentos (FAO, 1999). Quando nos referimos aos recursos genéticos animais, incluímos todas as espécies, raças e ecótipos que possam ter interesse, económico, científico ou cultural para a agricultura e para o ser humano, tanto no presente como no futuro (FAO, 1999).

De um total aproximado de 50.000 espécies de vertebrados conhecidas, apenas 30 a 40 espécies de mamíferos e de aves são reconhecidas como domesticadas, contribuindo para a espécie humana com: carne, leite, ovos, fibras, pele, estrume e força de trabalho (FAO, 1999). A fim de fazer face às futuras necessidades humanas, há que aumentar a produtividade e a qualidade dos produtos de origem animal, ou seja, conseguir uma maior eficiência de produção, ainda que enquadrada numa agricultura sustentada, e na qual a diversidade genética animal deverá constituir um ponto-chave (WAGNER, 1999 e NOTTER, 1999).

Ao longo dos séculos, a acção conjunta da selecção natural e da selecção artificial resultou em milhares de raças geneticamente diferentes. Nos últimos 11.000 anos, estas raças foram cuidadosamente moldadas por diferentes culturas, a fim de se ajustarem a variadas condicionantes ambientais e de se adaptarem ao desempenho de vários papéis, sempre com o intuito de satisfazerem as necessidades humanas. O legado genético que herdamos não é mais do que o resultado de mutações, de deriva genética e de diferentes processos adaptativos e evolutivos, juntamente com diferentes pressões impostas pelo clima, pelas doenças parasitárias endémicas e pela disponibilidade de alimento e ainda do conjunto de critérios sucessivamente impostos, ao longo do tempo, pelo homem. Neste sentido, cada raça ou ecótipo constitui um conjunto de genes impossíveis de recuperar uma vez perdido (FAO, 1999). Raças que hoje são raras e que aparentemente não têm qualquer interesse podem possuir características que, no futuro, se tornarão de elevado interesse. Assim, por exemplo, uma raça chinesa de suínos – Taihu –, muito rara há alguns anos atrás, é actualmente considerada como muito valiosa por todos os produtores de suínos, já que consegue utilizar uma proporção bastante elevada de forragem na sua dieta, para além de atingir a puberdade sexual em apenas 64 dias e apresentar taxas extraordinariamente elevadas de fertilidade e de prolificidade, produzindo facilmente ninhadas de 16 leitões. Este tipo de raças pode ainda possuir características de especial significado para populações locais e certas economias regionais (FAO, 1998).

Geralmente, as raças autóctones animais revestem-se de uma importância considerável, não pelas suas produções, que frequentemente são “escassas” (usualmente porque são inadequadamente avaliadas), mas porque normalmente apresentam grande resistência a várias doenças endémicas, elevadas taxas de fertilidade, boas qualidades maternas, grande longevidade e um elevado poder de adaptação a condições ambientais adversas, para além de satisfazerem várias motivações culturais e/ou religiosas. Na verdade, elas permitiram ao homem sobreviver em habitats marginais, como os desertos e

as terras não cultiváveis. Actualmente, estima-se que 12% da população mundial vive em zonas marginais do globo, dependendo quase que exclusivamente da exploração de raças autóctones de ruminantes. Para além de tornarem útil estas zonas marginais, os pastores acabam por contribuir claramente para a manutenção da diversidade genética (FAO, 1998).

Nos países desenvolvidos, as raças autóctones voltam a ser consideradas de grande interesse, uma vez que a manutenção de raças que foram desenvolvidas sob condições “artificiais” altamente favoráveis implica grandes custos de produção. Nestes países, particularmente nas explorações de grande dimensão, localizadas em zonas com condições adversas, com investimentos médios ou baixos, a opção por este tipo de raças é certamente a mais acertada. A partir de raças bem adaptadas ao meio e detentoras de alguma diversidade genética, é possível tentar melhorar uma ou outra característica directamente envolvidas na produtividade ou na qualidade de um produto animal. Com planos adequados e com este tipo de abordagem pode-se assegurar um melhoramento genético feito de forma sustentada, que complementará a conservação da diversidade dos animais domesticados (HAMMOND, 1998).

### 2.3 – PERDA DA DIVERSIDADE GENÉTICA DOS ANIMAIS DOMESTICADOS

Apesar do reconhecimento do valor dos recursos genéticos dos animais domesticados, nos últimos 50 anos estes têm sofrido uma enorme erosão genética, calculando-se que 30% deles se encontram mesmo em riscos de extinção (ECA, 1999). Por todo o Mundo, a maior ameaça à diversidade genética dos animais domesticados é a alta industrialização da produção animal (NRC, 1993). Nos países industrializados, esta produção animal concentra-se em poucas raças ou estirpes, que foram seleccionadas para uma produção intensiva de carne, leite ou ovos, em ambientes altamente controlados. Estas raças apresentam elevadas produções, apenas quando alimentadas com alimentos de grande qualidade e quando aplicados outros investimentos, para além de terem de estar protegidas das condições climatéricas, das doenças e de outras condicionantes ambientais. As raças seleccionadas expandiram-se por todo o Mundo, aparentemente com uma suposta adaptação rápida e envolvendo poucos custos. Com o decorrer do tempo, os produtores aperceberam-se da necessidade de distribuir muito mais alimento e de proceder a vários outros investimentos com o intuito de manter as ditas raças. Frequentemente, os animais exóticos não se reproduzem ou sobrevivem tão bem quanto os animais autóctones, bem adaptados ao meio ambiente local, embora possam ser usados em programas de

cruzamento. Como resultado, o seu ciclo de produção é inferior ao observado na região de origem, obrigando os produtores a elevadas taxas de substituição, o que implica a manutenção de um elevado número de animais jovens, que ainda não atingiram o máximo do seu potencial produtivo (FAO, 1999).

A proliferação desta agricultura industrializada pôs em risco várias raças autóctones, quer devido à realização de cruzamentos indiscriminados com raças exóticas, quer por simples substituição. A título de exemplo, pode-se referir as raças importadas do Norte da América e do Leste Europeu que, com o passar do tempo, se revelaram incapazes de manter elevadas produções, em condições ambientais menos favoráveis. A introdução desta produção animal intensiva, na maioria dos casos, levou à dependência da importação de tecnologias e de germoplasma, incapaz de ser suportada pelos agricultores mais pobres (NRC, 1993). Nestas áreas, a produção animal começa a ser repensada e a reconhecer-se que as raças autóctones são muito mais produtivas em sistemas com baixos investimentos. A maioria destas raças tem um grande potencial para aumentar as suas produções, sem perder a adaptação às condições ambientes locais, quando submetidas a programas de selecção apropriados. Alguns cientistas da FAO (*Food and Agriculture Organization*) referem mesmo que, em 80% das áreas rurais do Mundo, estes recursos genéticos bem adaptados ao meio em que estão inseridos são produtivamente superiores aos das raças modernas mais comuns (FAO, 1998).

No Norte da Europa, a produção animal intensiva caracteriza-se por uma elevada uniformidade e por um controlo total, nalguns sectores animais, como o das aves e o dos leporídeos, dos núcleos de reprodutores por parte de algumas empresas (CRAWFORD, 1990). A inconsequente aplicação das novas técnicas de reprodução animal contribuiu igualmente para a depleção da diversidade genética. Assim, a utilização desadequada de técnicas como as da inseminação artificial, da ovulação múltipla, e da transferência de embriões, levaram à produção de um grande número de crias “uniformes”, a partir de um número muito restrito de progenitores. A rápida distribuição de germoplasma exótico por todo o Mundo, impulsionada pela aplicação das novas tecnologias e pela facilidade do seu transporte, contribuiu e muito para a extinção de algumas raças autóctones, particularmente de bovinos (HALL *et al.*, 1993). Convém salientar que estas mesmas tecnologias, quando devidamente utilizadas, podem servir para o maneio e para a conservação dos recursos genéticos animais.

Outro factor com impacto decisivo no processo de erosão genética é a explosão demográfica e a degradação do meio ambiente. Algumas medidas políticas contribuíram

também para o desaparecimento de recursos genéticos animais. Em Portugal, a interdição de alguns terrenos baldios à pastorícia levou à diminuição dos efectivos de pequenos ruminantes e mesmo ao seu desaparecimento de algumas regiões do país (AZEVEDO, 1985).

#### 2.4 – ATITUDES, MEDIDAS E PROGRAMAS PARA A CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS DOS ANIMAIS DOMESTICADOS

A erosão da diversidade genética animal e a necessidade de implementar medidas para a travar, foram já reconhecidas nos anos sessenta do século passado. Porém, só em 1990 foi recomendado à FAO a preparação de um projecto global para o desenvolvimento sustentado dos recursos genéticos animais, o qual deveria combinar a conservação das raças autóctones e a preservação da variabilidade genética com o melhoramento genético animal (FAO, 1993). Para além destes princípios, esse programa global deveria ter subjacente a necessidades da actual e da futura Produção Animal. Mais tarde, numa iniciativa conjunta da Comissão de Genética da *European Association of Animal Production* (EAAP) e da FAO, foi criado o *Animal Genetic Data Bank*, na Universidade de Veterinária de Hannover (TIHO). Entre 1988 e 1991, a TIHO, ao abrigo de um acordo celebrado com a FAO, geriu esta base de dados para o grupo de trabalho dos recursos genéticos animais (AnRG) (FAO, 1999). Em 1991, a FAO criou o banco de dados denominado *FAO Global Breed Data Bank* que, em 1994, recebeu e integrou todos os dados da TIHO. Os dados existentes nesta base de dados referem-se a 9 espécies e a 1.016 raças europeias e não europeias e foram obtidos em 53 países diferentes. Desde 1994, tanto a FAO como a EAAP têm mantido bases de dados com informação recolhida através de diferentes questionários e com processos de actualização também eles diferentes. Desde 1996, estas bases de dados encontram-se disponíveis na Internet (FAO, 1999). Porém, foi apenas em 1993, sob a tutela da FAO, que verdadeiramente começou a preparação do grande projecto intitulado *Global Strategy for Management of Farm Animals Genetic Resources*. O desenvolvimento e a implantação do *Global Strategy* fazem parte integrante do trabalho da comissão da FAO, denominada *Genetic Resources for Food and Agriculture* (GPRA). Este projecto criou um sistema de informação (DAD-IS) para que os diferentes países pudessem, mediante certas normas, não só ter acesso a este tipo de informação, como também contribuir para a sua melhoria. Conjuntamente, foram criados, em vários pontos do Mundo, projectos com o nome de “Missões de Identificação” (FAO, 1999).

O número de raças incluídas nos sucessivos inventários dos recursos genéticos animais europeus, organizados pela EAAP, entre 1982 e 1999, encontra-se discriminado no Quadro II. Os resultados apresentados pela EAAP, relativamente aos anos de 1997-1999, incluem já os dados existentes na base da FAO. Ao longo deste período de tempo, a realização sucessiva de novos censos determinou um aumento progressivo do número de raças incluídas nos inventários da EAAP, o que reflecte o esforço constante dos diferentes países na inventariação dos seus recursos genéticos animais.

QUADRO II – Número de diferentes raças europeias incluídas nos diversos censos organizados pela EAAP, entre 1982 e 1999 (Adaptado de FAO, 1999)

Espécies	1º Censo da EAAP	EAAP-AGDB-Hanover		FAO-DAD-IS	
	1982	1993	1997	1997	1999
Bovinos	271	277	311	332	423
Caprinos	65	68	101	123	156
Equídeos	206	123	139	213	273
Ovinos	273	283	338	407	488
Suíños	123	126	134	156	219
Total	940	877	1023	1231	1559

Existem várias organizações governamentais e não governamentais envolvidas no manuseamento dos recursos genéticos animais, que prestam apoio aos projectos de investigação, dão conselhos aos criadores e incentivam a formação de associações de criadores das diversas raças. No âmbito europeu, um importante contributo foi prestado pelos países nórdicos, ao estabelecerem, em 1990, o *Nordic Gene Bank for Farm Animals* (NGH) (FAO, 1999). Paralelamente, vários países puseram em marcha programas nacionais para a gestão e conservação dos seus recursos genéticos animais. O estabelecimento de um programa de conservação de recursos genéticos animais é algo bastante polémico e que muitas vezes levanta questões insolúveis, pois parte destas prendem-se com previsões futuras. Na verdade, é economicamente inviável preservarem-se todos os recursos genéticos animais actualmente existentes. Assim, uma das primeiras perguntas que se levanta é: o que é que deve preservar? De um modo geral, é extremamente difícil responder logo a esta primeira questão, senão vejamos. Duas populações isoladas, quer por razões geográficas ou ecológicas, tendem a acumular diferentes alelos, como consequência de mutações e/ou de deriva genética (populações finitas). A selecção natural e a selecção

artificial contribuem igualmente para a diferenciação destas populações, mas estas diferenças, na maioria dos casos, não se localizam nos *loci* que se encontram disponíveis para análise das distâncias genéticas. Porém, as medidas das distâncias genéticas são as que melhor aportam uma informação objectiva e, na ausência de outros dados informativos, as que permitem posicionar as raças e populações de acordo com o seu grau de distinção filogenético (MAY, 1990). De qualquer forma, uma vez que as distâncias genéticas não reflectem as consequências da selecção artificial sobre as características morfológicas ou económicas, nem as da selecção natural sobre a capacidade de adaptação ao meio, nem tão pouco permitem medir adequadamente o tempo a partir do qual determinada população divergiu de uma outra ancestral, estas só deverão ser usadas, em matéria de conservação, como um guia inicial da estrutura e da diferenciação de uma dada população.

QUADRO III – Tamanho das populações indicativo da possibilidade de perigo de extinção, nalgumas espécies domesticadas (Adaptado de MAIJA *et al.*, 1984)

Espécies domesticadas	Tamanho da população	Mudança de direcção	Nº de fêmeas reprodutoras	Nº de machos reprodutores
Bovinos	1.000-5.000	Declínio	<1.000	<20
Ovinos e Caprinos	500-1.000	Declínio	<500	<20
Suínos	200-500	Declínio	<200	<20

A decisão final sobre quais as populações a preservar deverá ter por base um estudo económico sobre as suas características produtivas, a avaliação das suas capacidades de adaptação a um determinado meio, a verificação da presença de genes ou de fenótipos raros, o estudo da importância local ou regional dessas populações e a sua integração em determinados sistemas produtivos, tendo em conta os recursos e as infra-estruturas da região (FAO, 1993). Do ponto de vista económico, esta decisão final é igualmente difícil de tomar, uma vez que uma característica produtiva hoje bem cotada, amanhã poderá tornar-se totalmente irrelevante, já que o mercado sofre flutuações e o “consumidor” não é algo estático (NRC, 1993). Outra importante questão a avaliar é o *status* de cada população e a identificação das que se possam encontrar em perigo de extinção. Para isso, é necessário ter-se um censo actualizado destas populações e conhecer-se a sua dinâmica, ou seja, saber qual o tamanho actual das várias populações e estudar a sua estabilidade. Se uma dada

população não se encontrar estabilizada, dever-se-á prever a sua taxa de mudança e determinar se ela incorre ou não em perigo de extinção (Quadro III).

De acordo com a FAO (1999), uma dada raça pode ser classificada, de acordo com o tamanho do seu efectivo e a dinâmica da sua evolução, em:

- Raça extinta. Aquela que já não é possível recuperar, devido à falta de reprodutores, de sémen, de oócitos e/ou de embriões.
- Raça em estado crítico. Aquela cujo número total de fêmeas reprodutoras é inferior a 100 ou cujo número total de machos reprodutores é inferior ou igual a 5. Nesta classe deverão ainda ser incluídas todas as raças cuja população total seja ligeiramente superior à dos valores acima mencionados, mas que apresentem uma tendência de decréscimo e uma percentagem de fêmeas efectivamente de raça pura inferior a 80%.
- Raça em perigo. Aquela cujo número total de fêmeas reprodutoras varia entre 100 e 1.000 ou cujo número total de machos reprodutores é inferior ou igual a 20, embora sendo sempre superior a 5. Nesta classe deverão ainda ser incluídas todas as raças cujo número total de fêmeas reprodutoras seja ligeiramente superior a 100, mas que apresentem uma tendência para aumentar e uma percentagem de fêmeas efectivamente de raça pura inferior a 80%. Finalmente, deverão ainda ser incluídas nesta classe todas as raças cujo número total de fêmeas reprodutoras seja ligeiramente inferior a 1.000 e que apresentem uma tendência de decréscimo e uma percentagem de fêmeas efectivamente de raça pura inferior a 80%.
- Raça em estado crítico conservada e raça em perigo conservada. Classes de raças em estado crítico ou em perigo, mas que são mantidas por programas de conservação públicos, comerciais ou para investigação.
- Raça não em perigo. Aquela cujo número total de fêmeas e de machos reprodutores seja respectivamente superior a 1.000 e a 20 ou cujo número de fêmeas reprodutoras seja ligeiramente inferior a 1.000, mas que apresentem uma tendência de aumento e uma percentagem de fêmeas efectivamente de raça pura próxima dos 100%.

Outros critérios podem ser utilizados na avaliação da evolução dos efectivos animais, como seja a análise da evolução do número de animais registrados por ano, entre outros. O importante será tomar toda a informação disponível como ponto de partida e depois

analisá-la, caso a caso. Nos países desenvolvidos, as populações constituídas por grande número de animais são facilmente postas em risco, por factores como anos extremamente secos, epidemias, excesso de cruzamentos entre diferentes populações (facilitados pelo uso das actuais tecnologias reprodutivas). Na verdade, em muito pouco tempo, a composição genética destas populações pode ser irremediavelmente alterada (NRC, 1993). Nestes casos, a FAO recomenda que, se numa população de 10.000 animais, em determinada altura o número total de fêmeas reprodutoras puras se torna inferior a 5.000, esta deverá ser rapidamente analisada e considerada como candidata à preservação.

## 2.5 – MÉTODOS PARA CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS

A conservação de recursos genéticos não pretende ser uma mera colecção e armazenamento de génotipos. O papel da conservação deverá ser o de assegurar que recursos genéticos únicos estejam à disposição dos produtores e que estes possam ser usados de uma forma sustentada, a fim de satisfazerem as necessidades humanas actuais e do futuro (FAO, 1999).

Existem três métodos distintos de conservação dos recursos genéticos animais (HODGES, 1990 e NRC, 1993):

- Animais vivos (*in situ*)
- Criopreservação e armazenamento de germoplasma (*ex situ*)
- Armazenamento de DNA (*ex situ*)

### 2.5.1 – ANIMAIS VIVOS (*IN SITU*)

Este método refere-se à manutenção dos animais vivos integrados nos seus sistemas de exploração, ou em quintas experimentais. Neste sistema, permite-se uma evolução e uma adaptação constante dos animais ao meio em que vivem, podendo tornar-se bastante atractivo sempre que rentável. Em Portugal, foram feitos alguns esforços na criação de denominações de origem, como sucedeu relativamente à carne Mirandesa, ao queijo Terrincho, ao queijo da Serra da Estrela, entre outros. Quando este tipo de preservação não consegue ser rentável, os seus custos tornam-se bastante elevados, tendo de se optar pela criação de pequenas populações que, sem a intervenção do Estado, estão condenadas a desaparecer. Nestas pequenas populações, mesmo com programas de selecção bem delineados, a consanguinidade tende a aumentar, levando a uma perda de variabilidade

genética, a uma diminuição das aptidões produtivas dos animais e, conseqüentemente, ao aumento do risco de extinção (TORO *et al.*, 1977 e DENNISTON, 1977). Existe também o perigo de desaparecimento de toda uma população, por exemplo, face ao aparecimento de uma dada enfermidade (ALDERSON, 1990).

### **2.5.2 – CRIOPRESERVAÇÃO E ARMAZENAMENTO DE GERMOPLASMA (*EX SITU*)**

Este método inclui a criopreservação de gâmetas ou embriões e deverá funcionar sempre como um método complementar ao *in situ*. Apresenta custos inferiores ao método anterior, mas possui como grande desvantagem o facto dos animais não estarem sujeitos à evolução e à adaptação permanente ao meio ambiente. Incorre-se no risco de quando os quisermos utilizar, estes estarem totalmente desajustados do meio ambiente que vão encontrar.

### **2.5.3 – ARMAZENAMENTO DE DNA (*EX SITU*)**

Consiste no armazenamento de DNA, em geral, feito de uma forma não catalogada. A aplicação deste método levanta vários problemas, na medida em que os mapas genómicos não se encontram ainda totalmente disponíveis, de forma a permitir identificar quais as sequências de DNA que determinam certas características específicas dos animais vivos. Um outro problema resulta do facto de ainda não ser possível utilizar células viáveis congeladas para recrear um animal, determinando previamente as características desejadas. De qualquer forma, em futuros projectos de preservação de raças em vias de extinção, este método deverá ser tido em conta. A sua grande vantagem reside no facto do DNA ser considerado, pelas autoridades nacionais, como um químico e não como material biológico, o que possibilita a sua mobilidade, sem qualquer tipo de restrição, por todo o Mundo (ALDERSON, 1990).

Todos os métodos anteriormente referidos de preservação dos recursos genéticos têm a sua importância e deverão ser considerados em conjunto. É necessário implementar acções locais, nacionais e mundiais para a preservação dos recursos genéticos animais. Os esforços de conservação deverão ser bem planeados e envolver organismos governamentais e não governamentais, para que os custos sejam suportáveis e facilmente justificados.

#### **2.5.4 – NOTA FINAL**

Pelo que foi anteriormente referido, urge proceder não só a uma inventariação como também a uma caracterização genética dos nossos recursos genéticos animais, para o que já foram dados alguns passos noutras espécies domesticadas que não os caprinos.



### 3 – ORIGEM E SITUAÇÃO NA ESCALA ZOOLOGICA DO GÉNERO *CAPRA*

A origem taxonómica dos caprinos suscita ainda algumas dúvidas, apesar destes animais já terem sido alvo de vários estudos a nível imunológico, citogenético e molecular (CURTAIN, 1971; MASON, 1984; TUÑON, 1986; HEMMER, 1990 e CHAVES *et al.*, 2000).

Tal como ocorre com os ovinos selvagens, os caprinos selvagens existem sob diversas formas, não se sabendo se taxonomicamente constituem espécies separadas ou subespécies extremamente diferentes (HEMMER, 1990). Vários taxonomistas acreditam que tanto os ovinos como os caprinos são descendentes do grupo Rupicaprini, cuja representação actual inclui a camurça (*Rupicapra*), o goral (*Nemorhedus*) e a cabra de montanha Norte Americana (*Oreamnos*) (FRANKLIN, 1997). Estudos comparativos, realizados a nível molecular, entre os géneros *Ovis* e *Capra*, parecem descartar a hipótese, sustentada por alguns autores, de que os ovinos e os caprinos descendentes de um tronco comum, que terá existido no Paleolítico (CURTAIN, 1971). Várias diferenças biológicas foram observadas na estrutura das hemoglobinas de ambas as espécies (BOYER *et al.*, 1966). Frente a estas diferenças biológicas, que sugerem um número sucessivo de mutações em muitos *loci*, torna-se difícil de aceitar que as cabras e as ovelhas tenham tido origem num tronco comum (GONZÁLEZ, 1986). Estes e outros estudos, nomeadamente com DNA mitocondrial (mtDNA) (UPHOLT e DAWID, 1977) e dados electroforéticos de aloenzimas (HARTL *et al.*, 1990 e RANDI *et al.*, 1991), sugerem que os géneros *Ovis*, *Capra* e *Rupicapra* divergiram há aproximadamente 5 milhões de anos.

De acordo com HELLMAN (1965), na subfamília Caprinae aceitavam-se três géneros de ovinos selvagens primitivos: o *Ovis*, o *Ammotragus* e o *Pseudopsis*. Destes três géneros, o primeiro seria o antecessor dos ovinos domésticos. O segundo, também chamado ovelha berberisca, cabra berberisca ou *aoudad*, relacionar-se-ia com a ovelha do género *Ovis* ou com a *Capra* considerada taxonomicamente enigmática (JOPE, 1976). Finalmente, o terceiro constituiria uma forma intermédia entre os ovinos e os caprinos. Diversos estudos imunológicos referem uma maior proximidade entre o *Ammotragus* e a cabra, relativamente à ovelha (MANWELL e BAKER, 1977 e TUCKER e CLARKE, 1980). Sabe-se também que se produziram hibridações ocasionais entre o *aoudad* e a cabra doméstica, que originaram descendência fértil (GRAY, 1972).

Após a elaboração de cariótipos do *Ammotragus*, da *Capra* e do *Ovis*, verificou-se existir um número fundamental comum de 58 (FN; número total de braços de cromossomas autossómicos do conjunto diplóide). Todas as cabras, tanto as domésticas (*Capra hircus*)

como as selvagens (*Capra hircus*, *Capra ibex* e a *Capra falconeri*) apresentam  $2n = 60$  e um FN de 58 (WURTER e BENIRSCHKE, 1968 e NALDLER e LAY, 1975). O *Ammotragus* tem  $2n = 58$  e um FN de 58 (HECK *et al.*, 1968). Por seu turno, o *Ovis* experimentou uma série de reduções do número diplóide  $2n = 58$ , para  $2n = 54$ , embora mantendo um FN = 58 (BUNCH *et al.*, 1977 e VALDEZ *et al.*, 1978). Os cromossomas acrocêntricos 1 e 5 do cariótipo caprino mantiveram-se como entidades simples, especulando-se o facto deles terem ou não originado os cromossomas metacêntricos no *Ovis* (BUNCH, 1978). Tentou-se igualmente utilizar as diferenças entre antigénios de grupos sanguíneos para explicar as relações evolutivas entre os géneros *Capra*, *Ovis* e *Ammotragus* (NGUYEN e BUNCH, 1980) sem, no entanto, se ter obtido qualquer sucesso aparente. De acordo com FRANKLIN (1997), mais recentemente passou-se a aceitar na subfamília *Caprinae* 10 géneros, como indicado no Quadro IV, ainda que subsistam algumas dúvidas nas relações evolutivas entre eles.

QUADRO IV – Géneros da subfamília *Caprinae* (FRANKLIN, 1997)

<i>Ammotragus</i>	Aoudad
<i>Budorcas</i>	Takin
<i>Capra</i>	Cabras
<i>Hemitragus</i>	Tahr
<i>Nemorhedus</i>	Goral
<i>Oreamnos</i>	Cabra das montanhas rochosas
<i>Ovibos</i>	Musk ox
<i>Ovis</i>	Ovinos
<i>Pseudois</i>	Bharal ou ovelha azul
<i>Rupicapra</i>	Camurça

### 3.1 – ORIGEM FILOGENÉTICA DAS CABRAS DOMESTICADAS

O género *Capra* inclui várias formas de cabras selvagens, que vivem em habitats de montanha, do Norte da Mongólia à Rússia e da Europa Ocidental à Etiópia, para além da forma domesticada.

Os padrões corporais das cabras domesticadas e selvagens são muito semelhantes e em cativeiro podem cruzar-se entre si. Por esta razão, COUTURIER (1962) reconheceu

existir apenas a espécie *Capra aegagrus*. Porém, nem todos os autores são da mesma opinião, reconhecendo alguns deles várias espécies dentro deste género (SCHALLER, 1977; CORBET, 1978 e NOWAK, 1991). A *International Union for Conservation of Nature* descreve cinco espécies diferentes. Por seu turno, SHAKLETON (1997) refere a existência de nove espécies, cuja distribuição geográfica se encontra representada na Figura 1. Normalmente, estas relações taxonómicas baseiam-se em aspectos morfológicos, mais precisamente no formato dos cornos dos machos.

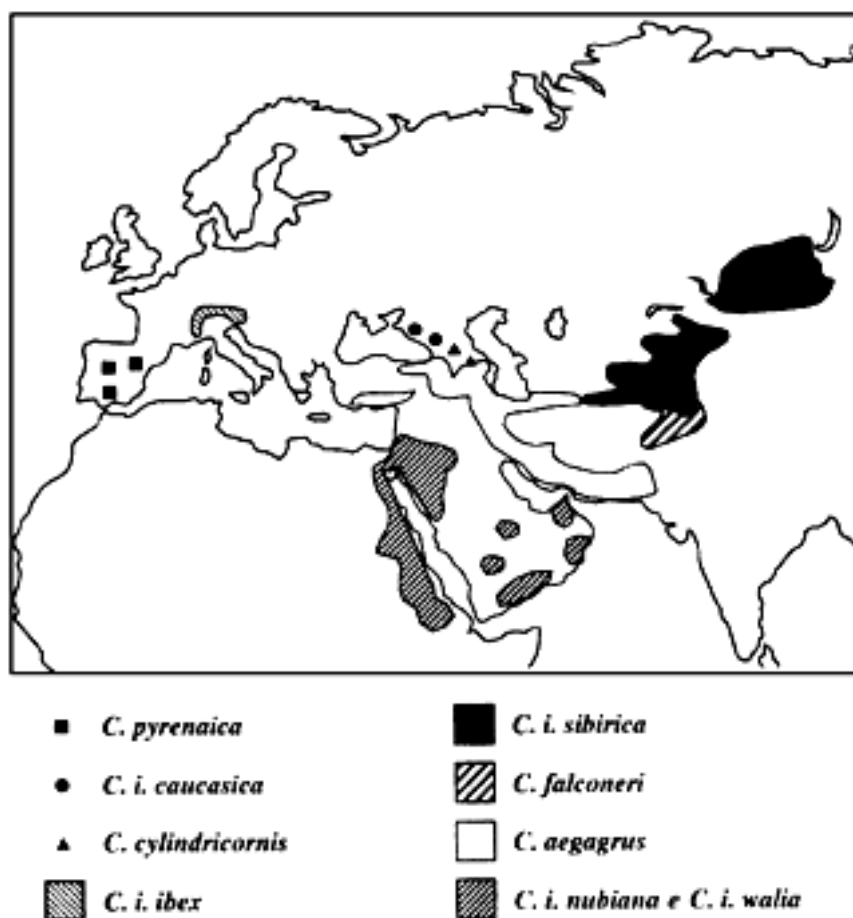


FIGURA 1 – Distribuição geográfica das espécies do género *Capra*, segundo COUTURIER (1962) e CORBET (1978). Taxonomia de acordo com SHACKLETON (1997).

Geralmente, a *Capra* spp. que vive no Cáucaso é dividida em dois grandes grupos: um deles distribui-se pela parte ocidental (*Kubar tur*) e o outro pela parte Leste (*Dagestran tur*) desta região. Enquanto que SCHALLER (1977) e SHACKLETON (1997) incluem a *Kuban tur* no grupo *ibex* (*C. i. caucásica*), CORBET (1978) e NOWAK (1991) definem-na como uma espécie separada: *Capra caucásica*. Porém, todos estes autores estão de acordo

em considerar a *Dagestran tur* como uma espécie separada: *Capra cylindricornis*. Por seu turno, COUTURIER (1962) afirma que na região do Cáucaso há apenas um grupo taxonómico: *Capra aegagrus* caucásica. O *markhor* (*Capra falconeri*) do Sudoeste da Ásia caracteriza-se pelos seus cornos torcidos e o *ibex* espanhol (*Capra pyrenaica*) pelos cornos curvos, como uma lira. A *Capra aegagrus* ocupa uma área geográfica muito grande, do lago Baikal ao Afeganistão. Os cornos destes animais são parecidos com os *ibexes*, mas a sua face anterior é curva (SCHALLER, 1977). Pensa-se que a cabra domesticada (*Capra hircus*) teve origem na *Capra aegagrus* (HARRIS, 1961), ainda que alguns autores, como CORBET (1978), levantem a hipótese de outras *Capra* spp. terem sido igualmente domesticadas ou cruzadas com a *Capra aegagrus*, já domesticada.

Voltando um pouco atrás e assumindo que o género *Capra* se divide em apenas seis espécies, estas serão, segundo COBERT (1978) e COBERT e HILL (1980), as de seguida discriminadas:

- 1 – *Capra aegagrus*, o bezoar ou cabra selvagem, ancestral da domesticada.
- 2 – *Capra ibex*, o ibex, com subespécies nos Alpes, na Ásia Central, no Próximo Oriente e na Etiópia.
- 3 – *Capra caucasiana*, o tur do Oeste Caucasiano. Esta espécie também é chamada Kuban ou ibex do Oeste Caucasiano (*Capra Ibex severtzovi*).
- 4 – *Capra Cylindricornis*, o tur do Leste Caucasiano.
- 5 – *Capra pyrenaica*, o ibex espanhol ou cabra selvagem espanhola, de que existe uma reserva nacional na Serra de Gredos.
- 6 – *Capra falconeri*, o markhor do Afeganistão, do Paquistão e do Tadjiquistão.

A designação *Capra prisca* foi atribuída ao conjunto de espécies que se pensavam ser as ancestrais das raças caprinas europeias e que possuíam cornos em forma de parafuso. Contudo, estudos ósseos mostraram que se tratavam efectivamente de cabras já domesticadas (HERRE, 1943 e MASON, 1984). Investigações realizadas no campo da morfologia comparada permitem afirmar, tal como já foi anteriormente referido, que a *Capra aegagrus*, existente no Sudoeste Asiático, constitui o mais provável ancestral da actual cabra domesticada. Os *ibexes* e os *tur* parecem nunca ter sido domesticados, embora apareçam em algumas gravuras encontradas no Egipto (MASON, 1984). HARRIS (1962) sugere que o principal ancestral dos possíveis antepassados selvagens da cabra

domesticada é o *bezoar*, do Sudoeste Asiático, e que o *markhor* pode ter dado origem a algumas raças da Índia e do Oriente Próximo. Na área de “Chiltan”, Paquistão, existe uma interessante população de caprinos selvagens, a qual, de acordo alguns autores, será um tipo extremo do grupo *falconeri* e segundo outros autores, um tipo extremo do grupo *aegagrus* (HEMMER, 1991). Estes caprinos combinam a cor da pelagem e a falta de juba do *bezoar*, com os cornos espiralados ou em forma de saca-rolhas do *markhor*, embora as suas extremidades anteriores sejam idênticas às do *bezoar* (HEMMER, 1991). O nome *bezoar*, atribuído à cabra selvagem *Capra aegagrus*, não é mais do que a corrupção do nome Persa *pád-zahr*, que significa antídoto contra veneno. Assim, estas cabras chamavam-se pázan, podendo ainda aparecer com dois outros nomes: *pasan* ou *pasang* (MASON, 1984).

A cabra *bezoar* é mais pequena do que o *ibex*, atingindo a sua altura ao dorso 80-90 cm. A cor do pêlo é cinzenta avermelhada, com manchas pretas. O seu tamanho é semelhante ao das cabras domesticadas, diferindo destas apenas na cor do pêlo e no tamanho dos cornos, que no caso do *bezoar* pode atingir 75 cm de comprimento. Nos machos mais velhos, os cornos fazem uma curva em semicírculo e são planos nos lados, tendo os bordos anteriores e posteriores afiados. Os cornos das fêmeas são mais pequenos e simples, ou seja, são planos e quase paralelos, de arco simples e fortemente curvados para trás (GONZÁLEZ, 1986).

Com o intuito de clarificar a sistemática e a história evolutiva do género *Capra*, MANCEAU *et al.* (1999) analisaram sequências de mtDNA, obtendo amostras tanto a partir de animais vivos como de animais mortos. Conforme os casos, o mtDNA foi extraído de órgãos, sangue ou ossos. As conclusões a que estes autores chegaram serviram para reformar a ideia de MASON (1984), segundo a qual a domesticação da cabra teve lugar no “Crescente Fértil”, a partir da *Capra aegagrus*. Quanto à questão das cabras selvagens de “Chiltan”, estes autores sugerem que estes animais são um *markhor* ou um produto do cruzamento entre uma cabra selvagem e um *markhor*, uma vez que a hibridização pode ocorrer entre espécies selvagens (COUTURIER, 1962 e COBERT, 1978). Também é defendida a existência de dois grupos taxonômicos no Cáucaso, um no Leste e outro no Oeste, rejeitando-se assim a hipótese de COUTURIER (1962), segundo a qual existe apenas um grupo taxonômico no Cáucaso. Em relação às raças Europeias, verificou-se existirem distâncias genéticas muito pequenas, ou seja, comparáveis às encontradas entre subespécies de ungulados, o que não está de acordo com alguns dados paleontológicos (CRÉGUT-BONNOURE, 1992), que admitem duas migrações independentes de cabras selvagens, ou seja, a da Alpina *ibex* (*C. i. ibex*), há 300.000 anos atrás, seguida da

Espanhola ibex do Cáucaso (*C. pyrenaica*), há 80.000 anos atrás. Assim, é avançada a ideia de apenas ter havido uma onda de imigração da *Capra* na Europa, seguida de uma especificação vicariante das duas espécies Europeias (MANUCEAU *et al.*, 1999). Por fim, há que referir que estes últimos autores defendem a ideia de que a *C. i. ibex* e a *C. i. nubiana* devem ser consideradas como espécies separadas.

Em 1971, EPSTEIN descreve o *bezoar* como *Capra hircus* e, em 1978, COBERT admite a existência de cinco subespécies da cabra *bezoar*. Segundo MANUCEAU *et al.* (1999), várias subespécies estão definidas em cada *Capra* sp., baseando-se estas apenas nas variações das formas dos cornos, o que as tornam particularmente controversas.

A evidência mais antiga da domesticação dos caprinos vem da área de distribuição do *bezoar*, mais especificamente do Irão, e data do 9º milénio A.C. (HEMMER, 1991). A partir do Sudoeste Asiático, as tribos nómadas terão promovido a expansão destes animais pelos continentes Africano e Europeu (HEMMER, 1991). Os caprinos adaptam-se com facilidade a diferentes e rigorosos ecossistemas, como por exemplo os das regiões semi-desérticas, e podem alimentar-se de espécies vegetais ricas em fibras e de pequeno valor nutritivo (HEMMER, 1991). Este tipo de comportamento ingestivo da cabra domesticada é muito semelhante ao dos seus antepassados selvagens. Segundo LUIKART *et al.* (2001), esta capacidade de adaptação, para além da facilidade de transporte, devido ao facto destes animais serem de pequeno porte, levou a que a cabra domesticada se difundisse rapidamente por todo o mundo, acompanhando os movimentos migratórios e exploratórios dos humanos e servindo muitas vezes de objecto comercial. Segundo estes mesmos autores, de entre os vários ruminantes domesticados, a cabra foi a mais transportada e aquela cuja difusão por todo o globo teve maior sucesso. Tudo isto poderá justificar, na opinião de LUIKART *et al.* (2001), a fraca filogeografia encontrada para esta espécie em estudos de mtDNA, comparativamente a outras espécies.

Pelo que foi anteriormente referido, acreditamos poder afirmar que subsistem ainda várias dúvidas quanto à origem das cabras domesticadas e que este é um assunto longe de estar encerrado.

### 3.2 - DISTRIBUIÇÃO E ESTADO ACTUAL DA CABRA SELVAGEM (*Capra aegagrus*)

A cabra selvagem “Cretan ou Bezoar”, *Capra aegagrus* crética, é o ancestral da cabra domesticada: *Capra hircus* (CLUTTON-BROCK, 1981). Apesar de terem já sido descritas

numerosas sub-espécies, tanto a taxonomia das sub-espécies como a da cabra selvagem, para além da de outros *Caprinae*, continuam abertas a discussão e a merecerem novos estudos. As cabras selvagens habitam as montanhas com bosques frondosos e actualmente encontram-se sob a forma de populações fragmentadas desde Creta, passando pelo Este da Turquia e do Irão, até ao Sudoeste do Paquistão. O seu limite a Norte são as montanhas do Cáucaso, na Geórgia, Daguestão, Azerbaijão e Arménia e os montes *kopet Dag* do Turquemenistão.

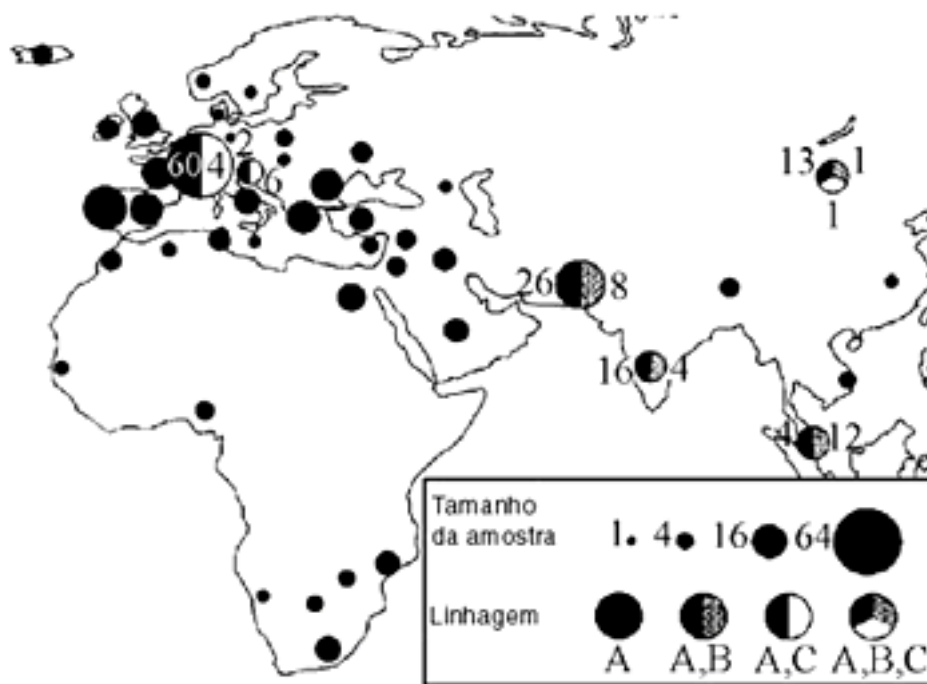


FIGURA 2 – Distribuição geográfica da amostragem e das linhas maternas de mtDNA. O tamanho de cada círculo é proporcional ao tamanho da amostra (1 a 64) recolhido num total de 44 países. A presença de cada linha num determinado país é representada por diferentes cores: preto – linha A, “cinzento” – linha B e branco – linha C. Assim, a linha B asiática pode ser encontrada no Paquistão, Índia, Malásia e Mongólia. No mapa, o número ao lado de cada círculo representa o número de indivíduos de cada linha (LUIKART *et al.*, 2001).

Num passado recente, estas cabras encontravam-se também no Líbano e na Síria. Hoje, estas populações isoladas desapareceram. O seu estado no Iraque é desconhecido. Algumas das pequenas e isoladas populações dos locais supra-citados foram classificadas como vulneráveis ou em perigo, à excepção da população da Turquia. Maioritariamente, estas populações encontram-se em zonas protegidas. As ameaças mais sérias provêm da

caça furtiva e do desaparecimento do seu habitat natural, devido à concorrência pelos recursos alimentares por parte do gado domesticado. Na Grécia, outro problema que se põe é o cruzamento com as cabras domesticadas, restando apenas uma população verdadeiramente selvagem na ilha de Creta e em Theodorus (SCHERF, 1977). Recentemente, LUIKART *et al.* (2001), num estudo de sequenciação de um segmento hipervariável (481bp) de mtDNA, referente a 406 cabras, representando 88 raças do “Mundo Antigo”, concluiu existirem três linhas maternas separadas e altamente divergentes, às quais chamou: *Capra hircus* A, *Capra hircus* B e *Capra hircus* C. Estes autores defendem igualmente a existência de diferentes locais e épocas de domesticação para estes animais. A *Capra hircus* A expandiu-se por quase todo o globo, a *Capra hircus* B encontra-se somente no Leste e no Sul da Ásia (Mongólia, Paquistão, Índia e Malásia) e a *Capra hircus* C é representada por um pequeno número de raças europeias e da Mongólia (Figura 2).

### 3.3 - SITUAÇÃO NA ESCALA ZOOLOGICA DA CABRA DOMESTICADA

Segundo YOUNG (1977) e GARCÍA-PEREA e GISBERT (1997), a cabra domesticada situa-se na escala zoológica da seguinte forma:

- Classe: Mammalia
- Sub-classe: Theria
- Infra-classe: Eutheria
- Coorte: Ferungulata
- Super-ordem: Praxonia
- Ordem: Artiodactyla
- Sub-ordem: Ruminantia
- Infra-ordem: Pércora
- Família: Bovidae
- Sub-família: Caprinae
- Género: *Capra*
- Espécie: *Capra hircus* (Linnaeus, 1758).

### 3.4 - DESCRIÇÃO E ORIGEM DAS RAÇAS AUTÓCTONES E EXÓTICAS ESTUDADAS

Antes de descrever cada raça autóctone nacional e respectiva história, vamos recuar um pouco no tempo e auscultar o que se passava em Portugal antes da atribuição do estatuto de raça, às actuais cinco raças autóctones caprinas.

Tal como foi anteriormente referido, a origem dos caprinos é muito discutível, tendo cada autor a sua opinião. Porém, parece que a maioria dos autores aceita a existência de três troncos: o asiático, o europeu e o africano (RECENSEAMENTO GERAL DOS GADOS, 1870; MIRANDA do VALE, 1949 e SÁ, 1982). Do tronco europeu, a *Capra aegagrus* ou “bezoar” é considerada, por muitos autores, como o único ascendente da cabra domesticada. Outros autores interpõem, entre a *Capra aegagrus* e as cabras actuais, duas formas primitivas da cabra doméstica: a *Capra hircus* ou cabra palustre e a *Capra hircus* Kelleri ou cabra do cobre (MIRANDA do VALE, 1949).

Com o passar dos tempos e devido às ondas migratórias das cabras selvagens, através das cadeias montanhosas, estas cabras foram sucedidas na Península Ibérica pela *Capra pyrenaica* ou cabra dos Pirinéus, pertencente ao tronco europeu, antecessora directa das raças caprinas portuguesas e espanholas (CALHEIROS, 1981). FRAZÃO (1981), baseando-se na ordenação de APARÍCIO (1944), apresenta a origem de algumas raças portuguesas da forma discriminada no Quadro V.

QUADRO V – Origem de algumas raças portuguesas (FRAZÃO, 1981)

Pré-histórica	Tronco originário	Formas secundárias	Raças actuais
<i>C. prisca</i>	Grupo Asiático	Mediterrânea	Raça Serrana, Espanhola ou Celtibérica
<i>C. aegragus</i>	Grupo Europeu	Alpina	Raça Algarvia
		Pirenaica	Raça Pirenaica
			Raça das mesetas

Neste enquadramento não se inclui a cabra Charnequeira, uma vez que se pensa descender da *Capra falconeri* ou sua representante na Europa: a “cabra Palustre” de Rutimeyeri, *Capra hircus sterpsicerus* ou “céltica”. Na raça das mesetas enquadra-se a população raiana ou serpentina. A chamada cabra da Serra da Estrela pertenceria à raça

pirenaica (FRAZÃO, 1981). Em nosso entender, esta não seria uma classificação muito correcta, uma vez que existem fortes evidências da não existência da *Capra prisca*.

Assumindo uma visão mais simplista da origem das raças portuguesas, sabe-se que na região do Gerês existiu uma espécie selvagem – a *Capra lusitanica* –, denominada de “Bocage”, em homenagem a Barbosa *du* Bocage, que em 1914 a descreveu (TIERNO, 1993). Desta forma, a *Capra lusitania* poderá apresentar-se como parente mais próxima das actuais raças autóctone portuguesas (TIERNO, 1933 e FONSECA, 1989). Mais recentemente, CALDAS (1991) refere-se a estas cabras como “as últimas do Gerês”, reportando-se a um livro intitulado “Caça”, publicado em Lisboa, no ano de 1900, por um autor anónimo, o qual descreve a extinção desta raça em caçadas. Também MIRANDA DO VALE (1949) refere a extinção da *Capra lusitania*, como resultado dos progressos silvícolas da região e às batidas dos caçadores.

No nosso entender, em Portugal, o panorama étnico dos caprinos domesticados é ainda caracterizado por uma grande heterogeneidade das populações. Esta reflecte a influência de origens étnicas que se perderam na memória dos tempos, anteriores à fundação da nacionalidade portuguesa (FONSECA, 1988). Contudo, desta heterogeneidade e por diferentes condicionalismos como o relevo, a adaptação aos recursos alimentares e às condições climáticas e a manutenção de alguns animais em populações mais ou menos fechadas, deu origem a populações com características bem definidas, às quais se atribui actualmente o estatuto de raças. Assim, já em 1873, no recenseamento geral dos gados, se fazia referência a duas populações caprinas, uma de pêlo curto e outra de pêlo comprido, com distribuições geográficas distintas. Mais tarde, em 1926, ORTIGÓSA afirmava que os Zootecnistas portugueses classificavam a população caprina nos seguintes agrupamentos pecuários: a Serra da Estrela, com as “variedades” Jarmelo e Saloia e a Charnequeira ou Serrana, com as “variedades” Barrosã, Ribatejana e Alentejana. Segundo este mesmo autor, o primeiro grupo caracterizava-se por possuir: pêlo comprido, corpo avantajado, úbere grande e boa produção leiteira. A cabra Saloia, que vivia estabulada em mais de metade da península de Lisboa e mesmo no aro suburbano desta cidade, constituía a fonte de quase todo o leite consumido pela população citadina de Lisboa (TIERNO, 1933). O segundo grupo caracterizava-se por possuir: pêlo raso, corpo pouco volumoso e úbere pouco desenvolvido.

No final dos anos trinta, COSTA JÚNIOR refere a existência de duas populações caprinas que considerava serem sub-raças da raça dos Pirinéus, atribuindo-lhes o nome de cabras Serranas ou da Serra da Estrela e Charnequeira. ORTIGÓSA (1926) atribuía a estas

mesmas populações a designação de “variedades”. Nos anos cinquenta distinguiam-se claramente duas populações, graças às respectivas características morfo-funcionais: a raça Serrana e a raça Charnequeira (BARRETO MAGRO, 1959). Estas duas populações mantiveram-se mais ou menos nas mesmas proporções, até aos anos setenta. Os restantes caprinos faziam parte de populações de animais mestiços, derivados sobretudo do tronco Charnequeiro, havendo que destacar as variedades: Raiana ou Serpentina e Algarvia (CALHEIROS, 1981). Nos anos oitenta, admitiu-se a existência de quatro raças nacionais morfologicamente bem caracterizadas: a Serrana, a Raiana ou Serpentina, a Charnequeira e a Algarvia (FONSECA, 1984). A partir 1987, passaram a ser reconhecidas cinco raças autóctones, havendo que acrescentar às anteriormente mencionadas a raça Bravia.

### **3.4.1 - RAÇAS AUTÓCTONES E EXÓTICAS CAPRINAS**

Todos os dados a seguir apresentados, relativamente às raças autóctones caprinas, foram retirados das publicações da DGP (1978) e da SOCIEDADE PORTUGUESA DE OVINOTECNIA E CAPRINOTECNIA (2002).

#### **3.4.1.1 - BRAVIA**

Foi-lhe atribuída esta designação ou outras como Brava ou Cabra da Serra, devido ao domínio selvagem em que é criada.

Este agrupamento racial esteve incluído na raça Charnequeira, ao qual se atribuiu a mesma origem filogenética. Ambas as raças podem ter tido uma origem comum, mas as condições geoclimáticas, socioeconómicas e culturais muito diferentes, para lá de outras interferências, foram determinantes para moldar animais com atributos zootécnicos distintos.

As cabras da raça Bravia são mantidas em pastoreio de montanha, formando grandes rebanhos, pertença dos vários moradores de determinado povoado, que as guardam à vez, de acordo com o número de cabeças que possuem. O maneio deste tipo de raça assenta num sistema extensivo, pelo que os produtores contam, em geral, com grandes áreas de baldio, com uma constituição florística de pastagem natural e de mato. Actualmente, esta raça é representada por 7.800 animais inscritos no livro genealógico (MATOS, 2000, comunicação pessoal), disseminados pelas seguintes zonas geográficas: Arcos de Valdevez, Ponte da Barca, Terras de Bouro, Ribeira de Pena, Vila Real, Vila Pouca de

Aguiar e Mondim de Bastos. Algumas destas zonas encontram-se inseridas em Parques Naturais, nomeadamente no da Peneda Gerês e no do Alvão.

Os animais desta raça caracterizam-se pelo seu pequeno porte, grande agilidade e pela sua pelagem curta, a qual tem como cor predominante o castanho, havendo também animais de cor preta, com diversas manchas em vários tons de castanho. O pêlo é curto e quase erecto, apresentando, em geral, o bode pêlo mais longo e mais áspero do que o das fêmeas. As “barbichas” estão presentes em todos os machos e em algumas fêmeas. A cabeça é triangular, com chanfro curto e largo. As orelhas, em ambos os sexos, apresentam-se curtas, pontiagudas e bem levantadas. Os cornos das fêmeas são finos e erectos, com uma ligeira curvatura para trás. Os machos têm os cornos com uma ligeira espiral para fora e para cima. O pescoço é comprido, fino e bem ligado. Geralmente, o tronco destes animais é pouco desenvolvido, com uma linha dorso-lombar recta e uma garupa descaída. Os membros são curtos e finos, com articulações bem salientes, unhas resistentes e aprumos moldados para trepar e saltar.

O caprino da raça Bravia, encontra-se muito bem adaptado ao meio ambiente em que se insere, tornando-o um animal insubstituível. É explorado essencialmente para carne. O seu peso varia entre 35-50 kg, nos machos, e 25-40 kg, nas fêmeas. Tem como produtos certificados o cabrito do Barroso e o cabrito das Terras Altas do Minho.

Geralmente, o(s) bode(s) acompanha(m) sempre as cabras e, como normalmente não se procede a qualquer tipo de controlo da actividade reprodutiva, os partos produzem-se ao longo de quase todo o ano, com particular incidência no Outono e na Primavera. Nos poucos rebanhos em que o criador controla as épocas de parto, estes ocorrem de forma a que os cabritos possam ser vendidos nas épocas do Natal e da Páscoa.

Esta cabra tem desempenhado um importante papel na economia das populações das serranias mais inóspitas do Minho e confinantes de Trás-os-Montes. Normalmente, as explorações em que inserem são de cariz familiar, em que todos os elementos têm um papel relevante na actividade.

#### 3.4.1.2 - SERRANA

Actualmente, é a raça com maior expressão em Portugal. Originária da Serra da Estrela, predomina a Norte do Tejo, com excepção do distrito de Castelo Branco e da península de Setúbal. A sua origem não foi ainda bem determinada, mas pode considerar-se derivada do tronco Pirenaico, tipo *aegagrus*, de origem europeia. No ano 2000, havia

23.000 animais inscritos no livro genealógico, distribuídos por 300 criadores. São explorados em regime extensivo, formando efectivos de pequena dimensão (40-70 animais). Destinam-se, principalmente, à exploração da função leiteira, mas também à da função carne.

A cabra Serrana é de cor preta, castanha ou ruça, podendo apresentar coloração amarela nas regiões superiores do abdómen, nos membros, no focinho, na face, nas arcadas orbitarias e nas orelhas. A cabeça é média, com fronte ampla e ligeiramente abaulada, possui face triangular, chanfro largo, rectilíneo e com uma depressão na união frontal. As orelhas são curtas e o focinho fino. Os cornos são de secção triangular, rugosos, dirigidos para trás, paralelos ou divergentes, existindo bastantes indivíduos mochos. O pescoço é comprido, mal musculado, de bordos rectilíneos e geralmente com brincos. O tronco é de corpulência média. A linha dorso-lombar é oblíqua de trás para a frente, o dorso e os rins são descarnados, mas rectilíneos e a garupa é descaída. Possuem cauda curta e arrebitada. Os membros são finos e resistentes, com unhas pequenas e muito duras.

Nesta raça podem distinguir-se 4 ecótipos, resultante das diferenças do meio em que vivem:

- Jarmelista: Guarda, Pinhel, Almeida e Sabugal.
- Da Serra: Guarda, Manteigas e Covilhã (praticamente extinta).
- Ribatejana: Ribatejo, estendendo-se para Oeste.
- Transmontana: Trás-os-Montes.

Esta raça tem vários produtos certificados, como: o queijo de cabra Transmontano, o cabrito Transmontano, o cabrito do Barroso, o cabrito das terras Altas do Minho, o cabrito da Beira e o cabrito da Gralheira.

Os partos são programados em função da época em que o pasto abunda e quando existe melhor mercado para a colocação destes produtos. O índice de prolificidade é de cerca de 170 a 180%. O cabrito, regra geral, é vendido aos 30-40 dias de idade, com o peso vivo de 6-8 kg.

Embora a cabra Serrana seja utilizada fundamentalmente pela sua aptidão leiteira, a sua produção leiteira varia em função da zona do país onde é explorada. A ordenha é feita maioritariamente à mão, podendo-se encontrar algumas cabras com produções de 600 litros, em mais de 210 dias de ordenha. O leite destina-se ao consumo directo e ao fabrico de queijo, caseiro ou industrial.

### 3.4.1.3 - CHARNEQUEIRA

Esta raça parece proceder da cabra *aegagrus*, tendo mais tarde recebido influência do tronco Pirenaico. Porém, relativamente a este ponto existem outras opiniões, que dizem ser a Charnequeira descendente da cabra *falconeri* ou da sua representante na Europa, a cabra palustre de Reitimageri, *Capra hircus sterspicerus* ou Céltica de Augusto. O nome de Charnequeira resulta do facto da maior parte destes animais ser explorado na “Charneca”.

Os animais desta raça possuem uma cor vermelha, do claro (trigueiro) ao retinto (mogno). A cabeça é média, de perfil rectilíneo ou subcôncavo, de frente convexa, seguida de uma pequena depressão, de chanfro rectilíneo e de orelhas pouco destacadas, direitas e de comprimento médio. Os animais são mochos ou possuem cornos, grandes, largos e juntos na base, dirigidos para cima, ligeiramente inclinados para trás, divergentes e retorcidos nas pontas ou nitidamente espiralados, em saca-rolhas, rugosos e de secção triangular; barba frequente nos bodes e rara nas fêmeas. O pescoço é comprido e estreito, quase sempre com brincos. O tronco é amplo, com peito estreito e profundo. Cruz pouco destacada, linha dorsolombar quase direita, ligeiramente descaída para a frente e garupa descaída. A cauda é curta, horizontal e arrebizada na ponta; abdómen bem desenvolvido. O úbere é ensacado e pendente ou globoso, de regular desenvolvimento. Os tetos são destacados e de tamanho médio. Os membros são fortes, curtos, com aprumos regulares e unhas resistentes.

Nesta raça distinguem-se dois ecótipos: um, que é explorado no Baixo Alentejo (nos concelhos de Santiago do Cacém, Sines e Odemira), denominado de cabra alentejana ou machuna e o outro, no Alto Alentejo (Nisa e Castelo de Vide) e na Beira Baixa (Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Penamacor e Vila Velha de Ródão), denominado de cabra beiroa, esta mais corpulenta do que a anterior e melhor produtora de leite.

Grande capacidade de adaptação a meios adversos, boa vocação creatopoética e razoável vocação leiteira. Esta raça tem como produto certificado o cabrito da Beira.

As cobrições são realizadas em duas épocas – Primavera e Outono. A produção de carne obtém-se, a partir do cabrito com 45 dias de idade, ou com 3 a 6 meses, com os pesos de 8-10 kg e de 20-30 kg, respectivamente.

Em 1998, encontravam-se 5.200 animais inscritos no livro genealógico, distribuídos por 88 criadores. No Sul do país, os rebanhos são constituídos, geralmente, por 150 a 250 animais, conduzidos por pastores contratados, enquanto que no Norte as cabradas são de menor dimensão – 10 a 50 animais – mantidos pelos respectivos donos.

#### 3.4.1.4 - SERPENTINA

A sua origem filogénica não é conhecida, mas pensa-se que resulta de animais provenientes de Espanha, posteriormente seleccionados até atingirem o aspecto actual. Pensa-se que a região de Serpa foi o ponto de partida para a sua difusão por todo o Alentejo. A sua denominação tem sofrido algumas alterações de acordo com as deslocações e a expansão ocorridas. Como os primeiros efectivos eram originários de Espanha, foi-lhe inicialmente dada a denominada de Espanhola ou Castelhana. Posteriormente, por se ter fixado junto à fronteira, passou a ser mais conhecida por raiana e finalmente, dado que os seus efectivos se multiplicaram predominantemente na Serra de Serpa, passou a ser conhecida por Cabra Serpentina.

A cabra Serpentina tem uma cor branca ou creme, com um listão preto no dorso. O ventre é preto, assim como a parte interna das orelhas, o focinho e as extremidades dos membros. A cabeça é do tipo longilíneo. A fronte é larga e ligeiramente convexa. O chanfro é rectilíneo. As orelhas são grandes e semipendentes. A barba existe nos dois sexos, mas é mais reduzida nas fêmeas. Os cornos são largos e juntos na base, dirigidos para cima e para trás, divergentes nas extremidades e, sensivelmente, espiralados. O pescoço é médio e bem musculado, tendo grande desenvolvimento no terço anterior. Os brincos são frequentes em ambos os sexos. O tronco é bem desenvolvido. A cruz é ligeiramente destacada, com a linha dorsolumbar quase horizontal. A garupa é curta e descaída. A cauda é curta e erecta, com inserção alta. O úbere é de tamanho médio, em forma de bolsa, com tetos bem diferenciados e de tamanho variado. Os membros são fortes, compridos e com articulações volumosas e secas. As unhas são de tamanho médio, duras, com boa base de apoio.

Esta raça é explorada em sistema extensivo, em terrenos bastante pobres e com fortes insolações. Porém, pode dizer-se que se encontra muito bem adaptada ao meio. É explorada nas vertentes de carne e de leite, embora a produção de carne seja a mais importante.

O período de cobrição inicia-se em Maio-Junho e dura, em geral, até ao começo das primeiras parições. O primeiro parto verifica-se, aproximadamente, aos 14-15 meses de idade. Os cabritos são normalmente desmamados por volta dos 3 a 4 meses de idade, altura em que são vendidos. Caso se faça a ordenha, os cabritos são vendidos mais cedo, por volta dos 1,5 a 2 meses de idade. A ordenha é geralmente feita à mão e só tem início após o desmame dos cabritos, durante cerca de 4 a 6 meses.

Em 1991, com a homologação do respectivo regulamento, foi instituído o Registo Zootécnico da raça Caprina Serpentina.

Em 1999, encontravam-se inscritos no livro genealógico 4.000 animais, distribuídos por 35 criadores. O tamanho médio das cabradas era de 100 a 200 animais.

#### 3.4.1.5 - ALGARVIA

A raça Algarvia deve o seu nome ao facto de ter o seu berço no Algarve. A origem filogenética da raça Algarvia é desconhecida, embora se suspeite que resulte da raça Charnequeira e da infiltração de genes de cabras exóticas que aumentaram o seu potencial leiteiro e contribuíram para a sua pelagem característica. Assim, Marcelino Sobral pensa que esta se formou a partir da cabra Charnequeira Algarvia e da Alpina Espanhola, tendo herdado desta a pelagem policromada e o grande potencial leiteiro. SIMPLÍCIO BARRETO MAGRO refere que são animais provenientes do cruzamento da Charnequeira do Algarve com animais importados de Marrocos há mais de um século e que teriam recebido, mais recentemente, a influência da cabra Serrana Andaluza e muito provavelmente da raça Alpina Espanhola.

Os caprinos da raça Algarvia apresentam uma cor branca, com pêlos castanhos de vários tons ou pretos, que podem agrupar-se em manchas ou disseminar-se irregularmente por todo o corpo. A cabeça é de dimensão regular e forma triangular, com o chanfro rectilíneo ou ligeiramente côncavo. As orelhas são de quatro tipos diferentes: compridas, abertas e pendentes; médias, em “corneto” e lançadas para fora; curtas, em “corneto” e direitas (orelha turca) e muito curtas, com cerca de 3 a 4 cm de comprimento e erectas (orelha rata). Em ambos os sexos, os cornos são geralmente largos na base, dirigidos para cima, um pouco para trás, divergentes para os lados e espiralados, podendo apresentar armações em forma de sabre ou intermediários entre os tipos *prisca* e *aegargrus*. Por vezes, aparecem animais mochos. O pescoço é de regular comprimento, bem musculado e com boa inserção. O tronco é bem desenvolvido, com abdómen volumoso, linha dorsal quase horizontal, garupa descaída e cauda pequena. O úbere é formado por mamas cónicas, pendentes, com tetos pouco destacados e paralelos ou então por mamas globosas, com tetos destacados e dirigidos para a frente e para fora. Os membros são fortes e aprumados.

Esta raça encontra-se muito bem adaptada a zonas pobres como as que podemos encontrar na Serra e Barrocal do Algarve. Basicamente, esta raça é explorada na aptidão leiteira.

Embora a cobrição se possa verificar em qualquer época do ano, a maior concentração dos partos verifica-se na segunda quinzena de Setembro ou em Outubro, podendo ainda existir uma outra concentração de partos de Dezembro a fins de Fevereiro, se o mercado do cabrito assim o exigir. Esta produção relaciona-se, sobretudo, com o cabrito que é vendido com cerca de 45 a 60 dias, com um peso vivo de 7 a 10 kg ou com o cabrito que é vendido ao desmame, com 16 a 19 kg. A ordenha é normalmente feita à mão e só tem início após o desmame dos cabritos. As produções são muito variáveis e o período de ordenha vai de 212 a 275 dias.

Esta raça predomina nas zonas do Barrocal e da Serra Algarvia. No Litoral algarvio existe também um efectivo relativamente importante. No Sotavento, concentra-se mais de 75% do efectivo da raça Algarvia.

Em 1999, encontravam-se inscritos no livro genealógico 5.000 animais Algarvios, distribuídos por 110 criadores. Os efectivos são de pequena dimensão (6 a 50 animais por exploração).

### **3.4.2 - RAÇAS EXÓTICAS**

#### **3.4.2.1 - SAANEN**

Esta cabra é originária do vale de Saanen, no cantão de Berna, Suíça.

Os caprinos Saanen apresentam uma cor branca ou ligeiramente pérola. A cabeça é bem proporcionada, cónica, alongada e fina. A fonte é larga e bem desenvolvida. As orelhas são finas e delicadas. Não devem ter cornos. Nas fêmeas, o pescoço é delgado e longo, enquanto que nos machos é forte e provido de pêlos mais compridos e grossos.

O peito é regularmente saliente e amplo. O dorso é recto. O lombo bem desenvolvido. O tórax, com costelas bem arqueadas, é grande perímetro. O ventre é amplo e profundo. As ancas são bem separadas e apresentam uma boa largura. A garupa é um pouco inclinada e larga. O úbere é grande, bem conformado, flexível e de fina textura. Os tetos são simétricos, de tamanho médio, apontados para baixo e ligeiramente para diante, bem implantados e separados. Os membros são fortes, delicados, com comprimentos médios e bem apurados. Os cascos são de preferência amarelos.

A aptidão destas cabras é essencialmente leiteira, obtendo-se por lactação, em média, 600 a 900 litros por ano.

A Saanen tem sido exportada para diferentes países do mundo, representando assim uma das raças mais difundidas a nível mundial. Na Europa é muito apreciada. Está bem

aclimatada às condições ambientais da Alemanha, Holanda e Inglaterra. No Brasil, a Saanen também teve uma boa adaptação. Em Portugal existem algumas cabradas, mas sem expressão significativa.

#### 3.4.2.2 - ALPINA

A cabra Alpina é originária dos Alpes.

Estes animais possuem uma cor policromática, com madeixas, por vezes múltiplas sobre o mesmo indivíduo e fortemente estriadas em todos os tons, de negro, cinzento, castanho-de-fulvo e mesmo castanho-lilás. O pêlo é curto. A cabeça é fina. A fronte é larga e o chanfro é ligeiramente grosso acima da arcada superciliar. Os olhos são castanhos-claros, bem abertos. As orelhas, em forma de corneta, são rectas e de comprimento médio. O pescoço é delgado e longo. O tronco é alongado e o abdómen bem desenvolvido. O úbere é bem implantado, com tetos bem proporcionados. Os membros são fortes, delicados, com articulações secas, comprimentos médios e bem apumados. Os cascos são preferencialmente amarelos.

A aptidão destas cabras é essencialmente leiteira, podendo chegar a produzir 8 litros por dia.

A raça Alpina encontra-se particularmente radicada na metade Sul de França, embora tenha vindo a ser exportada para vários países. Em Portugal existem algumas cabradas.

### 3.5 - BREVE REFERÊNCIA À EVOLUÇÃO DA CAPRINICULTURA PORTUGUESA

Ao longo dos tempos, o efectivo caprino nacional sofreu várias flutuações. Pelo arrolamento de 1870, o efectivo caprino nacional era composto por 936.869 indivíduos, sendo o número de possuidores de 50.688. O número de caprinos por 1.000 habitantes era de 245. Contudo, estes números não podem ser considerados totalmente rigorosos, dadas as omissões feitas pelos possuidores. Em 1920, um novo arrolamento indicava a existência de um efectivo nacional de caprinos de 1.492.689 cabeças, sendo o número de possuidores de 149.802, o que leva a uma relação por 1.000 habitantes de 246. Verificou-se assim um aumento do efectivo nacional. Assim, pelo menos aparentemente, a guerra que grassava nessa altura no país não afectou significativamente o número de caprinos explorados. O arrolamento de 1925 foi o menos elucidativo, tendo sido recenseadas 1.557.173 cabeças, sem se indicar o número de possuidores. A relação indicada por 1.000 habitantes foi de 274.

Em 1934, são manifestados, por 180.289 possuidores, 1.256.881 caprinos, o que revela uma diminuição em 300.292 cabeças do efectivo caprino nacional, sendo a relação por 1.000 habitantes de 188. Em 1940, o número de possuidores aumentou para 216.364 e o efectivo caprino era então de 1.196.232, ou seja, de menos 60.649 cabeças. O índice por 1.000 habitantes era agora de 166 cabeças.

Nos dois arrolamentos seguintes, realizados em 1955 e 1972, o número de caprinos reduziu-se drasticamente para, respectivamente, 707.107 e 741.023 (CALHEIROS, 1981). Segundo este autor, esta diminuição resultou do surto de florestação que afectou o país e que contribuiu para o desaparecimento de grandes áreas de baldios. Outras medidas, nomeadamente as sanitárias impostas pela brucelose, que implicaram o abate de animais infectados e a proibição do consumo de queijo fresco, tiveram igualmente um impacto negativo sobre esta espécie. Algumas Câmaras Municipais promulgaram mesmo posturas contrariando a exploração de caprinos. Por outro lado, a intensificação que se vinha processando na agricultura e o apoio estatal dado à bovinicultura, desviando a atenção dos agricultores e a inerente utilização dos terrenos para outros meios de produção que não a sua utilização pelos pequenos ruminantes, em geral, também contribuiu e muito para uma desmotivação da caprinicultura. Todavia, os principais motivos da diminuição do efectivo caprino nacional parecem ter estado relacionados com a crise de mão-de-obra, motivada pela imigração, e com o desajustamento que persiste entre os sistemas tradicionais de exploração e as ambições sociais dos pastores (CALHEIROS, 1981).

QUADRO VI – Efectivos caprinos (número de fêmeas) em 1990 e 2000 e sua distribuição geográfica em Portugal (unidade: 1.000 cabeças) (INE, 2000)

Região	Ano	
	1999	2000
Norte	128	116
Centro	210	163
Lisboa e Vale do Tejo	74	41
Alentejo	124	100
Algarve	18	19
Açores	6	7
Madeira	10	7
Total	570	453

Segundo dados do Instituto Nacional de estatística (INE), em 1998 existiam 561 mil cabras no país, tendo-se verificado um decréscimo de 9% no efectivo nacional, entre 1990 e 1998. Existem 5 raças autóctones, cujos censos representam apenas 7,8% do efectivo caprino nacional. A produção de carne era então de 2.863 toneladas, sendo o consumo de carne de caprino de 3,7 kg/habitante/ano. A produção de queijo foi de 1.713 toneladas. Em termos de comércio internacional, o balanço entre exportações e importações revelou-se extremamente deficitário para Portugal (MATOS, 2000).

Dados mais recentes revelam que nos últimos dez anos, o efectivo caprino tem diminuído a uma taxa de 12570 fêmeas /ano. As regiões Norte, Centro e Alentejo, embora possuam os efectivos mais números, também foram as que registraram um maior decréscimo Quadro VI. A principal razão apontada para este facto é a dificuldade de arranjar mão-de-obra especializada, já que as condições em que estes animais são criados se revelam muito precárias (MATOS e POTES, 2003). Esta diminuição dos efectivos levou a uma conseqüente queda na produção de carne e leite que no ano de 2000 foram respectivamente de 2105 e 1422 toneladas (INE, 2000).

QUADRO VII – Principais características das raças autóctones portuguesas caprinas (número de fêmeas inscritas no Registo Zootécnico (RZ) ou Livro Genealógico (LG), número de criadores, dimensão média dos efectivos e distribuição geográfica

Raça	Efectivos inscritos RZ ou LG (nº de criadores)	Dimensões médias dos efectivos	Distribuição geográfica
Serrana	20.500 (325)	Pequena	Norte e Centro
Bravia	7.800 (120)	Grande	Norte
Charnequeira	6.400 (88)	10 a 50 fêmeas 100 a 150 fêmeas	Centro Alentejo
Serpentina	4.000 (35)	100-200 fêmeas	Alentejo
Algarvia	5.000 (110)	Pequena	Algarve

Por fim e de uma forma mais pormenorizada apresentam-se algumas características das raças autóctones portuguesas caprinas (Quadro VII). Após a adesão de Portugal à União Europeia em 1986 juntamente com o esforço das Associações de Criadores levou a que se definisse e criasse vários produtos tradicionais. Destes destacam-se: o cabrito

Transmontano (DOP; Denominação de Origem Protegida), o cabrito do Barroso (IGP; Indicação Geográfica Protegida), o cabrito das Terras Altas do Minho (IGP), o cabrito da Beira (IGP) e o da Gralheira (IGP). Relativamente aos queijos, apenas o transmontano se encontra com DOP.

O consumo de carne de caprino *per capita*, tal como em 1998, no ano de 2000 continuou a ser de 3,7 kg/habitante/ano. No ano de 2000, não houve exportações, sendo importadas 10 toneladas de carne (INE, 2000).

Em relação ao número de animais, por raça, verificamos que de acordo com a FAO (1992) possuímos duas raças em estado vulnerável, duas em estado raro e apenas uma se encontra fora de perigo de extinção.



## 4 – MARCADORES

A variabilidade genética é o material base do “seleccionador de animais”. Esta é utilizada para moldar as espécies de interesse zootécnico, de acordo com as preferências e necessidades do consumidor, sendo ainda a base da evolução de todas as espécies. Desde muito cedo, o homem tentou quantificar esta variabilidade para a poder utilizar, de várias formas, em seu proveito. No início, esta missão parecia quase impossível, tendo vindo a aclarar-se à medida que os anos passaram e novas descobertas foram realizadas, principalmente no campo dos marcadores genéticos. Estes marcadores abriram um novo capítulo na avaliação e conservação dos recursos genéticos (HAIG, 1998). Assim com uma maior clareza foi possível fornecer informação sobre questões de variabilidade, relacionamento ou discriminação de indivíduos numa população, das diferentes relações entre populações e diferenças entre raças e espécies (HAIG, 1998). Estes marcadores podem ainda ser utilizados no controlo de parentesco, na procura de regiões implicadas em determinados caracteres produtivos *Quantitative Trait Loci* (QTLs) (GEORGES *et al.*, 1995; SPLELMAN *et al.*, 1996 e DIEZ-TÁSCON, 2001), para além de poderem vir a ser implementados em esquemas de cobrição utilizando a selecção assistida por marcadores (MAS) (ASHWELL *et al.*, 1996; SPELMAN e BOVENHUIS, 1997; DODGSON *et al.*, 1997 e CULLIS, 2002).

### 4.1 – MARCADORES MORFOLÓGICOS

Hoje, sabemos que só parte da variabilidade genética se expressa em termos de fenótipo. Contudo, durante muitos anos, os marcadores utilizados eram unicamente caracteres responsáveis por modificações morfológicas, facilmente detectáveis. Como exemplo podemos referir a cor da pelagem, a ausência ou presença de cornos e sua forma, a espessura da pele, algumas medidas ósseas (TEIXEIRA, 1991; ALTARRIBA *et al.*, 1997 e ZEDER e HESS, 2000) e morfológicas (GARCIA *et al.*, 2001 e JORDANA, *et al.*, 1998), as cristas das galinhas, a plumagem nas patas das galinhas, entre outros.

O principal problema destes marcadores é assentarem, normalmente, sobre bases genéticas complexas e desconhecidas, não sendo raro estas características morfológicas serem influenciadas por mais do que um gene, para além destes poderem estar sujeitos a acções de epistasia ou pleiotropia. A estes problemas soma-se o facto de serem alvo de uma forte pressão de selecção, para além de poderem ser influenciados por factores ambientais (ROZEN, 1999).

## 4.2 – MARCADORES BIOQUÍMICOS

Por volta dos anos cinquenta, as isoenzimas tornam-se no primeiro tipo de estudo molecular amplamente difundido (HUNTER e MARKET, 1957). Este estudo das isoenzimas baseava-se numa separação electroforética, em gel de amido ou mais recentemente em géis de poliacrilamida, de diferentes alelos de um mesmo gene. O seu estudo genético consistia em detectar diferenças de mobilidade das diferentes formas da enzima, após se padronizar as condições electroforéticas. As diferenças de mobilidade dependem do comprimento e/ou carga da enzima (PATERSON *et al.*, 1989). A partir dos anos sessenta, esta classe de marcadores foi amplamente aplicada no estudo duma série de problemas de genética de populações (SCANDALIOS, 1974). Assim, durante muitos anos, as proteínas do soro e as encontradas na superfície dos glóbulos vermelhos foram utilizadas no estudo e verificação das genealogias bovinas. Na espécie humana, os grupos sanguíneos continuam a ser usados na ciência forense e no estudo prévio aos transplantes. Nos ovinos e caprinos realizaram-se vários estudos sobre as diferentes caseínas do leite e sua importância no rendimento em queijo. Adicionalmente, às diferenças de tamanho e de carga dos vários polimorfismos proteicos, estes podem ainda possuir diferentes propriedades antigénicas e assim serem identificados através do uso de anticorpos (WILLIAMS, 1999). Como exemplo, temos os grupos sanguíneos que podem ser identificados através de testes imunológicos. Nos bovinos, conhecem-se 11 sistemas de grupos sanguíneos (STILLE e MILLER, 1986). Também nos caprinos foram detectados vários polimorfismos da transferina e hemoglobina (SHIQUAN *et al.*, 1990 e NESSE, 1990). Outros autores que se dedicaram ao estudo dos grupos sanguíneos em caprinos, referem o sistema sanguíneo B com diferentes alelos: Ba<sub>1</sub>, Ba<sub>2</sub> e Ba<sub>3</sub> (VANKAN e BELL, 1993).

Em relação aos marcadores morfológicos, os marcadores bioquímicos possuem a vantagem de existirem em maior número, apresentarem uma neutralidade fenotípica e uma herança mendeliana, para além de manifestarem uma ausência quase completa de relações de epistasia e pleiotropia (DIEZ-TÁSCON, 1998).

Os problemas destes marcadores é que, apesar de serem em maior número do que os morfológicos, são relativamente escassos para cobrir todo o genoma, muitas vezes desconhece-se a sua localização cromossómica e alguns encontram-se ligados e não mostram um grande número de polimorfismos (SAN PRIMITIVO, 1999).

Este tipo de marcadores podem ser considerados como os mais clássicos em análises de variações entre as diferentes raças de animais domésticos, podendo-se citar um grande

número de artigos entre os quais destacamos: KIDD *et al.* (1969), GAHNE *et al.* (1977), ORDAS e SAN PRIMITIVO (1986), TUÑÓN *et al.* (1989), ARRANZ *et al.* (1996), BARKER *et al.* (1998) e BLOTT *et al.* (1998).

#### 4.3 – POLIMORFISMOS DE DNA

No início dos anos oitenta, produziu-se uma grande mudança na utilização de marcadores genéticos – passou-se dos proteicos aos de DNA. Esta mudança justificou-se pelo facto dos marcadores de DNA possuírem um maior potencial de “navegação” no genoma (PATERSON, *et al.*, 1991). Desta forma, os polimorfismos de DNA permitem localizar genes em estudos de mapeamento de genomas ou serem simplesmente usados como marcadores de identificação (WILLIAMS, 1999). Em finais do ano 70 princípios de 80 descobriram-se uma série de métodos, que punham em evidência os polimorfismos de DNA, entre eles temos a utilização de enzimas de restrição que fragmentam a molécula de DNA, cada vez que aparece uma determinada sequência. Além de outras técnicas que evidenciavam estes mesmos polimorfismos, como a incorporação de elementos radioactivos em nucleótidos (FEINBERG e VOGELSTEIN, 1983) permitindo a constituição de sondas de DNA utilizadas na hibridação com genes homólogos através de técnicas especiais como a “hibridação *in situ* fluorescente” (FISH) (TRASK, 1991 e MILLAN *et al.*, 1996) ou mesmo a técnica de SOUTHERN que permite imobilizar em suportes sólidos (nitrocelulose ou membranas de *nylon*) padrões resultantes da electroforese de moléculas de DNA fragmentadas por enzimas de restrição (SOUTHERN, 1975). Contudo, o sucesso alcançado na utilização dos marcadores de DNA, de um forma rotineira, só foi possível devido à descoberta em 1985, por KARY MULLIS, da PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

##### 4.3.1 – POLIMORFISMO DO COMPRIMENTO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLPs)

Este foi o primeiro tipo de marcador de DNA amplamente difundido. Aproveitando a propriedade das endonucleases cortarem o DNA ao nível de determinadas sequências específicas, podemos detectar diferentes polimorfismos de uma determinada região de DNA, já que desta forma se produzem fragmentos de diferentes tamanhos. Estes fragmentos podem ser facilmente identificados, mediante uma separação electroforética. Depois de separados, os fragmentos são desnaturados e transferidos para uma membrana de *nylon* à qual se fixam, após o que são hibridados com sondas marcadas radioactivamente (SOUTHERN *blotting*; SOUTHERN, 1975). Originalmente, esta tecnologia

tinha a desvantagem de ser dispendiosa, morosa e consumir muito DNA. Estas dificuldades tornam-se redundantes, quando se utiliza a técnica PCR-RFLP, uma vez que a reacção de PCR produz suficiente DNA para que possa ser visualizado numa electroforese em gel de agarose. Os produtos de PCR, assim obtidos, são sujeitos a enzimas de restrição e os diferentes fragmentos (de tamanhos variados) originados podem ser visualizados através do acto de corar o gel de agarose (WILLIAMS, 1999).

Este método possui a desvantagem de apresentar uma baixa heterozigotia e um diminuto conteúdo em informação de polimorfismo (PIC) (BOTSTEIN *et al.*, 1980)

#### **4.3.2 – POLIMORFISMO DE CONFORMAÇÃO DE CADEIA SIMPLES (SSCP)**

Os polimorfismos de conformação de cadeia simples (SSCP) constituem outra técnica electroforética, numa matriz de gel, que permite a detecção (mas não a caracterização) de mutações e polimorfismos, cujo tamanho ideal rondará os 400 pares de bases. Esta análise baseia-se no princípio da mobilidade electroforética de uma molécula depender do seu tamanho e da sua conformação (DEAN e MILLIGAN, 1998). Em condições não desnaturizantes, as cadeias de DNA têm uma estrutura secundária, que é imposta pelas diferentes interacções intra-moleculares que se estabelecem mediante diferentes sequências de nucleótidos. Teoricamente, a diferença de um simples nucleótido em duas sequências similares é suficiente para alterar a estrutura secundária e assim alterar o padrão electroforético. Uma desvantagem deste método é a falta de uniformidade ao longo da electroforese, uma vez que a conformação que uma cadeia simples de DNA pode tomar depende da temperatura da corrida, da concentração iónica e dos próprios solventes. Estas limitações podem ser obviadas pela escolha de equipamentos mais sofisticados que, por exemplo, consigam manter uma temperatura aproximadamente constante ao longo de toda a corrida electroforética. A adição de determinadas substâncias ao gel, como o glicerol, fazem aumentar a sua sensibilidade (NEWTON e GRAHAM, 1997).

#### **4.3.3 – POLIMORFISMOS DE DNA APLICADOS AO ACASO (RAPDs)**

Esta técnica não é mais que uma variante da PCR, pois permite a detecção de polimorfismos sem se conhecer previamente a sequência dos seus nucleótidos. Este método utiliza um só iniciador, curto e inespecífico, que se hibridiza com regiões homólogas do genoma, dando origem a uma série de fragmentos desconhecidos, que podem ser evidenciados por separação electroforética em gel de agarose (WILLIAMS, 1990)

e DEMEKE e ROBERT, 1994). Após a adição de brometo de etídio, estes fragmentos tornam-se fluorescentes (WILLIAMS, 1990). Normalmente, estes fragmentos mostram herança mendeliana, geralmente dominante e por vezes codominante. No caso da relação entre os alelos ser de dominância não se podem distinguir os homozigóticos dominantes dos heterozigóticos (ROCHA e BARATA, 1997 e DIEZ, 1998). Os RAPDs têm a vantagem de serem uma técnica rápida e fácil de executar, para além de utilizar pequenas quantidades de DNA.

A principal desvantagem deste método é a sua fraca repetibilidade, já que alguns autores notaram a produção de bandas de DNA não parental em descendência de árvores genealógicas conhecidas (NEWTON e GRAHAM, 1997). Também ROCHA e BARATA, (1997) referem que os RAPDs revelam-se capazes de amplificar sequências genómicas ao acaso em certos indivíduos, mas não noutros. Assim pelo menos no campo da ciência animal estes marcadores não têm correspondido às expectativas iniciais (ROCHA e BARATA, 1997).

#### 4.4 – SEQUÊNCIAS DE DNA REPETIDAS EM TANDEM

Tanto os satélites, como os minissatélites ou os microssatélites, constituem classes de DNA repetitivo, nas quais a sequência de repetição está organizada em tandem. A diferença fundamental destas três classes reside no comprimento da unidade de repetição (RYSIECKI *et al.*, 1997). Outros autores, como WEBER (1990), apresentaram definições um pouco mais detalhadas. Segundo WEBER (1990), dentro dos chamados microssatélites podem ser encontradas 3 categorias perfeitamente diferenciadas:

- Repetições perfeitas. São aquelas em que a sequência que se repete não tem nenhuma interrupção e não existem repetições adjacentes a outras sequências  $(AC)_n$ .
- Repetições imperfeitas. São as que apresentam entre um e três nucleótidos, interrompendo a sequência em tandem. Normalmente, existem em ambos os lados da repetição, pelo menos, três repetições completas como  $(CA)_n CT(CA)_n$ .
- Repetições compostas. São aquelas que, após uma sequência repetida em tandem, são interrompidas por outra sequência perfeita, imperfeita ou uma mistura das duas.

#### 4.4.1 – SATÉLITES

As sequências de DNA Satélite partilham uma essência estrutural comum. Esta raiz ou “motivo” de organização comum é uma sequência de bases de comprimento variável, e que se repete em tandem um número variável de vezes (ROCHA e BARATA, 1997). Estes “motivos” podem incluir de 500 a vários milhares de pares de bases e que se repetem  $10^6$  vezes ao longo do genoma. Normalmente, pode encontrar-se junto dos centrómeros e telómeros dos cromossomas dos mamíferos (ROZEN, 1999).

#### 4.4.2 – MINISSATÉLITES

No caso dos minissatélites, a unidade de repetição pode conter de 9 a 1.000 pares de bases, repetidas de 10 a 1.000 vezes. Nos cromossomas, a sua posição mais comum é perto dos telómeros, embora se possam encontrar minissatélites noutras posições cromossómicas. O posicionamento preferencial, a nível dos telómeros, limita os estudos de ligação que abarcam todo o genoma (GEORGES, 1991 e STRACHAN e READ, 1999).

Estes marcadores são muito polimórficos e a sua principal utilidade é a obtenção da chamada *fingerprint* ou impressão genética, que é específica de cada indivíduo e por isso mesmo é muito utilizada na ciência forense. A técnica baseia-se na construção de sondas que contenham o núcleo da sequência comum a uma determinada família. Esta sonda vai-se hibridar simultaneamente com múltiplos *loci* minissatélite de todos os cromossomas, dando origem a um padrão de bandas de hibridação muito complexo (STRACHAN e READ, 1999). Por estes motivos, não são muito úteis para a detecção de *locus* quantitativos (QTLs), devido a não conseguirem muitas vezes identificar relações alélicas entre bandas, que derivam do mesmo *locus* e quais as que derivam de *locus* diferentes (ROCHA e BARATA, 1977).

Os minissatélites caíram um pouco em desuso, devido a problemas associados à transferência SOUTHERN e às sondas radioactivas, para além da técnica de PCR não ser facilmente aplicável a este tipo de marcador, devido à impossibilidade de amplificação dos alelos muito grandes (GEORGES, 1991).

#### 4.4.3 – MICROSSATÉLITES

Os microssatélites são sequências repetidas de DNA (5-20 vezes), tendo a unidade de repetição entre 1-6 pares de bases (GOLDSTEIN e POLLOCK, 1997 e GOLDSTEIN e SCHÖTTERER, 1999). São muito abundantes nos genomas dos eucariotas, aparecendo

também nos procariotas, embora com menores frequências. Raramente contêm mais de 70 unidades repetidas e encontram-se aleatoriamente espalhadas pelo genoma (HOELZEL, 1998). De acordo com alguns autores (HAMADA *et al.*, 1982 e HOELZEL, 1998), nos mamíferos, a unidade de repetição mais frequente é a (GT/AC) ocorrendo, em média, cada 30 kb. Quando as repetições são de trinucleótidos os mais vulgares são CAG e AAT, no entanto este dado pode estar influenciado pela tendência de concentração destes últimos junto a sítios codificantes ricos em CAG (STALLING, 1994).

Os microssatélites são altamente polimórficos, apresentando *loci* discretos com alelos codominantes. O elevado número de polimorfismos destes marcadores moleculares deve-se ao facto da sua taxa de mutação ser muito elevada ( $10^{-3}$ - $10^{-6}$ ), devido a um mecanismo interno chamado *slippage* (STRACHAN e READ, 1999), e/ou a trocas meióticas desiguais (JEFFREYS *et al.*, 1985). As taxas mutacionais parecem estar muito relacionadas com a estrutura do microssatélite, isto é, com o tamanho da unidade de repetição e sua composição (GASTIER *et al.*, 1995). Sugerindo-se diferentes comportamentos para di, tri, ou tetra nucleótidos (CHARKRABORTY *et al.*, 1997). Outro factor que influencia a estabilidade dos microssatélites é a sua pureza. Assim os microssatélites com interrupções são mais estáveis, apresentando menos polimorfismos (CHUNG *et al.*, 1993; RICHARD e SUTHERLAND, 1994 e PÉPIN *et al.*, 1995). Verificou-se também que os microssatélites têm uma maior apetência para ganhar alelos do que para os perder, no entanto haverá certos mecanismos para impedir que estes cresçam indefinidamente. Um destes motivos poderá ser a selecção, já que muitos alelos maiores estão associados a *loci* causadores de doenças genéticas (FELDMAN *et al.*, 1997 e SAMADI *et al.*, 1998). Existem ainda outros factores, ainda não muito bem estudados que podem contribuir para o estabelecimento de um limiar para os microssatélites (AMOS *et al.*, 1996).

Tipicamente, um *locus* de um microssatélite tem entre 4-10 alelos, embora já se tenham encontrado *loci* com aproximadamente 70 alelos. Estes microssatélites são facilmente amplificados através da PCR e analisados depois de uma electroforese. A facilidade de amplificação, o elevado número de alelos e a facilidade de análise levaram a que os microssatélites fossem eleitos os marcadores ideais em estudos genéticos, como a construção de mapas genéticos (WILLIAMS, 1999). Para uma fácil utilização e um elevado rendimento destes marcadores, desenvolveram-se outras técnicas como os chamados “multiplex PCR”. Esta técnica baseia-se na amplificação simultânea de vários microssatélites, num único tubo de PCR, tendo o cuidado de não usar iniciadores que amplifiquem microssatélites dentro dos mesmos intervalos de comprimento. Desta forma,

em apenas uma linha do gel podemos analisar várias amplificações microssatélíticas (HOELZEL, 1998). Outras técnicas, nomeadamente as que usam fluorescência, podem ser utilizadas em multiplexes, sem ser necessário que as amplificações pertençam a diferentes classes de comprimentos, desde que se utilizem cores diferentes (HOELZEL, 1998).

#### 4.4.3.1 – DETECÇÃO DE MICROSSATÉLITES APÓS AMPLIFICAÇÃO POR PCR

A análise de microssatélites baseia-se na determinação do tamanho de todo o produto de PCR, constituído pelo microssatélite e pelas regiões flangeadoras, recorrendo normalmente à electroforese em gel de poliacrilamida (HOELZEL, 1998). Na detecção de microssatélites podem ser utilizados dois grandes métodos: os radioactivos e os não radioactivos.

##### 4.4.3.1.1 – Radioactivos

É um método muito sensível, que se baseia na incorporação de um isótopo radioactivo, durante o processo de amplificação por PCR. Existem dois outros métodos de marcação dos produtos de PCR: a incorporação de nucleótidos marcados e a reacção de marcação das extremidades (*end-labelling*), a qual consiste na marcação de um dos iniciadores. Esta última marcação é mais eficaz, devido à diferença de mobilidade electroforética das duas cadeias, podendo resultar em duas bandas separadas num gel desnaturante (HOELZEL, 1988).

##### 4.4.3.1.2 – Não radioactivos

De entre os métodos não radioactivos, gostaríamos de destacar:

- A coloração com nitrato de prata (*silver staining*). Constitui uma alternativa à detecção radioactiva, é menos dispendiosa, é também menos sensível.
- A transferência e hibridação (SOUTHERN *blotting*). A técnica de *blotting* é um método de detecção de todos os produtos de PCR, independentemente das repetições dos microssatélites. As amplificações inespecíficas de PCR resultam em várias bandas visíveis no gel, tornando-se por vezes difícil distinguir entre os produtos de PCR inespecíficos e os alelos dos microssatélites. Assim, transferindo os produtos de PCR para uma membrana de *nylon* e subsequentemente hibridando-os com os microssatélites em questão, torna-se possível a detecção dos alelos dos

microsatélites. O método de *blotting* permite ainda o uso de qualquer um dos métodos de detecção não radioactivos. Os produtos de PCR, sobrepostos em tamanho, podem ser detectados através da subsequente hibridação do filtro com sondas específicas para os diferentes tipos repetidos.

– A coloração fluorescente e a utilização de um sequenciador automatizado. A detecção automatizada dos microsatélites, durante a electroforese em gel, é relativamente recente. A fim de permitir a sua detecção, os produtos de PCR amplificados são marcados com uma coloração fluorescente (tanto por incorporação durante o PCR como por marcação do iniciador).

Quando iluminada com um laser, esta coloração emite um sinal que pode ser facilmente detectado. A determinação do tamanho é possível por comparação da migração dos produtos de PCR acompanhados pelo marcador conhecido (HOELZEL, 1998).

Um ponto importante a salientar relacionado com os microsatélites é a existência de alelos nulos. Como a detecção dos microsatélites tem subjacente uma reacção de PCR, para que a amplificação seja correcta é necessário que os dois iniciadores se possam ligar perfeitamente às zonas de flanqueamento dos diferentes alelos. Se houver uma deleção ou uma mutação no sítio aonde se vão ligar os iniciadores esse alelo não amplificará, surgindo assim os chamados alelos nulos (KOOREY *et al.*, 1993; CALLEN *et al.*, 1993; PEMBERTON *et al.*, 1995 e HOELZEL, 1998). A identificação de alelos nulos numa população é problemática. Normalmente suspeita-se de alelos nulos quando existe um excesso de homozigóticos, embora este desequilíbrio da lei de HW possa resultar de outros factores, como da sub-divisões da população. Quando se estuda um grande número de microsatélites e o excesso de homozigóticos só é notado em um determinado *locus*, a questão da sub-divisão da população pode ser rejeitada (HOELZEL, 1998). A melhor maneira de provar a existência de alelos nulos será a análise de árvores genealógicas, só que na maioria das vezes não se encontram disponíveis. Nesse caso a melhor alternativa será a construção de novos iniciadores, os quais não interfiram com o polimorfismo causador do alelo nulo (PEMBERTON *et al.*, 1995 e HOELZER, 1998).

#### 4.4.3.2 – IMPORTÂNCIA DO DNA MICROSSATÉLITE

Ao que sabemos, até aos dias de hoje, desconhece-se as possíveis funções do DNA microssatélite. As repetições alternadas de purinas e pirimidinas, do tipo das repetições em tandem de CA/TG, são capazes de adoptar, *in vitro*, uma conformação particular do DNA, Z-DNA, mas existem poucas evidências de que este fenómeno ocorra na célula viva (STRACHAN e READ, 1999 e MURPHY e STRINGER 1986) relacionam os microssatélites com pontos de alta frequência de recombinação, enquanto que GROSS e GARRAD (1986) atribuem-lhes funções de empacotamento e condensação do DNA, nos cromossomas dos eucariotas.

Segundo outros autores, como HANCOCK (1996), afirmam que as sequências simples são raras dentro das zonas codificantes dos genes, por outro lado também se sabe muito pouco sobre a distribuição dos microssatélites nas regiões não codificantes. Segundo CHEN *et al.* (1997), certas sequências influem na flexibilidade do DNA o qual poderá condicionar a regulação dos genes. Também foram isolados receptores proteicos com diferentes unidades de repetição em Tandem, apresentando diferenças funcionais, sendo de esperar que desta forma possam intervir nas diferentes frequências de alguns microssatélites. É de referir que já foram encontrados microssatélites num certo número de regiões génicas promotoras, funcionando aí como amplificadores da expressão de certos vectores, noutros casos quando estes microssatélites sofrem deleções podem promover o efeito contrário (GILMOUR *et al.*, 1989).

A possibilidade demonstrada em alguns casos do aspecto funcional dos microssatélites juntamente com a sua alta taxa de mutação vem reafirmar a hipótese dos microssatélites se apresentarem como uma fonte de variação genética quantitativa observável e um substrato para a mudança (KASHI *et al.*, 1997 e KING *et al.*, 1997). Finalmente, GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER (1999) avançam com a possibilidade das variações no número de repetições dos microssatélites poderem estar em termos evolutivos programados para servirem como fonte de variação genética quantitativa, para superar a variabilidade perdida com a deriva genética e a selecção.

#### 4.4.3.3 – APLICAÇÕES DOS MICROSSATÉLITES

Em produção animal, o estudo de microssatélites constitui a base necessária para a identificação dos mapas de ligamento. Por sua vez estes mapas, permitem monitorizar a segregação de genes maiores dentro e entre populações (KINGHORN *et al.*, 1994).

Aproveitando ainda os mapas de ligamento, os microssatélites podem servir de marcadores moleculares, sempre que associados a um determinado gene que afecte uma característica com valor económico (QTL) (LANDER e SCHORK, 1994). Os microssatélites continuam a ser os marcadores de eleição nos testes de paternidade, especialmente importantes para os sistemas extensivos, ou como elementos importantes para a rastreabilidade dos produtos de origem animal (GAMA, 2002). Também no melhoramento animal, a selecção assistida por marcadores, como os microssatélites, poderá vir a revelar-se num futuro ainda não muito próximo, uma ferramenta interessante para a avaliação genética dos diferentes animais que integram um programa de melhoramento (GAMA, 2002). Assim haveria a possibilidade de melhorar de uma forma mais eficiente os caracteres fortemente influenciados por factores ambientais com baixa hereditabilidade. Permitiria a selecção de animais de ambos os sexos em idades muito jovens mesmo para características só mensuráveis após maturidade sexual, ou para características confinadas a um sexo. Por fim possibilitaria uma melhor gestão dos recursos genéticos, uma vez que poderíamos procurar uma combinação adequada entre adaptabilidade das raças autóctones e a produtividade das raças exóticas (KINGHORN *et al.*, 1994 e SOLLER, 1994).

Outra aplicação dos microssatélites é poderem ser usados para inferir a variabilidade genética. Assumindo a neutralidade dos microssatélites uma estratégia comum é, seleccionar microssatélites bastante polimórficos e tipificá-los em determinadas populações. A variabilidade média destes *loci* são usados para estimar a variabilidade genética entre e dentro das populações. Com base nestes dados têm-se inferido diferentes estruturas populacionais e movimentos demográficos. Em termos de conservação genética estes dados têm servido para implementar estratégias com vista a conservar a biodiversidade. A conservação da variabilidade genética e a identificação de unidades genéticas independentes estão entre os primeiros objectivos da conservação. As distâncias genéticas estão baseadas na ideia de que a mutação e a deriva genética casual são os principais responsáveis pela diferenciação populacional ao longo do tempo. Assim, estes marcadores neutros estarão à altura de fornecer uma medida da diferenciação entre populações. Estes pressupostos nem sempre se verificam e nesse caso teremos que observar estes fenómenos com mais cuidado (SMITH *et al.*, 1997).

Uma aplicação fundamental dos microssatélites tem sido o estudo das relações genéticas em animais domésticos. Desde finais dos anos 90 que se multiplicaram os estudos nas distintas espécies de animais domésticos com o propósito de conhecer as relações genéticas entre as diferentes raças estabelecidas utilizando marcadores

microssatélite (GROSCLAUDE *et al.*, 1990; MACHUGH *et al.*, 1997; ARRANZ *et al.*, 1998; CYMBRON *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1999; CAÑON *et al.*, 2000; HANSLIK *et al.*, 2000 e WIMMERS *et al.*, 2000).

Outra potencial aplicação dos microssatélites (marcadores codominantes) é no estudo da variação da capacidade de sobrevivência de populações naturais devido a efeitos de consanguinidade e o seu inverso. Estes estudos são feitos de uma forma indirecta, já que em determinadas circunstâncias a determinação da heterozigotia estará inversamente correlacionada com o coeficiente de consanguinidade. Desta forma existe uma certa correlação entre a capacidade de sobrevivência e a heterozigotia (ALLENDORF e LEARY, 1986).

A análise de microssatélites também tem tido um impacto muito profundo na construção do mapa de ligamento humano e no mapeamento de numerosas doenças genéticas e na compreensão de migrações geográficas e evolutivas (STEPHENS *et al.*, 1992; CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994 e LUIKART *et al.*, 2001). O uso de microssatélites facilitou a identificação de um número de doenças causadas por determinados genes, muitos dos quais tinham uma herança monogénica. Os genes do complexo de maior histocompatibilidade (HLA), parecem estar associados a doenças de várias etiologias e o mapeamento dos *loci* microssatélites dentro da região MHC podem fornecer um meio para uma identificação precisa das regiões associadas com doenças (CARRINGTON *et al.*, 1999). Evidentemente que a possibilidade de detectar um *locus* que influencie a predisposição para uma doença baseada num *locus* microssatélite próximo, depende da existência de ligação factorial. Não esquecendo que existem variáveis que afectam a ligação factorial como a taxa de recombinação, entre os dois *loci*, a taxa de mutação e o coeficiente de selecção em cada um dos *loci* e a história demográfica da população (SCHOTTER e WIEHE, 1999). Ainda no campo da medicina os microssatélites podem ser usados para estudos de tumores, uma vez que parece existir uma certa relação com taxas elevadas de mutação em determinados microssatélites e certos processos tumorais (SHIBATA, 1999).

Muitas vezes os microssatélites também são conhecidos na ciência forense assim como na ciência animal por *Short Tandem Repeat* (STR), tornando-se os marcadores de eleição. Alguns casos típicos na ciência forense não são mais que a tentativa de relacionar um suspeito com uma amostra encontrada num cenário de crime, por exemplo: sangue ou sêmen que presumivelmente pertencerá ao culpado. Estes estudos baseados em microssatélites também se podem aplicar a estudos de paternidade ou mesmo em fraudes comerciais (PASCAL *et al.*, 1994). O facto dos microssatélites mostrarem possuir uma

grande precisão, neste campo, já que possuem um elevado número de polimorfismos revelando assim, a possibilidade de resolver vários problemas. No entanto, fenómenos de possibilidade de contaminação da amostra, deverão ser sempre ponderados (BALDING, 1995).

#### **4.4.4 – AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS)**

A técnica de AFLPs baseia-se na amplificação (usando a técnica de PCR) selectiva de fragmentos de restrição, obtidos a partir de DNA genómico, depois de este ter sido submetido a uma digestão total, com enzimas de restrição. Após esta digestão, são introduzidos oligonucleótidos adaptadores, nos fragmentos de restrição. Em seguida, a ampliação selectiva pretendida é conseguida com a construção de amplificadores, que terão que ter em consideração os adaptadores e a sequência de reconhecimento das enzimas de restrição, alguns dos amplificadores estendem-se em cerca de 3 bases no próprio segmento de restrição, dando amplificações mais específicas. Somente os amplificadores que se ligam à extremidade 3' dos fragmentos de restrição são amplificados (NEWTON e GRAHAM, 1997). Desta forma são amplificados vários segmentos de restrição em simultâneo o que obriga o uso de géis de sequenciação para assegurar uma resolução adequada dos produtos. Este procedimento selectivo produz um enorme número de fragmentos para análise, mas não os suficientes para se poder terminar a análise. Uma série de diferentes amplificadores selectivos, numa segunda fase, serão, então, usados (NEWTON e GRAHAM, 1997).

Os padrões resultantes são altamente polimórficos e não requerem o conhecimento prévio das suas sequências, sendo a amplificação menos susceptível de gerar artefactos. Desta forma, obtém-se um elevado número de marcadores, identificáveis pela presença ou ausência de bandas. As desvantagens deste método relacionam-se com a introdução de erros na detecção das bandas, com a complexidade inerente à sua realização e porque requer uma dupla digestão, ligação e duas amplificações para além de a sua manifesta dominância (ROZEN, 1990 e AJMONE-MARSAN, 2001).

Esta técnica foi desenvolvida, inicialmente, em vegetais, e a sua aplicação em animais depende das espécies consideradas e dos objectivos. Este método revelou-se interessante na construção de mapas onde a informação é escassa. E por fim pode ainda revelar novas pistas em mapas genéticos já saturados, pela possibilidade de apresentar novos polimorfismos (ANDERSON *et al.*, 1998 e LOOFT *et al.*, 1998).

#### **4.4.5 – SNP (*SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS*)**

Nos últimos anos, novos marcadores foram descobertos, geralmente dialélicos, logo menos informativos do que os microssatélites, mas mais frequentes e mais estáveis face à mutação. Encontram-se distribuídos uniformemente pelo genoma, com uma alta densidade (1 por cada 1.000 pares de bases no genoma humano) e podem ser identificados de uma forma automática. Utilizando uma tecnologia específica (*High-Density DNA Arrays*), desenvolveram-se *chips* de DNA, que permitem a sua rápida identificação (WILLIAM, 1999). Previsivelmente, estes marcadores, muito úteis à identificação e QTLs, poderão ser utilizados na determinação da variabilidade genética entre populações (SAN PRIMITIVO, 1999 e GROSSE *et al.*, 2000).

#### **4.4.6 – ESTS (*EXPRESSED SEQUENCE TAGGED SITES*)**

Para além de marcadores de DNA, os *chips* de DNA permitem a expressão de genes, de forma a facilitar a sua investigação detalhada. O primeiro passo é a identificação de todas as sequências expressas em todos os tecidos das várias espécies e a construção de um conjunto específico de marcadores Alvo de Sequências Expressas (ESTs). Estes podem ser dispostos como manchas de alta densidade em dispositivos de vidro ou membranas de *nylon*. A hibridação de DNA nestes dispositivos ou membranas facilita a observação dos diferentes perfis nos vários tipos de tecidos, em diferentes alturas e sob várias condições fisiológicas (WILLIAMS, 1999).

Os ESTs que contêm microssatélites são marcadores muito úteis para a pesquisa de genes com importância económica e para a comparação de mapas génicos (GROSSE *et al.*, 2000).

A observação dos genes envolvidos em características produtivas, juntamente com o estudo da sua expressão sob diferentes condições fisiológicas, contribuirá para o conhecimento mais profundo dos factores determinantes da interacção complexa entre génotipos e fenótipos (WILLIAMS, 1999).

### **4.5 – MAPA DE LIGAMENTO CAPRINO**

A identificação de marcadores polimórficos, principalmente dos microssatélites, levou a que se construíssem mapas de ligamento, inicialmente de resolução muito baixa. Os primeiros a aparecer, em 1994, foram os de bovinos (BARENDSE *et al.*, 1994 e BISHOP *et al.*, 1994), seguindo-se-lhes os de suínos (ROHRER *et al.*, 1994 e ARCHIBALD *et al.*, 1995),

os de ovinos (CRAWFORD *et al.* 1995), os de genes de caprinos (GEORGES *et al.*, 1993; COCKETT *et al.*, 1994 e VAIMAN *et al.*, 1996) e os de QTLs (GEORGES *et al.*, 1995). Nesta fase, o mapa génico caprino estava apenas no início com apenas 226 sequências registadas no banco génico, menos de 20 genes localizados e menos de 20 microssatélites descritos (AREVALO *et al.*, 1994 e BHEBHE *et al.*, 1994). Até ao fim dos anos oitenta, o mapa génico do caprino estava limitado a um simples grupo de ligamento entre dois genes de caseínas (CASA 1 e CASA 2) (GROSCLAUDE *et al.*, 1987). O maior problema era a escassez de marcadores polimórficos na cabra, podendo esta situação mudar à medida que se caracterizam os microssatélites caprinos. De qualquer forma esta estratégia não permitia a incorporação de dados dos mapas de ligamento dos bovinos e dos ovinos. A outra alternativa era explorar o facto de que o tempo evolutivo de separação entre caprinos, bovinos e ovinos não ser demasiado grande (aproximadamente 17 milhões de anos), admitindo-se que os caprinos representem uma espécie próxima dos bovinos e ovinos, poderemos aproveitar, alguma informação que daí advém.

Assim se verificou que aproximadamente 40% dos microssatélites bovinos amplificam *loci* homólogos nas cabras, usando os mesmos iniciadores e admitindo-se a possibilidade de perda de especificidade com consequente perda de heterozigosidade (KONDO *et al.*, 1993 e PÉPIN *et al.*, 1995).

Estudos de bandeamento apresentados segundo, o *Internacional System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals* (ISCNDA, 1989), mostram uma grande semelhança em alguns braços cromossómicos entre bovinos, ovinos e caprinos. O que se tornará muito encorajador para a aplicação de técnicas de mapeamento comparado, que no caso da ovelha, apresentou bons resultados (MADDOX *et al.*, 2001). A cabra apresenta 60 cromossomas (2n), sendo este número muito próximo dos bovinos e ovinos, para além de apresentar os pares autossómicos telocêntricos, o cromossoma X acrocêntrico e o Y metacêntrico e de tamanho muito pequeno. Aproveitando algumas semelhanças e seguindo a estratégia do mapeamento comparado, VAIMAN *et al.* (1996) apresentam-nos um mapa génico do genoma caprino embora bastante incompleto, onde se podem observar 219 marcadores, verificando-se uma distribuição Gaussiana de 10 a 15 cM de intervalo entre marcadores consecutivos. Não será, no entanto, de descorar a existência de 4 zonas cujos espaços entre os marcadores são maiores que 40 cM para além da presença de grupos com ligação e de estes representarem em geral espaços superiores a 50 cM.

Estes autores partiram de 492 marcadores bovinos, 109 ovinos e 11 caprinos para serem avaliados em caprinos. Nos bovinos, 165 (34%) mostram-se polimórficos nos

caprinos dos quais um deles poderá estar ligado a outros marcadores e/ou incluído num cromossoma. Dos 109 microssatélites ovinos, 47 (43%) mostram-se polimórficos e os restantes poderiam ser localizados no mapa génico. Finalmente dos 11 microssatélites caprinos 10 mostram-se polimórficos, podendo o restante estar ligado ou incluído num outro cromossoma.

De todos os microssatélites testados, 55 mostraram-se polimórficos nas 3 espécies (VAIMAN *et al.*, 1996). Com os estudos de KEMP *et al.* (1995), chegam-se aos 69 microssatélites definidos para os ruminantes domésticos.

É evidente que existem excepções à conservação geral de grandes fragmentos cromossómicos entre as espécies de ruminantes domesticados, como exemplos, podemos citar alguns microssatélites. O TGLA 245 previamente localizado no cromossoma 16 bovino, nos caprinos localiza-se no cromossoma número 1 caprino. O microssatélite HEL13 encontrado no cromossoma 11 bovino, nos caprinos localiza-se no cromossoma 8, o OarVH98 ovino do cromossoma 17 encontra-se no cromossoma 12 caprino, o OarCP9 encontra-se no cromossoma número 9 ovino, enquanto que nos caprinos aparece no cromossoma número 16. O grupo ETH225; INRA136; BM757 localizados no cromossoma 9 bovino encontram-se no cromossoma 14 caprino (VAIMAN *et al.*, 1996).

Em 1998, SCHIBLER *et al.* apresentaram um mapa caprino mais completo, com a incorporação de mais 77 microssatélites. Assim o número total de marcadores ascende a 307 dos quais 40 estão localizados junto a sequências codificantes, 243 são comuns aos bovinos, 127 aos ovinos e 93 às três espécies. Entre os 307 marcadores do mapa de ligamento caprino, 248 estão pelo menos ligados a mais de um marcador e podem ser atribuídos aos 40 grupos de ligamento, nos 29 pares de autossomas. Entre estes marcadores, 237 podem ser posicionados sem ambiguidade usando um programa denominado “CRI-MAP” (GREEN *et al.*, 1989). Com os últimos 47 marcadores, como ainda é desconhecida a sua localização exacta, apenas lhes são atribuídas posições prováveis.

O mapa caprino, apresentado por SCHIBLER *et al.* (1998), cobre 2.737 cM, o que representa mais de 88% deste genoma, assumindo um comprimento autossomal total de 3.100 cM. Calcula-se ainda que exista um intervalo de 14,5 cM ( $\pm$  3,8 cM) entre marcadores contíguos, posicionados sem ambiguidade em grupos de ligamento (SCHIBLER *et al.*, 1998). Mais recentemente, WEIMAN *et al.* (2000) aportaram mais informação ao mapa genético caprino, apresentando o microssatélite INHA, ligado ao gene da inibina  $\alpha$ .

## 5 – MÉTODOS ESTATÍSTICO

### 5.1 – FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Durante muitos anos, os diferentes geneticistas tiveram conhecimento da variação genética existente entre diferentes indivíduos constituintes de uma mesma espécie sem, no entanto, poderem ter uma ideia clara da extensão dessa variabilidade. Recentemente, a descrição quantitativamente da variação genética e a sua forma de manutenção tornaram-se dois dos principais objectivos da genética populacional.

A variação genética pode ser avaliada a diferentes níveis, entre os quais cabe destacar a variação alélica. À frequência de um determinado alelo, numa dada população, dá-se o nome de frequência génica ou frequência alélica. Esta constitui um parâmetro fundamental no estudo da evolução, uma vez que as alterações genéticas de uma população são descritas por mudanças nas frequências génicas. Normalmente, a estimação das verdadeiras frequências alélicas é feita através da observação de frequências alélicas de uma determinada amostra. Obviamente, a exactidão das estimativas depende do tamanho da amostra, da presença ou não de dominância, do sistema de acasalamento e das próprias frequências génicas.

As frequências génicas variam ao longo do tempo. As mutações proporcionam a matéria-prima para o surgimento de novos alelos ou até de novos genes, quando são duplicadas regiões inteiras. Assim, a mutação é um elemento fundamental para a evolução. Por outro lado, uma mutação só muito raramente ocorre em mais do que um indivíduo, para além da taxa de recorrência ser muito baixa e por isso ter um efeito muito diminuto na taxa total de evolução. A acrescentar à força da evolução, outras três forças podem afectar esta variabilidade: a migração, a selecção natural e a deriva genética casual. Todas estas forças podem afectar a frequência genética de um determinado alelo presente numa população.

#### 5.1.2 - PROPORÇÃO DE *LOCI* POLIMÓRFICOS

Quando se pretende avaliar a variabilidade genética, utilizando um grande número de *loci*, esta pode ser medida pela proporção de *loci* polimórficos ou pela média da heterozigotia do *locus*.

Normalmente, um *locus* é considerado polimórfico quando a frequência do alelo mais comum é inferior ou igual a 0,99 (LI, 1997). Porém, nem todos os autores estão de acordo com a existência deste limite. Desta forma, são por vezes indicadas frequências

limite de 0,950, 0,995 ou até de outros valores. Esta medida de variabilidade genética pode ser útil quando a amostra é grande e o número de *loci* examinados for suficientemente grande. Quando o tamanho da amostra é sensivelmente inferior a 50 indivíduos, a frequência limite de 0,99 não é aceitável pois, neste caso, um determinado alelo que tivesse uma frequência inferior a  $1/2n$  poderia não estar representado na amostra, mesmo que a frequência do dito alelo fosse de 0,01 ou mais. Por outro lado, quando o número de *loci* observado é pequeno, a proporção de *loci* polimórficos está sujeita a um grande erro de amostragem (LI, 1997).

## 5.2 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

A lei de HW tem um papel importantíssimo no campo da genética de populações e frequentemente serve como base de dedução genética. Devido a tal importância ao longo de várias décadas tem-se dedicado muita atenção aos testes de proporções de HW, com o fim de detectar desvios que perturbem as frequências génicas.

A lei de HW diz que numa grande população em cobrição ao acaso, na qual, não exista seleção, mutação, ou migração; as frequências alélicas e genóticas manter-se-ão de geração em geração.

Existem várias formas de caracterizar os desvios relativos ao equilíbrio de HW. Assim por um lado temos os métodos utilizados para grandes amostras chamados testes de *Goodness-of-Fit* como o método de Pearson,  $\chi^2$  proporção estatística de máxima verosimilhança  $G^2$  e o teste condicional  $\chi^2$  (LI, 1995). Estes testes têm uma característica em comum, ou seja têm uma excessiva fragilidade nos resultados assintóticos (GUO e THOMPSON, 1992). O outro grupo envolve os testes exactos (LEVENE, 1949; HADANE, 1954 e CHAPCO, 1976). Estes últimos testes no passado estavam restritos a *locus* dialélicos e amostras pequenas, já que exigiam grande poder computacional. Sabe-se também que os métodos *Goodness-of-Fit* muitas vezes levam a uma falsa rejeição ou aprovação do equilíbrio de HW, principalmente quando a amostra é pequena e algumas frequências são muito pequenas ou zero (EMIGH e KEMPTHONE, 1975). Várias correcções foram propostas para obviar este problema, mas sem grande sucesso (HERNÁNDEZ e WEIR, 1989). Do que foi referido chega-se à conclusão que quando estamos perante amostras pequenas e/ou com frequências pequenas ou zero os testes exactos são preferíveis.

A utilização do teste exacto ou de probabilidade remonta a 1935, com o trabalho de FISHER. Este teste resultou da constatação de que a amostra observada pode ser utilizada

para rejeitar uma hipótese, se a probabilidade total da hipótese da amostra, ou a menos provável, é pequena.

Basicamente este teste baseia-se na determinação de todo um conjunto de frequências genotípicas para o conjunto particular de frequências alélicas observadas, rejeitando-se a hipótese do equilíbrio de HW se as frequências genotípicas tendem a ser bastante raras, nesse mesmo equilíbrio. O teste exacto normalmente é usado em amostras pequenas, aonde há uma grande probabilidade de se esperarem valores muito pequenos, no teste de  $\chi^2$ . De qualquer forma mesmo em amostras maiores, nas em que existam alelos raros é preferível usar o teste exacto.

Mais recentemente, NEI (2000) afirmou que, em certos casos, o equilíbrio de HW pode ser medido pelo índice de fixação F. Assim, no caso mais simples, de apenas um par de alelos, o desvio relativo às proporções da lei de HW podem ser medidas por um único parâmetro (F), chamado índice de fixação (WRIGTH, 1951, 1965). Ao utilizar-se este índice, as frequências genotípicas são-nos dadas da seguinte forma:

$$X_{11} = (1 - F)X_1^2 + Fx_1$$

$$X_{12} = 2(1 - F)x_1x_2$$

$$X_{22} = (1 - F)x_2^2 + Fx_2$$

O índice de fixação pode ser positivo ou negativo. A partir da segunda equação, obtém-se a seguinte:

$$F = (2x_1x_2 - x_{12}) / (2x_1x_2)$$

Considerando que  $2x_1x_2$  é a frequência esperada dos heterozigóticos sob reprodução ao acaso (h) e  $x_{12}$  é a frequência observada dos heterozigóticos na população ( $h_0$ ), assim a equação anterior pode ser apresentada da seguinte forma:

$$F = (h - h_0) / h$$

Neste caso, F é positivo quando  $h_0$  é menor que h e negativo quando  $h_0$  é maior que h. No caso de consanguinidade, a frequência observada dos heterozigóticos declina, tornando o F positivo (NEI e KUMAR 2000).

No caso de se esta perante alelos múltiplos, supõe-se que existem q alelos num *locus*, de uma maneira geral necessitamos de  $q(q-1)/2$  índices de fixação para especificar todas as

frequências genóticas em termos de frequências alélicas e índices de fixação. De qualquer forma se o desvio ao equilíbrio de HW ocorre apenas devido a, consanguinidade, o desvio pode ser descrito por um simples índice de fixação. Neste caso, a frequência ( $x_{ij}$ ) dos homozigóticos  $A_iA_i$  ( $i=1, 2, \dots, q$ ) é dada por:

$$X_{ii} = (1 - F)x_i^2 + Fx_i$$

Enquanto que a frequência ( $X_{ij}$ ) do heterozigótico  $A_iA_j$  é

$$X_{ij} = 2(1 - F)x_i x_j$$

A frequência esperada dos heterozigóticos de acordo com o equilíbrio de HW é dada por  $h = 2 \sum_{i < j} x_i x_j$ , enquanto que a frequência observada é

$$h_0 = \sum_{i < j} X_{ij}. \text{ Assim a } F = (h - h_0)/h \text{ (um par de alelos) mantêm-se, mesmo para}$$

*locus* com alelos múltiplos. Em genética de populações,  $h$  e  $h_0$  são muitas vezes chamadas heterozigotia esperada e observada respectivamente (NEI e KUMAR, 2000).

Nos dias de hoje, com a utilização de alguns marcadores moleculares, como os RFLPs ou os VNTRs, não é invulgar surgirem *loci* com 10 ou mais alelos. Mesmo que a amostra não seja muito grande, o número de genótipos é tão grande que em algumas amostras as frequências genóticas serão zero, logo mais uma vez os testes exactos são preferíveis (GUO e THOMPSON, 1992). Estes mesmos autores propuseram dois métodos para estimar o nível de significância dos testes exactos para proporções de HW com múltiplos alelos, um é o convencional método de Monte Carlo e o outro é uma adaptação do algoritmo “Metropolis” (METROPOLIS *et al.*, 1953 e BINDER e HEERMANN, 1998).

No método de Monte Carlo, o cruzamento ao acaso pode ser visto como a união ao acaso de dois gâmetas, gerando vários genótipos. Ao repetir este processo várias vezes cria-se uma nova série de populações, sendo então testado o equilíbrio de HW, relativamente aos dados utilizados. Este método é mais adequado a pequenas populações com um grande número de alelos.

A utilização do segundo algoritmo leva à construção de uma cadeia de MARKOV, utilizada para obter uma estimativa, centrada, da probabilidade exacta (GUO e THOMPSON, 1992). Esta cadeia de MARKOV é construída numa distribuição em equilíbrio, encontrando-se as probabilidades genóticas em equilíbrio de HW, nas amostras que têm o

mesmo número de alelos que os dados observados (GUO e THOMPSON, 1992). Este método é mais rápido que o anterior quando o tamanho da amostra é grande ou moderada.

### 5.3 - HETEROZIGOTIA

Numa população, a frequência de heterozigóticos é importante, uma vez que cada heterozigótico é constituído por diferentes alelos, o que contribui para a existência de variabilidade.

Neste caso, a variabilidade genética pode ser tomada como a heterozigotia média (H) ou diversidade genética, não sendo esta mais do que a proporção média de indivíduos heterozigóticos, por *locus*, de uma população. Este parâmetro não pode ser utilizado em populações que não estejam em equilíbrio de HW (ARRANZ, 1996). Assim, se  $x_i$  for a frequência de um determinado alelo  $i$ , num dado *locus*, a heterozigose ( $h$ ) para esse *locus* é definida como (NEI, 1987):

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

sendo “ $m$ ” o número de alelos, a heterozigotia média (H) é a média desta quantidade em todos os *loci*.

A heterozigotia não é mais do que a probabilidade de um gene, escolhido ao acaso, tenha dois alelos diferentes. Esta probabilidade, no caso de uma população em equilíbrio de HW é igual à proporção de heterozigóticos e foi denominada por NEI (1973) como – diversidade genética.

Se  $\hat{x}_{ij}$  representar a frequência  $A_i A_j$  de uma amostra e uma vez que essa amostra é multinomial,  $(\hat{x}_{ij})$  é um estimador, sem desvio, de  $x_{ij}$ . A estimação da frequência alélica  $(\hat{x}_i)$  de um alelo  $x_i$  é dada pela seguinte expressão:

$$\hat{x}_i = \hat{x}_{ii} + \sum_{j \neq i} \frac{\hat{x}_{ij}}{2}$$

vindo a diversidade genética para um estimador, sem desvio, representada por:

$$\hat{h} = 2n \left[ 1 - \sum (\hat{x}_i^2) / (2n - 1) \right] \text{ (NEI e ROYCHOUDHURY, 1974)}$$

A média da diversidade genética (H), estimada por amostragem de  $r$  *loci*, é dada por:

$$\widehat{H} = \sum_{j=1}^r \widehat{h}_j / r$$

Como já foi anteriormente referido, a variação genética das populações pode ser caracterizada através da heterozigotia ou diversidade genética, sendo a última mais apropriada para populações consanguíneas.

A variação destas medidas, quando referidas a médias de vários *loci*, terá que ter em conta diferentes níveis de variação, em distintos *loci*, e possíveis associações a variados níveis dos diferentes *loci*.

#### 5.4 - CONTEÚDO DE INFORMAÇÃO DO POLIMORFISMO (PIC) E NÚMERO EFICAZ DE ALELOS ( $N_e$ )

O conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) de um determinado *locus* representa a probabilidade de conhecer o progenitor do qual procedem cada um dos alelos de um determinado indivíduo.

O PIC pode ser calculado pela fórmula de BOTSTEIN *et al.* (1980):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i P_j^2$$

$n$  é o número de alelos num *locus*

$P_i$  e  $P_j$  representam a frequência do  $i$ -ésimo e  $j$ -ésimo, respectivamente.

Consideram-se muito informativos os valores superiores a 0,5, mediantemente informativos entre 0,25 e 0,5 e pouco informativos quando inferiores a 0,25 (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

Um determinado *locus* pode conter um número elevado de alelos mas com frequências muito diferentes. Neste caso o PIC observado é inferior ao máximo. O PIC máximo obtido para  $n$  alelos de um *locus* obtém-se quando estes são equipfrequentes, isto é, se  $P_i = \frac{1}{n}$

$$PIC_{máx} = \frac{n-1}{n} \left( 1 - \frac{1}{n^2} \right)$$

O número eficaz de alelos ( $n_e$ ) é o número de alelos equifrequentes que produzem o mesmo PIC que o observado nesse marcador com um número maior de alelos (GROBET, 1993). Desta forma, a equação anterior pode transformar-se na seguinte:

$$PIC_{obs} = \frac{n_e - 1}{n_e} \left( 1 - \frac{1}{n_e^2} \right)$$

O  $n_e$  calcula-se a partir da seguinte fórmula:

$$n_e^3(1 - PIC_{obs}) - n_e^2 - n_e + 1 = 0$$

## 5.5 - MEDIDAS DE VARIABILIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL

As distâncias genéticas são usadas para medir, de uma forma global, as diferenças genéticas entre populações ou espécies (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994). Assim sendo, estas, mais do que o grau de diferenciação entre um par de populações, expressam uma quantidade numérica (NEI, 1987). Desta forma, o número de substituições génicas por *locus* é uma medida da distância genética.

Existem muitas fórmulas para calcular as distâncias genéticas, todas elas bastante relacionadas, mas nenhuma totalmente perfeita. Sob este ponto de vista, há que conhecer profundamente cada uma destas distâncias, para melhor as podermos adaptar a cada caso particular. Estas distâncias permitem-nos condensar uma grande quantidade de dados, de forma a serem facilmente utilizados, para além de constituírem uma ferramenta muito útil na reconstrução da história evolutiva das populações (ARRANZ, 1996).

O conceito de distância genética foi introduzido, pela primeira vez, por SANGHVI (1953), num estudo evolutivo, embora já anteriormente CZEKANOWSKI (1909) e PEARSON (1926) tivessem apresentado conceitos semelhantes (NEI, 1987). Estes métodos eram utilizados para classificar populações em termos de características quantitativas. Este tipo de métodos culminou com a criação, por parte de MAHALANOBIS (1936), da “distância generalizada”, a qual é por excelência uma medida para características normalmente distribuídas e correlacionadas, isto é, a matriz de intercorrelações entre as características dentro da população é a mesma para todas as populações (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994). Para completar e pormenorizar este tipo de distâncias, a que NEI (1972) designou por “medidas de distâncias utilizadas para classificação populacional”, temos de adicionar, pelo menos, mais cinco.

### 5.5.1 - DIFERENÇA DE MÉDIAS ( $C_Z$ )

Como já foi anteriormente referido, esta distância (CZEKANOWSKI, 1909) foi proposta para características quantitativas, mas também pode ser utilizado com dados contendo frequências genéticas. Os taxonomistas SNEATH e SOKAL (1973) usaram uma versão desta distância, denominada *Manhattan Metric* ( $C_M$ ). Estas distâncias têm uma vantagem sobre as demais, que é serem métricas, por cumprirem a desigualdade triangular, isto é, considerando as populações 1, 2, ..., s, e sendo  $D_{ij}$  a distância entre populações i e j, verifica-se a seguinte desigualdade:

$$D_{ij} \leq D_{ik} + D_{kj}$$

Este facto permite representar populações como pontos no espaço euclidiano e permite a medição das distâncias entre populações, em termos de distâncias geométricas entre pontos correspondentes no espaço. Estas distâncias métricas são também utilizadas na análise de componentes principais.

### 5.5.2 - COEFICIENTE DE SIMILITUDE RACIAL (CRL) DE PEARSON

Esta distância foi também originalmente proposta para características quantitativas e tem um termo de correcção para erros de amostragem, mas que raramente é usado. Existe uma distância muito parecida a esta, que foi usada por HEINKE e que se assemelha à distância genética mínima de NEI (1973).

### 5.5.3 - DISTÂNCIA DE ROGERS

A distância de ROGERS (ROGERS, 1972) obedece igualmente à desigualdade triangular. Assim, sendo uma medida métrica é de fácil aplicação na taxonomia numérica, já que permite uma fácil interpretação geométrica. Esta distância, inicialmente proposta por ROGERS (DP), foi posteriormente reformulada, pelo mesmo autor, para a distância (DR), de modo a mostrar uma variação de 0-1, mais conveniente do que a variação de 0 a  $\sqrt{2}$  da distância inicial. Os principais problemas destas distâncias é não reflectirem o tempo evolutivo, nem o número de substituições genéticas, para além de poderem conduzir a resultados falsos, sempre que duas populações não compartilham alelos.

#### 5.5.4 - DISTÂNCIA $D^2$

Esta distância  $D^2$  (MAHALANOBIS, 1936) não é mais do que uma extensão do coeficiente de PEARSON, quando as características estão correlacionadas. Mais uma vez, esta distância foi estabelecida para caracteres quantitativos, surgindo algumas variantes de forma a serem utilizadas frequências, sendo uma delas designada por  $X^2$  (SANGHVI, 1953). Outra das variantes é a chamada distância  $B^2$ , cuja grande deficiência se relaciona com a sua elevada dependência do tamanho da amostra.

#### 5.5.5 – DISTÂNCIA STANDARD DE NEI ( $D_s$ )

A distância genética mais usada foi apresentada por NEI (1972). Esta distância pode ser apresentada por uma identidade genética  $I$ , entre duas populações, representadas pela seguinte equação:

$$I = \frac{\sum_l \sum_u \tilde{p}_{lu_1} \tilde{p}_{lu_2}}{\sqrt{\sum_l \sum_u \tilde{p}_{lu_1}^2 \sum_l \sum_u \tilde{p}_{lu_2}^2}}$$

esta identidade retrata duas populações de igual tamanho e as frequências do alelo  $A_u$ , no locus  $l$ , são  $\tilde{p}_{lu_1}$  e  $\tilde{p}_{lu_2}$ . Após a introdução do desvio, a anterior fórmula, transforma-se na seguinte:

$$I = \frac{(2n-1) \sum_l \sum_u \tilde{p}_{lu_1} \tilde{p}_{lu_2}}{\sqrt{\sum_l (2n \sum_u \tilde{p}_{lu_1}^2 - 1) \sum_l (2n \sum_u \tilde{p}_{lu_2}^2 - 1)}}$$

Sendo a distância standard de NEI ( $D_s$ ):

$$D_s = -\ln(I)$$

#### 5.5.6 – DISTÂNCIA ANGULAR MODIFICADA DE CAVALLI-SFORZA E EDWARDS (1967) OU DISTÂNCIA DE NEI *et al.* (1983) ( $D_A$ )

A distância angular (BHATTACHARYYA, 1946) permite-nos representar duas populações na superfície de uma hiper-esfera e medir a extensão de diferenciação através do ângulo que estas formam, a partir das duas linhas projectadas da origem para as duas

populações sobre a hiper-esfera. Um dos problemas fundamentais desta distância é não estar linearmente relacionada com o tempo evolutivo.

A partir de simulações realizadas em computador, NEI *et al.* (1983) chegou à conclusão que a distância dada por:

$$D_A = 1 - \frac{1}{r} \sum_j \sum_i^{m_j} \sqrt{x_{ij} y_{ij}}$$

Onde  $m_j$  e  $r$  são o número de alelos do *locus j* rastreados respectivamente e  $x_{ij}$  e  $y_{ij}$  são as frequências do alelo no estado  $i$  no *locus j* na população X e Y, respectivamente.

Esta fórmula é muito útil ao cálculo da forma (topologia) de uma árvore evolutiva, sempre que a estimação se realiza a partir de frequências génicas.

Sabendo que esta expressão pode variar de 0 a 1, pode deduzir-se que ela não está linearmente relacionada com o número de substituições génicas. Porém, quando o valor de  $D_A$  é pequeno, ela evolui quase de uma forma linear com o tempo evolutivo.

### 5.5.7 – DISTÂNCIA ANGULAR DE CAVALLI-SFORZA (1967)

Esta distância faz parte de um conjunto de distâncias na qual incluímos a anterior  $D_A$  as quais evoluíram da distância inicialmente estudada por BHATTACHARYYA (1946) e neste caso desenvolvida por CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967)  $D_c$ .

De uma forma simplificada esta distância e a anterior  $D_A$  estão baseadas num modelo de evolução, centrado na soma dos produtos das frequências dos alelos partilhados entre duas populações, que no caso de um simples *locus* a distância toma a seguinte forma:

$$D = c \left\{ 1 - \sum_i (x_i y_i)^a \right\}^b \quad \text{onde } x \text{ e } y \text{ são as frequências alélicas do tamanho } i \text{ nas}$$

populações  $x$  e  $y$  respectivamente e  $a$ ,  $b$  e  $c$  são constantes, que variam conforme a distância em causa. Para o caso da  $D_c$   $a$  e  $b$  tomam o valor de 0,5 e  $c$  o valor de  $2(2)^3/\pi$ . Para múltiplos *loci* a media das distâncias é calculada sob todos os *loci*.

Sabe-se que deste conjunto de distâncias, ou seja,  $D_A$ ,  $D_C$  e uma outra Chamada *Allele Sharing*  $D_{AS}$ , ainda não foi provada uma diferença significativa na precisão da reconstrução filogenéticas, em Modelos de Mutação em *Stepwise* (SMM) embora se verifique que a  $D_C$  é ligeiramente menos precisa quando comparada com a  $D_A$  (TAKEZAKI e NEI, 1996).

Antes de se passar a descrever as distâncias usadas para estudos evolutivos, será importante referir que a distância  $D_A$  (NEI *et al.*, 1983), juntamente com as distâncias *Allele Sharing*  $D_{AS}$  (STEPHENS *et al.*, 1992) e *Chord*  $D_C$  (CAVALLI SFORZA e EDWARDS, 1967), formam um conjunto de distâncias que, embora não façam parte dos modelos utilizados em estudos evolutivos, os quais se baseiam em Modelos de Mutação em *Stepwise* (SMM), nem reflectam o tempo evolutivo quando se estudam populações muito próximas, comportam-se aceitavelmente na reconstrução de filogenias e algumas vezes melhor até do que os modelos SMM (GOLDSTEIN *et al.*, 1995a). É evidente que estas distâncias não aumentam linearmente com o tempo e à medida que este aumenta elas perdem o interesse. Assim, não reflectem o tempo de divergência, a não ser que as taxas sejam muito próximas. Estas distâncias são muito sensíveis ao tamanho efectivo da população, não sendo recomendadas sempre que se verifique ou suspeite de um efeito de *bottlenecks* (TAKEZAKI e NEI, 1996).

## 5.6 - MEDIDAS DE DISTÂNCIAS UTILIZADAS PARA ESTUDOS EVOLUTIVOS

Se uma distância é usada para estimar o tempo relativo de divergência entre populações, é essencial que ela satisfaça a condição de aumentar linearmente com o tempo e que beneficie de um coeficiente de variância baixo. Para a construção de filogenias, a combinação da linearidade e da variância determinam a *performance* dessa distância (GOLDSTEIN e POLLOCK, 1994 e POLLOCK e GOLDSTEIN, 1995).

Em geral, estas distâncias são construídas de forma a obter-se uma linearidade e uma boa precisão, assumindo um determinado modelo de evolução. No entanto, não deverá ser de descorar um certo desacordo, que muitas vezes aparece entre estes dois últimos parâmetros (GOLDSTEIN e POLLOCK, 1994 e POLLOCK e GOLDSTEIN, 1995).

Antes de passarmos às fórmulas mais recentes das distâncias genéticas utilizadas em estudos evolutivos, faz-se uma pequena revisão histórica das distâncias mais utilizadas para este fim.

### 5.6.1 - COEFICIENTE $F_{ST}$

Esta distância (WRIGHT, 1951) foi inicialmente elaborada para um número elevado de populações, reflectindo o tempo evolutivo ( $t$  gerações atrás), considerando que não houve migrações, que o tamanho efectivo da população é  $N$  e que os acasalamentos se deram ao acaso. As frequências génicas de cada população flutuam de geração para geração, por causa da deriva genética, mesmo na ausência de mutação e selecção.

$$F_{ST} = 1 - e^{-\frac{1}{2N}}$$

Não podemos definir o coeficiente anterior como uma distância genética, visto estar definido para um grande conjunto de populações. Para um par de populações, a distância genética virá dada pela seguinte expressão:

$$F_{ST} = \frac{(x_1 - y_1)^2}{2z_1(1 - z_1)}$$

Onde  $x_1$  e  $y_1$  são a frequência de  $A_1$  na população X e Y, respectivamente, e  $Z_1 = (x_1 + y_1)/2$ .

Mais tarde, LATTER (1972) melhorou esta distância, considerando duas populações com alelos múltiplos em vários *loci*.

CAVALLI-SFORZA, em 1969, recorreu ao coeficiente  $F_{ST}$  e, aplicando-lhe uma transformação angular, obteve outra expressão que denominou de “ $f\theta$ ”. Em termos de distância genética, esta expressão mostra várias deficiências pois, particularmente quando se trata de alelos múltiplos, o valor de “ $f\theta$ ” difere do de  $F_{ST}$ . Sempre que nos referimos a um longo tempo evolucionário, não se pode descorar o facto da existência de mutação, facto que esta função não toma em consideração. Deste modo, a relação entre “ $f\theta$ ” e  $t$  só é aproximadamente linear quando o tempo evolucionário é pequeno.

### 5.6.2 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS QUE TÊM POR BASE O NÚMERO DE SUBSTITUIÇÕES DE GENES (NEI, 1972)

O fundamento deste método consiste no facto de que uma diferença alélica, detectada por mobilidade electroforética ou por reacção imunológica, é causada, pelo menos, por um *codon* diferente a nível do gene. Assim, a média das diferenças nos *codons*, por *locus*, pode ser estimada pela frequência alélica. Uma vez que este número é uma medida directa das diferenças a nível dos genes, estas representaram uma boa medida das distâncias genéticas entre populações (NEI, 1972). Não sendo de descorar o facto de nem todas as diferenças poderem ser detectadas pelas técnicas bioquímicas, há a necessidade de se multiplicarem por 3 ou 4.

Do que foi anteriormente referido, surgem as distâncias a seguir discriminadas.

### 5.6.3 - DISTÂNCIA GENÉTICA MÍNIMA ( $D_m$ )

Esta distância tem como principal desvantagem subestimar as diferenças de codons, principalmente quando a distância é grande. Deverá ser apenas usada para comparar populações intraespecíficas.

### 5.6.4 - DISTÂNCIA GENÉTICA MÁXIMA ( $D'$ )

Esta distância tem em conta que a taxa de substituição não é a mesma para todos os *loci*, embora seja muito afectada por erros de amostragem. Quando se estudam raças locais, dentro de uma mesma espécie, o valor de todas estas diferenças é muito próxima.

Por fim, NEI *et al.* (1976) apresentam a **distância  $D_v$**  que admite que as substituições por *locus* variem ao longo dos *loci*, segundo uma distribuição  $\gamma$ , com um coeficiente de variação igual a 1. Esta distância tem a grande vantagem de não ser muito afectada por erros de amostragem.

Nos últimos anos, os microssatélites têm sido usados na análise de filogenias (BOWCOCK *et al.* 1994; ROY *et al.* 1994 e DEKA *et al.* 1995), devido ao facto das elevadas taxas mutacionais poderem fornecer bastantes informações, tanto em espécies relacionadas, como em subpopulações da mesma espécie (BOWCOCK *et al.*, 1994). Verificando-se que muitos destes *loci* estão sujeitos a um esquema mutacional, que segue o modelo mutacional *Stepwise*, ou seja, que os alelos podem sofrer mutações em pequenos números de repetições, na direcção do aumento ou da diminuição (SCHÖTTERER e TAUTZ, 1992 e OHTA e KIMURA, 1993), autores como GOLDSTEIN *et al.* (1995b), SHERIVER *et al.* (1995) e SLATKIN (1995) desenvolveram novas distâncias genéticas.

GOLDSTEIN *et al.* (1995b) apresentam a distância  $\bar{\Delta}$  que, comparada com a  $D_{AS}$  e a  $D_S$  (*Standard* de NEI, 1973), mostra uma grande linearidade com o tempo, quando os diferentes *loci* se enquadram num modelo *Stepwise*, sem constricções no tamanho do alelo. Usando simulações, verificou-se que após 100 gerações esta distância mantém uma linearidade com o tempo muito superior às distâncias atrás referidas, sendo útil para populações mais afastadas. Esta distância torna-se redundante, quando o processo de mutação mostra uma forte dependência na unidade de repetição, uma vez que desta forma perde a linearidade com o tempo.

A distância ASD aumenta linearmente com o tempo, sob um modelo não constringido de SMM. O principal problema deste modelo é a elevada variância, parcialmente relacionada com a sua dependência relativamente à variância dentro das

populações. Sempre que se inclui o termo de variância intra populacional, este mascara a relação de separação entre o tempo e o valor conservativo de ASD. A introdução deste termo também torna a distância ASD muito sensível às flutuações no tamanho da população. A distância de GOLDSTEIN *et al.* (1995a),  $(\delta\mu)^2$ , foi elaborada para ultrapassar os problemas associados ao termo da variância. Esta distância aumenta linearmente com o tempo, ao mesmo ritmo da ASD, mas tem uma menor variância, parecendo preferível para as reconstruções filogenéticas e para a estimação do tempo relativo de divergência. Embora a independência desta distância do tamanho da população seja assumida com o pressuposto de que a população é constante, simulações efectuadas em computador mostram que esta distância é muito robusta às flutuações da população.

A distância baseada no modelo de *Stepwise* de SHRIVER *et al.* (1995),  $D_{sw}$ , é semelhante à de ASD (com correcção de variância), mas com um valor absoluto operacional, substituindo a função quadrática na diferença entre o tamanho dos alelos. Esta função deriva de um argumento heurístico, não tendo um aspecto dinâmico explícito. Contudo, a linearidade exacta de ADS implica que  $D_{sw}$  não possa ser linear; esta interferência surge após simulações feitas no computador. De qualquer forma, em determinadas circunstâncias a  $D_{sw}$  tem um baixo coeficiente de variância, que poderá ser preferível para reconstruções filogenéticas sendo, no entanto, extremamente sensível às variações do tamanho das populações.

A linearidade destas distâncias, seguindo o modelo *Stepwise*, não assenta nos pressupostos de *Single Step Sizes*, nem de simetria nas taxas de mutação dos microssatélites. Recentemente, têm-se verificado assimetrias nas taxas de mutação dos microssatélites, o que sugere que, para a reconstrução de filogenias entre organismos mais distantes, haverá dois grandes constrangimentos, sendo um deles o tamanho do alelo (alelos com o mesmo tamanho podem diferir no número de mutações) e a longevidade das propriedades mutacionais dos *loci* microssatélites (GARZA *et al.*, 1996). Segundo estes autores, seria importante poder sequenciar os microssatélites utilizados, a fim de verificar se os motivos de repetição não têm imperfeições. Partindo do princípio que os microssatélites com suficiente longevidade podem ser usados nestes estudos, dever-se-ão impor restrições no número de repetições atingíveis. Ao impor tais restrições, as diferentes distâncias serão afectadas na sua precisão e linearidade com o tempo. Tal facto levou um grupo de autores a apresentar um conjunto de novas distâncias, para tentar fazer um ajuste estatístico à introdução de restrições à amplitude dos microssatélites.

Surgiram assim as distâncias  $D_L$ , de FELDMAN *et al.* (1996), e  $D_{LS}$  e  $D_{GLS}$ , de POLLOCK *et al.* (1988). Embora estes modelos assentem na utilização de microssatélites com fronteiras definidas, estas não estão relacionadas com a taxa mutacional. Desta forma, o período de tempo de separação que um *locus* consegue reflectir com uma certa precisão vai sofrer uma diminuição, sempre que a taxa de mutação aumenta e o número de repetições atingível diminui.

De todas as distâncias e seus pressupostos aqui apresentados e depois de recolher as várias opiniões dos diferentes autores, fica-se com a ideia de que, para populações recentemente separadas, será preferível usar distâncias que utilizem frequência alélicas partilhadas entre as populações, mesmo não mostrando grande linearidade com o tempo de divergência (TAKEZAKI e NEI, 1996). Para populações mais distantes, teremos de usar as distâncias que reflectem o grau de separação entre alelos. As distâncias baseadas em  $(\delta\mu)^2$  não são sensíveis aos níveis de variância, na ausência de definição de amplitude, mas quando se introduz esta definição os *loci* com menores taxas de mutação conseguem ter uma precisão e linearidade com o tempo por períodos de tempo mais longos (GOLDSTEIN e POLLOCK, 1997). Deste modo, conclui-se que para estudos filogenéticos de subespécies é preferível usar microssatélites que tenham uma baixa variância alélica, ocorrendo precisamente o contrário quando falamos de sub-populações dentro da mesma espécie (GOLDSTEIN e POLLOCK, 1997).

Em estudos de relações genéticas entre raças de animais domesticados tem-se usado de uma forma quase generalizada a distância  $D_S$  e a distância de CAVALLI-SFORZA ou a sua transformada, distância  $D_A$ , devido ao melhor comportamento nas reconstruções filogenéticas entre populações próximas do ponto de vista genético (ARRANZ *et al.*, 1998; DIEZ-TASCÒN *et al.*, 2000; BJORNSTAD *et al.*, 2001 e CAQÑON *et al.*, 2001).

## 5.7 - ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os métodos quantitativos especialmente construídos para as análises filogenéticas foram apresentados, pela primeira vez, na conferência internacional de genética, que se desenrolou em Haia, no ano de 1963 (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1964), com o objectivo de estudar dados baseados em frequências génicas de populações humanas.

É vulgar considerar a reconstrução de uma árvore filogenética como uma forma de representação estatística de uma árvore real que se desconhece. Existem dois processos envolvidos nestas deduções: um deles relaciona-se com a estimação da topologia da árvore

e o outro com o comprimento dos ramos. Quando a topologia é conhecida, a estimação estatística do tamanho dos ramos é relativamente fácil. O principal problema reside na construção da topologia. Geralmente, o número de topologias é enorme, surgindo muitas vezes uma grande dificuldade na escolha da mais apropriada.

A metodologia utilizada nas deduções filogenéticas pode ser dividida em 3 grandes grupos: métodos das distâncias, métodos de verosimilhança e métodos de parsimônia.

Nos métodos filogenéticos em que usam distâncias, é computadorizada uma distância evolutiva para todos os pares de sequências e a árvore filogenética é construída a partir de distâncias emparelhadas, usando os seus quadrados mínimos, a evolução mínima ou outros critérios. As distâncias evolutivas usadas para este fim constituem geralmente uma estimação do número de nucleótidos ou aminoácidos substituídos por sítio, mas outras medidas de distâncias podem igualmente ser usadas.

### **5.7.1 - MÉTODO DOS QUADRADOS MÍNIMOS**

O principal deste método é computadorizar as diferenças dos quadrados, entre pares de distâncias observadas para uma topologia determinada e escolher a topologia que mostrar a menor soma dos quadrados das diferenças.

Segundo CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967), este método, tanto numa forma ordinária como de uma forma mais generalizada pode ser usado com frequências génicas, com as quais FICH e MANGOLIASH (1967) o utilizaram de uma forma ponderada. Mais tarde, BULMER (1991) formalizou e implementou este método de uma forma mais generalizada, para dados de DNA e sequências proteicas. Este método muitas vezes dá comprimentos negativos dos braços das árvores. Principalmente por esta última razão a precisão da topologia obtida não é particularmente alta (SAITOU e NEI, 1986, 1987, SOURDIS e KRIMBAS, 1987 e KUHNER e FELSENSTEIN, 1994). Uma das formas de resolver este problema passa pela imposição da restrição dos ramos não poderem ser negativos.

### **5.7.2 - MÉTODO DA MÍNIMA EVOLUÇÃO**

Neste método, o comprimento de um ramo é estimado por um algoritmo de pares de distâncias e a soma total dos comprimentos dos ramos é computadorizada para cada uma das possíveis topologias. A topologia que mostrar o menor valor da soma dos ramos será escolhida como a árvore mais adequada (CAVALLI-SFORZA, 1963). RZHETSKY e NEI (1997) desenvolveram uma forma deste método para DNA ou sequências proteicas, o que

permitiu simplificar o algoritmo computacional. Estes mesmos autores, em 1994, apresentaram o fundamento teórico para este método, mostrando que o valor de S é menor para a topologia verdadeira, quando se utilizam estimadores sem desvios de nucleótidos ou substituições a nível de aminoácidos como distâncias genéticas. É evidente que isto só tem significado se se usar um elevado número de nucleótidos ou aminoácidos.

Este método exige um tempo de computação muito grande e muitas vezes, recorrendo mesmo à soma dos ramos em valor absoluto, obtêm-se valores de comprimento dos ramos negativos (devido a erros estatísticos), mesmo em topologias correctas. Nestes casos, será melhor recorrer ao método dos mínimos quadrados.

Para obviar ao tempo de computação, RZHETSKY e NEI (1994) sugerem a utilização do método *Neighbour Joining* (NJ) para encontrar uma topologia, a partir da qual se vai verificar um certo número de topologias próximas da primeira, até se encontrar a que tenha o menor valor de S. Um novo conjunto de topologias próximas da árvore de evolução mínima são novamente observadas, para se encontrar a árvore com menor valor de S. Este processo continua até não se encontrarem árvores com valores de S menores. De todas as árvores observadas, a que mostrar menor S será a árvore da evolução mínima.

A base teórica que fundamenta este processo é a de que a árvore da evolução mínima é geralmente idêntica ou próxima da NJ, quando m é relativamente pequeno (SAITOU e IMANISHI, 1989 e RZHETSKY e NEI, 1992). Desta forma, a árvore NJ pode ser usada como ponto de partida quando m é grande. KUMAR (1996) desenvolveu um novo algoritmo para obter a árvore de evolução mínima, estendendo o algoritmo NJ de forma a examinar várias potenciais árvores de evolução mínima. Embora este método não examine todas as topologias possíveis, simulações feitas a partir do computador mostram que quase sempre se consegue examinar a árvore verdadeira, mesmo que m seja grande.

### **5.7.3 - ANÁLISE FOUR-CLUSTER**

Este método é uma aplicação da teoria da evolução mínima (RZHETSKY e NEI, 1993), que permite lidar com um grande número de espécies de cada grupo de organismos (sendo o número de grupos igual a 4), sempre que cada grupo seja reconhecido como monofilético e não requeira nenhuma informação referente à ordem de ramificação dos organismos dentro dos grupos. Supondo que A, B, C e D são quatro grupos monofiléticos e que A, B, C e D contêm, respectivamente,  $m_A$ ,  $m_B$ ,  $m_C$  e  $m_D$  sequências, então existem três possíveis árvores sem raiz dos grupos, ou seja,  $T_1=[(AB) (CD)]$ ,  $T_2=[(AC) (BD)]$  e  $T_3=[(AD) (BC)]$ , sendo uma delas a correcta. Espera-se que esta árvore tenha a menor soma de comprimento dos ramos. Se considerarmos  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$ , como a soma respectivamente do

comprimento dos ramos das árvores  $T_1$ ,  $T_2$  e  $T_3$ , para computadorizar  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$  há que conhecer as relações filogenéticas de todas as sequências dentro dos grupos. Este problema deixa de se pôr, pois apenas necessitamos de computadorizar as diferenças  $S_1-S_2$ ,  $S_1-S_3$  e  $S_2-S_3$ , as quais podem ser computadorizadas por um simples algoritmo, sem haver necessidade de conhecer as relações filogenéticas dentro dos grupos (NEI, 1996).

#### **5.7.4 - MÉTODO DA VIZINHANÇA PRÓXIMA (NJ)**

Este método é uma versão simplificada do método da evolução mínima, para inferir a bifurcação de uma árvore (SAITOU e NEI, 1987). São identificados pares próximos, ou vizinhos, de unidades taxonómicas, tendo como objectivo, minimizar, o comprimento total da árvore. Um par de vizinhos é definido como sendo duas unidades conectadas por um único nó, numa árvore bifurcada (NEI, 1996 e WEIR, 1996). Neste método, o valor de  $S$  (comprimento do ramo) não é computadorizado para todas algumas topologias diferentes, sendo apenas incorporado num algoritmo, pelo que, só é produzida uma árvore final. A computação da soma  $S$  começa com uma filogenia em estrela, na qual todos os ramos interiores têm o valor zero. Esta árvore é claramente incorrecta, pelo que o valor de  $S$  ( $S_0$ ) é muito maior do que o  $S$  para a árvore verdadeira. O próximo passo é computadorizar  $S_{ij}$  para uma árvore, na qual as sequências  $i$  e  $j$  estão emparelhadas e separadas do resto das sequências que continuam a formar uma árvore em estrela. Se  $i$  e  $j$  são vizinhos, juntos apenas por um nó, então  $S_{ij}$  é menor que  $S_0$ . Assim, computadorizando  $S_{ij}$  para todos os pares de sequências e escolhendo o menor  $S_{ij}$ , podemos identificar um par de vizinhos. Uma vez identificados, são combinados como uma unidade simples e tratados como uma sequência simples no próximo passo. Este processo continua até que os nós multiforcados, são resolvidos em simples bifurcações.

Na prática, todas as medidas de distâncias estão sujeitas a erros estocásticos, o que leva a que a árvore encontrada não seja necessariamente a mais correcta. Para um volume de dados bastante elevados, este método e o da mínima evolução dão valores muito similares. Quando a última condição não se verifica, a árvore NJ pode ser muito diferente da árvore obtida pelo método da evolução mínima. Quando isto acontece, KUMAR (1996) verificou que a árvore NJ pode não ser próxima da verdadeira. De qualquer modo, a alta eficiência do método NJ, na obtenção da árvore pelo método da evolução mínima ou da árvore correcta, parece resultar do facto de, em cada passo sequencial de *Clustering*, o princípio da evolução mínima ser aplicado e a repetição da aplicação deste método reduzir os efeitos dos erros de amostragem na construção da topologia da árvore (NEI, 1996).

### 5.7.5 - MÉTODO DAS DISTÂNCIAS MÉDIAS

Mais conhecido por *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA), este método originalmente desenvolvido para construção de um fenograma (SKAL e MICHENER, 1958), mas que pode ser usado na construção de árvores filogenéticas, sempre que as distâncias utilizadas reflectam uma certa proporcionalidade com o tempo de evolução. O fundamento deste método de determinação de *clusters* é definir a distância *intercluster* como a média de todas as distâncias de pares para membros de dois *clusters*, para além de escolher o par de populações com a mais pequena distância entre os seus membros, originando a mais pequena quebra da árvore (CAVALLI-SFORZA, 1993). TAETENO *et al.* (1982), NEI *et al.* (1983) e SOUNDIS e KRIMBAS (1987) mostraram que, quando a distância estimada está sujeita a grandes erros estocásticos, o UPGMA é muitas vezes superior a outros métodos de matrizes de distâncias em recuperar a árvore verdadeira. Este método tenta estimar uma árvore de espécies ou a árvore génica esperada. Desta forma, recomenda-se o uso de distâncias lineares como a do número de substituições de aminoácidos ou a distância genética *Standard*.

Quando usamos o método do UPGMA com dados moleculares, pressupõe-se que o ritmo da substituição génica esperada é constante. Se as medidas das distâncias utilizadas forem rigorosamente lineares com o tempo de evolução, sem erros, o UPGMA fornece-nos correctamente a topologia e o tamanho dos ramos. Quando a medida da distância está sujeita a erros estocásticos, tanto a topologia como os comprimentos dos ramos poderão ser incorrectos, mesmo que o ritmo da substituição esperado seja constante. Como normalmente não se conhece a topologia correcta, é difícil avaliar os erros de topologia e comprimento dos ramos. Porém, simulações realizadas em computadores demonstraram que o método do UPGMA, na maior parte das vezes, é melhor que outros métodos de matrizes de distâncias na recuperação das árvores verdadeiras de espécies, a não ser que o ritmo de substituição génica varie substancialmente com a linhagem evolutiva (NEI, 1987).

Sabe-se que, uma vez determinada a topologia correcta, o método do UPGMA dá uma estimativa do comprimento dos ramos pelos mínimos quadrados (CHAKRABORTY, 1977).

### 5.7.6 - MÉTODO DE FICH E MARGOLIASH

Quando a taxa de substituição génica varia consideravelmente de linhagem para linhagem, o método anteriormente referido dá uma incorrecta topologia e o comprimento

estimado dos ramos das árvores não têm grande significado. Neste caso, é aconselhável utilizar um método que permita usar diferentes taxas de substituição génica para cada ramo e assim obter uma topologia mais real. Existem vários métodos que podem ser usados com este propósito, um destes métodos é o de FICH e MARGOLIASH (1967). O princípio deste método é o mesmo que o de CAVALLI-SFORZA e EDWARD (1967).

### **5.7.7 - MÁXIMA VEROSIMILHANÇA**

A ideia de usar este método para uma dedução filogenética foi apresentada por CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967). Estes autores tentaram construir uma árvore com dados de frequências génicas, usando o modelo *Brownian Motion (Gaussian Process)*, que se mostrou não muito aconselhável.

Mais tarde, usando agora dados que envolviam sequências nucleótidas, FELSENTEIN (1981) desenvolveu um algoritmo para construir uma árvore filogenética pelo método de máxima verosimilhança (embora com algumas falhas), que vários autores posteriormente desenvolveram e generalizaram, criando e implantando programas para computadores (FELSENSTEIN, 1993; OLSEN *et al.*, 1994 e ADACHI e HASEGWA, 1996). A realidade mostra que os modelos mais sofisticados não dão necessariamente os melhores resultados. É evidente que isto ocorre quando usamos uma simulação para quatro sequências, não sendo claro o que pode ocorrer quando o número de sequências aumenta. A acrescentar a este problema, deve-se ter presente que o padrão de substituição dos nucleótidos varia de sítio para sítio (TARAKA e NEI, 1989) e com o ritmo de evolução (HASEGAWA e HASHIMOTO, 1993 e ADACHI e HASEGAWA, 1995), principalmente quando o tempo de evolução é muito grande. Neste método, ao que sabemos, continua a não ser muito clara a forma como estes factores afectam a topologia estimada. Outro dos problemas, é o tempo de computação necessário. ADACHI e HASEGAWA (1995) usaram um novo algoritmo para contornar este último problema. Este algoritmo é semelhante ao método de *NJ*, exceptuando o facto de se usar o método da máxima verosimilhança para encontrar os vizinhos, em vez de se usar o princípio da evolução mínima. Neste algoritmo parte-se de uma árvore potencial de máxima verosimilhança (decomposição em estrela), a partir da qual as árvores com maiores valores de máxima verosimilhança são procuradas, usando-se outros algoritmos para o arranjo local de ramos. Na prática, o algoritmo da decomposição em estrela parece ser eficiente na obtenção da árvore verdadeira. A relação entre a decomposição em estrela e a exaustiva procura de algoritmos de árvores obtidas pelo

método da máxima verosimilhança, é algo semelhante ao que se passa no método de NJ e a evolução mínima.

### **5.7.8 - MÁXIMA PARSIMÓNIA**

Existem várias versões do método de parsimónia (FELSENSTEIN, 1981), ainda que aqui consideremos apenas a que se usa mais frequentemente para dados moleculares. Este método foi primeiramente utilizado por ECK e DAYHOFF, em 1996, para sequências de nucleótidos (FITCH 1971, 1977). O princípio deste método passa por inferir as sequências de aminoácidos e de nucleótidos das espécies ancestrais e escolher a árvore que requer o número mínimo de mudanças mutacionais. Este método é principalmente utilizado para construir uma topologia e os ramos não são calculáveis, excepto se assumirem certos pressupostos. Se não houver substituições múltiplas em cada sítio mutacional, espera-se que o método de máxima parsimónia gere a topologia correcta, sempre que sejam examinados suficientes sítios de informação parsimónica (KUMAR *et al.*, 1993). Na prática, as substituições nucleótidas estão sempre sujeitas a substituições contrárias e paralelas. Este fenómeno introduz incertezas na dedução da filogenia. Quando estas árvores têm uma topologia e um comprimento de ramos fora do comum, este método pode ter gerado uma topologia incorrecta, mesmo que seja observado um número infinito de nucleótidos (FELSENSTEIN, 1978). Isto pode acontecer se a taxa de substituição dos nucleótidos é constante em todas as linhagens evolutivas (HENDY e PENNY, 1989 e TAKEZAKI e NEI, 1994). Mais, na análise de parsimónia é difícil tratar a dedução filogenética numa rede informática, porque não há um caminho natural para se computadorizar as médias e as variâncias dos números mínimos de substituições. De qualquer maneira, sob certas circunstâncias, o método de parsimónia é suficientemente eficiente para obter a topologia correcta (NEI, 1991). É de notar que este método é o único que pode facilmente tomar em conta inserções e deleções de nucleótidos, os quais muitas vezes dão importantes informações filogenéticas.

## **5.8 - ANÁLISE MULTIVARIADA**

### **5.8.1 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS**

A análise multivariada é um conjunto de métodos estatísticos e matemáticos para analisar, descrever e interpretar as observações multidimensionais. Devido às numerosas aplicações práticas a análise multivariada, tem tido um desenvolvimento crescente nos

últimos anos. Existem vários tipos de análise multivariada tais como: a análise de correspondentes, análise factorial discriminante, análise de componentes principais entre outras (MALLO, 1985).

A análise de componentes principais foi pela primeira vez descrita por KAL PEARSON (1901) e posteriormente desenvolvido por HOTTELING (1933). Mais tarde, RAO (1948) aplicou a análise de componentes principais a estudos antropométricos e CAVALLI-SFORZA (1964) a estudos com frequências génicas humanas.

O principal objectivo da análise de componentes principais é condensar o essencial da informação dada por uma série de variáveis interdependentes, observadas directamente sobre um conjunto de indivíduos, em um número restringido de variáveis fundamentais e independentes. Devendo estas, serem em menor número que as originais, estatisticamente independentes e amplamente significativas. Assim, as novas variáveis apesar de estarem em número mais reduzido, devem explicar a maior proporção possível da variabilidade total (MALLO, 1985). Este método é exploratório, no sentido de que serve para interpretação das observações sem fazer à *priori* nenhuma restrição entre as variáveis ou entre os indivíduos (MALLO, 1985).

O interesse real deste método faz-se sentir, sempre que o número de genes e populações é elevado, podendo-se reter uma proporção relativamente elevada do total da informação genética (40 a 50%) nos dois primeiros componentes principais. O que permite uma grande simplificação, pois um grande número de variáveis é reduzido a uma ou duas dimensões arbitrárias com uma perda de informação razoável e mensurável (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

Outro aspecto interessante deste método é a simples representação gráfica, sempre que não exceder três dimensões. Assim quando se tem, por exemplo,  $n$  genes, será conveniente calcular um primeiro eixo principal no  $n$ -dimensional espaço, formado por todas as  $n$  frequências génicas. Em seguida, calcula-se um segundo eixo ortogonal ao primeiro e cruzando-o ao centro, usando o mesmo critério de minimização da distância dos pontos à nova linha garantindo a ortogonalidade, ou seja, que o segundo eixo não contenha informação presente no primeiro. Assim os dois componentes principais terão uma correlação de zero. Este processo pode continuar-se, mas como já foi referido, a partir da terceira dimensão, a simplicidade de representação gráfica, acaba por se perder (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

Os mapas de componentes principais, de duas ou três dimensões podem suplementar as árvores, mas tendem a gerar conclusões, semelhantes às últimas, não podendo ser

considerados dois métodos de análise inteiramente independentes. A análise de componentes principais pode ser mais adequada, na descrição dos dados relativamente às árvores, quando há trocas genéticas consideráveis entre vizinhos geográficos próximos (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

Os mapas de componentes principais são quase tão populares como as árvores evolutivas. Este método permite-nos recolher em poucos gráficos uma grande parte de informação contida em todos os genes testados. Normalmente os dados relativos a 100 frequências génicas podem ser sumariados para um número de populações com uma eficiência de 20-40%. Substituindo os dados genéticos de uma população por um simples valor numérico, isto é, a primeira análise de componentes principais. Cerca de 60-80% da informação é perdida, mas numa segunda análise de componentes principais pode ser parte desta informação. Tornando-se evidente que a informação obtida desta segunda análise é inferior à sumariada na primeira análise de componentes principais. Podemos continuar com a análise de componentes principais, mas a informação torna-se cada vez mais escassa. Apenas com a primeira e a segunda análise de componentes principais, poderemos obter uma visão excelente das relativas aproximações genéticas de todas as populações (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

Estes métodos têm a vantagem de serem independentes do tipo de marcadores utilizados, da sua dinâmica de mutação, para além de serem especialmente interessantes no caso de estudos de populações da mesma espécie, principalmente conhecendo a existência de migrações entre populações, analisadas num passado recente, caso muito comum nas raças de animais domesticados (MOAZAMI-GOUDARZI e LALOE, 2002).



## **PARTE II - TRABALHO EXPERIMENTAL**

### **1 - MATERIAL E MÉTODOS**

#### **1.1 - ANIMAIS**

Neste trabalho foram amostradas cinco raças autóctones caprinas portuguesas e respectivos ecótipos (Figura 3), descritos pela DIRECÇÃO DE SERVIÇOS DE PRODUÇÃO E MELHORAMENTO PECUÁRIO (1998).

– Raça Bravia

– Raça Serrana

    Ecótipo Transmontano (Trans.)

    Ecótipo Jarmelista (Jarm.)

    Ecótipo Ribatejano (Ribat.9)

– Raça Charnequeira

    Ecótipo Alentejano (Char.A)

    Ecótipo Beiroa (Char.B)

– Raça Serpentina

– Raça Algarvia

Duas raças exóticas foram igualmente amostradas: a Saanan e a Alpina. Relativamente a cada uma destas raças, recolheram-se amostras em 50 animais pertencentes a cabradas “comerciais” existentes na zona de Tábara, província de Zamora (Espanha). Ainda que os animais destas cabradas tivessem diferentes origens, a genealogia de cada um deles era conhecida.

Após contactar as diferentes Associações de Caprinicultores, relacionadas com cada uma das raças autóctones portuguesas acima mencionadas, estabeleceu-se um esquema de recolha de amostras de sangue, que pretendemos fosse o mais aleatório possível, ainda que obedecendo a algumas imposições. Procurou-se que os animais amostrados estivessem registados no livro genealógico da respectiva raça e representassem o melhor possível toda a área geográfica de dispersão dessa mesma raça. Por outro lado, sempre que foi possível, procurou-se que a amostragem obedecesse às recomendações estabelecidas pela

FAO, em 1995, no *Global Project for the Maintenance of Animal Domestic Diversity*. Assim, procurou-se amostrar 50 animais de cada raça. No que se refere aos ecótipos, nem sempre foi possível atingir este número. Por outro lado, embora fosse desejável que o número de cabras e de bodes amostrados fosse equivalente, na prática tal não pôde ser feito, uma vez que existia uma grande desproporção entre machos e fêmeas em todas as cabradas visitadas. Procurou-se igualmente que os animais amostrados não fossem aparentados, em pelo menos uma geração.

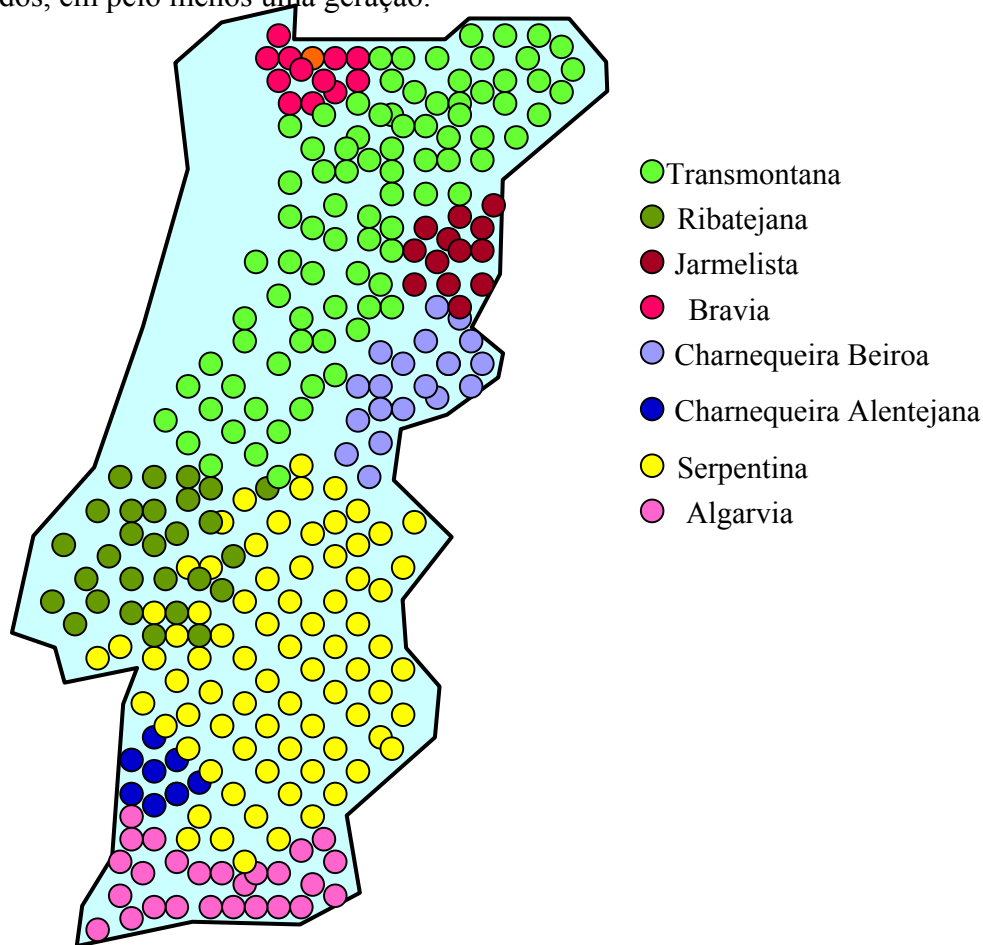


FIGURA 3 - Áreas geográficas das raças e ecótipos caprinos amostrados.

Com o intuito de melhorar a representatividade da amostra, procurou-se não amostrar mais de 10% dos indivíduos de uma mesma cabrada ou dos animais existentes numa determinada aldeia (Quadro VIII). Contudo, em explorações particularmente bem organizadas, com lotes de animais separados inclusivamente de acordo com a sua proveniência, como seja o caso da Herdade da Abóboda (cabras da raça Serpentina), em Serpa, o valor desta percentagem foi ultrapassado.

QUADRO VIII - Locais de amostragens dos caprinos das diferentes raças e ecótipos autóctones estudados

RAÇA	ECÓTIPO	PROCEDÊNCIA	Nº EXPLORAÇÕES
Bravia		Arnal (Vila Real)	6
		Galegos da Serra (Vila Real)	4
		Macieira (Ribeira de Pena)	5
		Lamas de Olo (Vila Real)	11
		Barreiro (Vila Real)	5
		Varzigueto (Vila Real)	6
		Vilar (Vila Real)	12
		Alvadia (Ribeira de Pena)	15
		Cabril (Montalegre)	7
		Picote (Montalegre)	1
		Vilar Cabreiro (Arcos de Valdevez)	2
Serrana	Transmontano	Malta (Macedo de Cavaleiros)	1
		Cortiços (Macedo de Cavaleiros)	1
		Vilarelhos (Alfândega da Fé)	1
		Pombal (Alfândega da Fé)	1
		S. Salvador (Alfândega da Fé)	1
		Gebelim (Alfândega da Fé)	3
		Jou (Murça)	2
		Toubres (Murça)	2
		Freixeda (Murça)	1
		Zebras (Valpaços)	1
		Jarmelista	
S. Pedro do Jarmelo (Guarda)	4		
Carvalhal Meão (Guarda)	2		
Amoreiras do Mondego (Guarda)	4		
Rabaçal (Mêda)	3		
Almeidinha (Guarda)	4		
Qt. da Barroca (Guarda)	1		
Corriscada (Mêda)	3		
Valdeiras (Guarda)	4		
Videmonte (Guarda)	2		

QUADRO VIII - Locais de amostragens dos caprinos das diferentes raças e ecótipos autóctones estudados (continuação 1)

RAÇA	ECÓTIPO	PROCEDÊNCIA	Nº EXPLORAÇÕES
	Ribatejana	Malaqueijo (Rio Maior)	1
		Alcobertas (Rio Maior)	2
		S. Nicolau (Santarém)	2
		Louriceira (Alcanena)	1
		Broqueira (Torres Novas)	1
		Turquel (Alcobaça)	2
Charnequeira	Beiroa	Perais (Vila Velha de Rodão)	1
		Herdade Corgos Soc. Agrícola (Castelo Branco)	1
		Malpica (Castelo Branco)	2
		Tapada do Penolho (Castelo Branco)	1
		Casa Agrícola Abrunhosa (Castelo Branco)	1
		Coto da Várzea (Idanha-a-Nova)	1
		Granja de S. Pedro (Idanha-a-Nova)	1
	Alentejana	Piol de Sines (Sines)	1
		Vale Seco (S. Tiago do Cacém)	2
		S. Tiago do Cacém	2
		Sodo (Vila Nova de Mil Fontes)	1
		Vale Beijinha (Odemira)	1
Serpentina		Vimieiro (Arraiolos)	2
		Herdade da Zambujeira (Crato)	1
		Herdade da Abóboda (Serpa)	1
		Herdade da Doroa-Amigira (Serpa)	1
		Monte dos Bicudos (Almodover)	1

QUADRO VIII - Locais de amostragens dos caprinos das diferentes raças e ecótipos autóctones estudados (continuação 2)

RAÇA	ECÓTIPO	PROCEDÊNCIA	Nº EXPLORAÇÕES
Algarvia		Morreiros	1
		Santa Rita (Vila Real de Sto António)	1
		Carrapateira (Tavira)	1
		Junqueira (Castro Marim)	1
		Odeceixe (Castro Marim)	1
		Azinhal (Castro Marim)	1
		Choça Queimada (Castro Marim)	1
		Magoito (Castro Marim)	1
		Montinho de Odeleite (Casto Marim)	1
		Fornezinhas (Castro Marim)	1
		Arneiro de Lage (Lagos)	1
		Vale do Pereiro (Odeceixe)	1
		S. Bartolomeu de Messins (Silves)	1
		Águas Frias (Loulé)	1
		Salir Tamene (Loulé)	1
		Herdade das Laranjeiras (Loulé)	1
		Ameixial (Loulé)	1
		Zorrinho de Baixo Martim Longo (Alcoutim)	1
		Zorrinho de Cima Martim Longo (Alcoutim)	1

A amostragem de cada animal foi feita em duplicado, mantendo-se os duplicados separados durante o transporte e o armazenamento.

## 1.2 - METODOLOGIA LABORATORIAL

### 1.2.1 - RECOLHA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A recolha de amostras de sangue foi realizada por punção da veia jugular, utilizando para o efeito tubos de ensaio vacuonizados e contendo EDTA. Logo que foi possível, os tubos com sangue foram refrigerados a 4°C. Sempre que o processo de extracção de DNA não pôde ser feito nas primeiras 24 horas pós-recolha, as amostras de sangue foram congeladas a -20°C.

### **1.2.2 - EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO**

O método utilizado foi o descrito por MILLER *et al.* (1988), com algumas modificações. A 10 ml de sangue adicionaram-se 30 ml de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>. De seguida, as amostras foram agitadas durante alguns minutos até se produzir a hemólise, após o que foram centrifugadas a 2.000 g, durante dez minutos, para que os leucócitos sedimentassem. Depois de decantar o sobrenadante, os leucócitos foram aspirados e transferidos para outro tubo de ensaio, onde se realizaram-se vários lavados. As lavagens, realizadas para eliminar o maior número possível de eritrócitos, consistiam na adição de 40 ml de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>, seguida da centrifugação a 2.000 g, durante 10 minutos.

Para libertar o DNA celular, o precipitado final de leucócitos foi digerido com 3 ml de tampão lise (Tris-HCl 1,0 M pH 7,5, EDTA 0,5 M pH 8,2, NaCl 3,0 M, junto com 0,2 ml de SDS 10% e 0,5 ml de solução de proteinase K (Proteinase K -2 mg/ml, SDS 10% e EDTA 20mM). A digestão das células processou-se durante toda a noite, à temperatura controlada de 37°C. Para eliminar as proteínas, precipitaram-se as amostras com 1 ml de uma solução saturada de NaCl 6,0 M, agitando-se durante 30 segundos. Posteriormente, as amostras precipitadas foram centrifugadas a 2.000 g, durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de ensaio e o DNA precipitado com dois volumes de etanol absoluto. De seguida removeu-se o DNA com uma pipeta de *Pasteur* e lavou-se com etanol a 70%, eliminando-se assim os restos de NaCl. Finalmente, o DNA foi ressuspensão em T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> estéril e armazenado a -20°C.

### **1.2.3 - QUANTIFICAÇÃO DO DNA**

A quantidade de DNA extraído foi determinada em função da absorvência do DNA e das proteínas contaminantes a 260 e 280 nm de comprimento de onda, tendo em conta que uma unidade de absorvência corresponde a aproximadamente 50 µl/ml. A medição realizou-se com um espectrofotómetro *Gene Quant II*<sup>®</sup> (*Pharmacia Biotech*).

### **1.2.4 - SELECÇÃO DOS MICROSSATÉLITES E SUA AMPLIFICAÇÃO MEDIANTE PCR**

Sempre que possível, procurou-se que cada marcador se situasse, relativamente aos outros marcadores, em cromossomas diferentes ou que a sua distância dentro do mesmo cromossoma fosse superior a 50 cM. Por outro lado, procurou-se que a sua aplicação não fosse difícil e que a identificação dos genótipos fosse simples. Finalmente, procurou-se que

o seu tamanho fosse diferente dentro dos multiplex realizados, para que facilmente pudessem ser distinguidos.

### 1.2.5 - MULTIPLEX ESCOLHIDOS

Neste trabalho foram utilizados nove *multiplexes* (Quadro IX).

QUADRO IX - Série de nove *multiplex* utilizados neste trabalho

	Sequência 5' → 3	Tamanho (pb)	Temp.* ligação	Cromossoma.	Primer μM	Referências bibliográficas
<i>MULTIPLEX 1</i>						
INRA006	AGGATATCTGTATCAACCTCAGTC	106-120	55°C	BTA1	0,209	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	CTGAGCTGGGGTGGGAGCTATAAATA	OAR		OAR3		Vaiman <i>et al.</i> (1994)
				CHI3		Vaiman <i>et al.</i> (1995)
McM527	GTCCATTGCCTCAATCAATTC	165-175	55°C	BTA5	0,083	Maddox <i>et al.</i> (1996)
	AAACCACTTGACTACTCCCAA	OAR		CHI7		Hulme <i>et al.</i> (1995)
CSSM66	ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	175-255	55°C	OAR14	0,083	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	AATTTAATGCACTGAGGAGCTTTG	OAR		CHI1		Barendse <i>et al.</i> (1994)
						Ma <i>et al.</i> (1996)
ILSTS0011	CTAAAATGCAGAGCCCTACC	261-271	55°C	BTA9	0,209	Brezinsky <i>et al.</i> (1992)
	GCTTGCTACATGGAAAAGTGC	OAR		OAR14		Bishop <i>et al.</i> (1994)
				CHI14		Ma <i>et al.</i> (1996)
<i>MULTIPLEX 2</i>						
McM53	CATGGAGTTGTAGAGTCAGACATGA	75-105	55°C	BTA6	0,250	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	GAGCAAAGGTCATGTCAGGTGT	BTA		CHI6		Vaiman <i>et al.</i> (1994)
						Vaiman <i>et al.</i> (1995)
RM006	CTACAATATCTGGTCACTGGA	116-122	55°C	BTA5	0,250	Maddox <i>et al.</i> (1996)
	GATCACCATATTTATGAGATGG	BTA		CHI5		
BM6526	CATGCCAAACAATATCCAGC	145-190	55°C	BTA27	0,167	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	TGAAGGTAGAGAGCAAGCAGC	OAR		OAR14		Crawford <i>et al.</i> (1995)
				CHI14		
<i>MULTIPLEX 3</i>						
BM8125	CTCTATCTGTGGAAAAGGTGGG	109-123	55°C	BTA17	0,167	Bishop <i>et al.</i> (1994)
	GGGGTTAGACTTCAACATACG	OAR		OAR17		Crawford <i>et al.</i> (1995)
				CHI17		
CSSM031	CCAAGTTTAGTACTTGTAAGTAGA	128-173	55°C	BTA24	0,167	Barendse <i>et al.</i> (1994)
	GACTCTCTAGCATTTATCTGTGT	OAR		OAR23		Crawford <i>et al.</i> (1995)
				CHI7		

Temp.\*-Temperatura.

QUADRO IX - Série de nove *multiplex* utilizados neste trabalho (continuação 1)

	Sequência 5' → 3	Tamanho (pb)	Temp.* ligação	Cromossoma.	Primer μM	Referências bibliográficas
<i>MULTIPLEX 3</i>						
ILTS005	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	181-185 OAR	55°C	BTA10 OAR7 CHI10	0,083	Bishop <i>et al.</i> (1994) Crawford <i>et al.</i> (1995) Ma <i>et al.</i> (1996)
BM1818	AGCTGGGAATATAACCAAGG AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	258-272 OAR	55°C	BTA23 OAR20 CHI23	0,083	Bishop <i>et al.</i> (1994)
<i>MULTIPLEX 4</i>						
McM214	ATTCACAAAGCCGCGCTTG ATCAAGCTCCCCTCTTCGGT	75-103 OAR	55°C	OAR6 CHI6	0,313	Maddox <i>et al.</i> (1996) Hulme <i>et al.</i> (1995)
MAF65	CTACAATATCTGGTCACTGGA GATCACCATATTTATGAGATGG	109-115 BTA	55°C	OAR15	0,250	Crawford <i>et al.</i> (1995)
BM757	TGGAAACAATGTAAACCTGGG TTGAGCCACCAAGGAACC	182-220 OAR	55°C	BTA9 OAR9 CHI14	0,125	Bishop <i>et al.</i> (1994)
<i>MULTIPLEX 5</i>						
SRCRSP12	GTGCCAGGTGACTAACAC AATCTGTGATTTTCATTCATG	81-107 CHI	55°C	nd	0,250	Kogi <i>et al.</i> (1994)
SRCRSP9	AGAGGATCTGGAAATGGAATC GCACTCTTTTCAGCCCTAATG	119-143 CHI	50°C	CHI12	0,250	Bhebre <i>et al.</i> (1994)
SRCRSP5	GGACTTACCAACTGAGCTACAAG TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	158-180 CHI	55°C	CHI12	0,250	Arévalo <i>et al.</i> (1994)
<i>MULTIPLEX 6</i>						
SRCRSP15	GCTTACTTCTGACATGGTATTTCCC TGCCACTCAATTTAGCAGC	183-198 CHI	50°C	nd	0,250	Kogi <i>et al.</i> (1995)
SRCRSP14	GTGAGGAGACAAAAGTTC AGAGTAACCACTGATAGCATATG	119-125 CHI	50°C	nd	0,250	Kogi <i>et al.</i> (1995)
SRCRSP8	TGCGGTCTGGTTCTGATTTAC CCTGCATGAGAAAGTGGATGCTTAG	209-225 CHI	55°C	nd	0,250	Bhebe <i>et al.</i> (1994)
<i>MULTIPLEX 7</i>						
TGLA40	GCTTCTCTGCCAACTAATATTATCC CACCAGGTAAGCCCCTTATATATGT	25 C		CHI29	0,250	Barendse <i>et al.</i> (1994)
ILSTS030	CTGCAGTCTGCATATGTGG CTTAGACAACAGGGGTTTGG	148 C	58-65°C	CHI2	0,250	Kemp <i>et al.</i> (1995)
<i>MULTIPLEX 8</i>						
MAF64	CTCATGGAATCAGACAAAAGGTAGG AATAGACCATTTCAGAGAAACGTTGAC		64°C	CHI1	0,250	Schibler <i>et al.</i> (1988)
ILSTS034	AAGGGTCTAAGTCCACTGGC GACCTGGTTTAGCAGAGAGC	151	53°C	CHI5	0,200	Kemp <i>et al.</i> (1995)

Temp.\*-Temperatura.

QUADRO IX - Série de nove *multiplex* utilizados neste trabalho (continuação 2)

	Sequência 5' → 3'	Tamanho (pb)	Temp* ligação	Cromossoma	Primer μM	Referências bibliográficas
<i>MULTIPLEX 9</i>						
HEL10	CTTTGTGGAAGGCTAAGATG TCCCACATGATCTATGGTGC	193-181 BTA		OAR26	0,250	Bishop <i>et al.</i> (1994)
ANPRC	GCCATCCCTTTCCCTTAATC CCCCACAAAGCTACACCG	209-196 BTA		OAR20	0,150	Bishop <i>et al.</i> (1994)

Temp.\*-temperatura.

A amplificação dos microssatélites realizou-se num termociclador automático (*Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9600 Perkin-Elmer*). A amplificação, de um modo geral, foi realizada com um volume final de 10 μl, obtido a partir de uma mistura que continha os seguintes componentes:

- DNA genómico 10 ng/μl
- 1,5 μl de tampão 10 x (KCl 75 mM, tris-HCl 15 mM, pH 8,5, MgCl<sub>2</sub> 1,75 mM, gelatina 0,002%, dNTPS-dATP, dCTP, DGTP, dTTP - 250 μM)
- Taq DNA polimerase 0,5U/10 μl
- Diferentes *primers*, nas concentrações indicadas no quadro anterior
- Completando-se o volume final de 10 μl, com água Milli-Q.

Nalguns *multiplex* de mais difícil amplificação, as concentrações de Mg<sup>2+</sup> foram ajustadas (adicionando MgCl<sub>2</sub>), assim como as temperaturas de hibridação. A mistura obtida foi então sujeita a diferentes ciclos de temperatura, dentro do esquema geral a seguir apresentado (Figura 4).

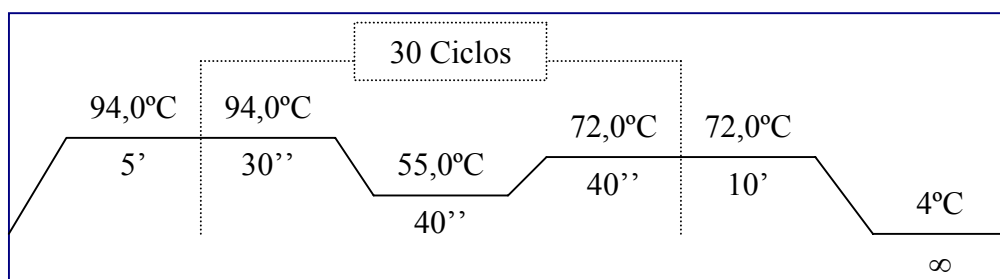


FIGURA 4 – Diferentes ciclos de temperatura aplicados durante a hibridação.

## 1.2.6 - SEPARAÇÃO ELECTROFORÉTICA EM GEL DE ACRILAMIDA

Esta técnica foi utilizada para otimizar as condições particulares de amplificação de cada microssatélite e posteriormente dos *multiplex*. A electroforese realizou-se em géis de 15 cm x 10 cm x 0,5 cm, constituídos por 3% de agarose e 0,5 µg/ml de brometo de etídio, em tampão TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0). A solução de agarose com o tampão TBE aqueceu-se com um agitador magnético, até começar a ebulição. Em seguida, deixou-se arrefecer até aos 60°C com agitação, após o que se adicionou o brometo de etídio. Depois deste se dissolver, verteu-se a solução num molde de plástico, no qual tinha sido previamente colocado um pente com o intuito de “esculpir” pequenos poços para futura colocação da amostra.

O volume da amostra carregada em cada um dos poços correspondia a 10 µl da reacção amplificada, ao que foi adicionado 2 µl de tampão de aplicação (6xFicoll) (SAMBROOK *et al.*, 1989). A electroforese foi realizada num recipiente horizontal, ao qual se adicionou tampão TBE 1x (Tris 90 mM, ácido bórico 90mM e EDTA 2 mM, pH 8,0) até se completar a total imersão do gel, neste último em seguida, ligou-se uma fonte de alimentação, com uma voltagem de 100V durante, aproximadamente, 30 minutos.

Posteriormente, para identificar o produto amplificado, colocou-se o gel num transiluminador de luz ultra-violeta. A reacção considerou-se otimizada sempre que se observavam bandas nítidas e do tamanho esperado. Para estimar o tamanho do produto amplificado utilizou-se um padrão de 50 pb.

### 1.2.6.1 - ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A separação electroforética em gel de acrilamida baseia-se no princípio de que a migração dos alelos de cada microssatélite é tanto maior quanto menor for o seu tamanho. Assim, a distância percorrida por cada microssatélite, comparada com a de um marcador conhecido, permite-nos conhecer o tamanho do microssatélite.

A identificação dos alelos dos marcadores microssatéliticos realizou-se mediante electroforese em gel de poliacrilamida vertical, em condições desnaturantes. Os marcadores foram analisados num sequenciador automático *ALF Express R DNA Sequencer* (*Pharmacia Biotech*). A electroforese realizada neste sequenciador foi controlada por computador e a detecção baseia-se num sinal fluorescente, emitido por uma substância fluorescente chamada CY5 (*Dye Amidite 667*) e que é excitada por um raio laser de Hélio-Neón, de 632 nm de comprimento de onda. A incorporação da dita substância

fluorescente como marcador de um dos iniciadores, permite identificar cada um dos alelos do microssatélite, mediante interpretação do electroferograma. Este consiste num gráfico de picos, sendo que cada um deles corresponde a um sinal fluorescente e portanto a um fragmento do microssatélite.

#### 1.2.6.2 - ELABORAÇÃO DOS GÉIS

Os géis fazem-se numa *cuvette* com as seguintes dimensões: 29,7 cm x 14 cm x 0,5 mm. As placas de vidro foram tratadas com etanol absoluto em ambas as faces internas e depois passadas por água mQ. Após a secagem, foi aplicado um aderente (1 ml de etanol absoluto, 0,25 ml de ácido acético a 10% e 3,75 µl de *bind-silane*) no bordo superior dos vidros, com o objectivo de fixar o gel. Os separadores laterais eram de vidro (0,5 mm), para permitir a passagem do raio laser através do gel.

O gel utilizado foi o *Reprogel* da *Pharmacia*. Este gel, depois de ser introduzido na *cuvette*, entre as duas placas de vidro polimeriza, foi catalisado com raios UV, somente durante 10 minutos. O pente foi colocado, antes da polimerização, na parte superior da *cuvette*. O excesso de gel foi retirado da parte superior e inferior das placas sempre que se mostrou necessário.

O gel foi colocado na unidade de electroforese, à qual tinha sido adicionado 1 litro de tampão (TBE 0,6x) em cada reservatório.

Antes de se carregarem as amostras, os poços foram lavados, um por um, 3 a 4 vezes, a fim de retirar o excesso de ureia existente.

#### 1.2.6.3 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA CARREGAR O GEL

– Diluição do produto de PCR: 1 µl PCR + 2 µl de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>

– Preparação da mistura de carga

2 µl de produto PCR diluído

4 µl de T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>

3 µl formamida

1 µl de marcador interno (*Sizer 300*)

– Desnaturação, a 94°C, durante 3 minutos

– Colocação em gelo.

Uma vez desnaturadas as amostras e colocadas em gelo durante alguns uns minutos, carregaram-se 5 µl de cada amostra no gel que possuía 40 pistas distribuídas da seguinte maneira:

- 36 correspondem a amostras de PCR dos indivíduos
- 3 para animais referência, utilizados para a *Gold Correction*
- 3 marcadores externos com picos cada 50 pares de bases, até 300 pares de bases.

#### 1.2.6.4 - ELECTROFORESE

Finalmente, realizou-se a electroforese em condições de desnaturação, aplicando uma voltagem de 500 V, à temperatura de 50°C, durante uma a duas horas, conforme os microsátélites em causa.

#### **1.2.7 - IDENTIFICAÇÃO E DENOMINAÇÃO DAS VARIANTES ALÉLICAS DOS MICROSATÉLITES**

A análise genotípica efectuou-se com a ajuda de um programa denominado *AlleleLinks* (*Amershambiotech*). Este programa funciona com três padrões: externo, interno e o chamado *Gold correction/Allelic ladders*, que podem ser combinados de várias formas.

Neste estudo, o padrão externo encontrava-se marcado com CY5 e apresentava picos de 50 em 50 pares, até ao limite de 500 pares de bases. Em cada gel carregaram-se três “pistas” de corrida, cada uma com 5 µl, evitando o início e o fim do gel. As “pistas” que continham o padrão externo foram usadas para interpolar as curvas Padrão das restantes pistas do gel. Se usássemos apenas uma “pista” com um padrão externo, todas as “pistas”, teriam a mesma curva padrão. Se duas ou mais pistas contiverem o padrão externo, a curva Padrão para as outras “pistas” será uma média ponderada das curvas padrões das “pistas” com o padrão externo. Por este motivo, optou-se por utilizar três pistas com padrão externo.

Como padrão interno foi utilizada uma sequência de DNA com 300 pares de bases. Como este padrão foi adicionado a todas as amostras e combinado com o padrão externo, as curvas calculadas a partir do padrão externo foram ajustadas de modo a adaptarem-se aos pontos de referência internos. Este ajustamento foi feito para que a soma dos quadrados dos erros relativos ao tempo de migração, para os pontos de referência internos, fosse minimizada.

A correcção *Gold Correction/Allelic Ladders* foi introduzida a partir dos animais de referência para cada microssatélite. Estes pontos *Gold* são do mesmo tipo de DNA das amostras, ou seja, são submetidos aos mesmos efeitos de variação, que o microssatélite a estudar, sendo usados para compensar as diferenças de velocidade de migração entre os pontos de referência (externos e internos) e as amostras.

Depois de se utilizarem as correcções acima referidas, atribuiu-se uma designação a cada um dos alelos, de acordo com o seu tamanho molecular relativo ao dos padrões de referência. Outro ajuste importante foi feito relativamente à identificação das bandas sombra. Desta forma, procurou-se evitar a introdução de erros.

## **1.2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

### **1.2.8.1 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E GÉNICAS**

Como todos os *loci* apresentaram uma hereditariedade codominante, a estimação das frequências genotípicas foi feita através da contagem directa dos alelos observados na amostra. As frequências génicas foram calculadas somando à frequência genotípica dos homocigóticos para um dado alelo, metade da frequência de cada um dos heterocigóticos portadores desse alelo.

### **1.2.8.2 - ANÁLISE DO EQUILÍBRIO HARDY-WEINBERG**

As frequências alélicas, a média observada de heterocigotia e os valores baseados no equilíbrio de HW foram estimados usando o programa *GENETIX* 4.02 (BELKHIR, 2000). Os desvios do equilíbrio de HW foram calculados usando *Exact Tests* (GUO e THOMPSON, 1992), disponíveis no programa *GENEPOP* 1.2 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). Tendo em conta as diferentes populações estudadas e o elevado número de marcadores investigados, utilizou-se o procedimento de BONFERRONI (WEIR, 1996) para determinar o nível de probabilidade em testes múltiplos.

### **1.2.8.3 - HETEROZIGOTIA**

A variação genética dentro de cada grupo de animais analisado foi obtida através do cálculo da heterocigotia em cada *locus* (h) e da heterocigotia média (H). Em ambos os casos foi realizada a estimação a partir das frequências génicas, seguindo o procedimento descrito por NEI (1987), pormenorizado no capítulo dedicado à estatística. O cálculo

de *Hesp.* foi realizado supondo que as populações estavam em HW, utilizando a seguinte fórmula (NEI, 1987):

$$Hesp = 1 - \sum_{i=1}^m Xi^2, \text{ onde } Xi \text{ é a frequência do alelo } i \text{ num locus e } m \text{ é o número de}$$

alelos. Ao analisar *m loci*, a *Hesp.* = *H*

A *Hobs.* é uma medida simples que tanto se pode referir a apenas um *locus* ou a uma média de diferentes *loci*, por contagem directa dos heterozigóticos existentes na amostra.

#### 1.2.8.4 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais foi realizada com recurso ao programa *STATISTICA* para *Windows* 5.1. Com o objectivo de não introduzir informação redundante em cada um dos marcadores analisados, eliminou-se um alelo presente em todas as populações, seguindo-se o indicado na bibliografia para este tipo de análise em populações humanas (CAVALLI-SFORZA, 1994).

#### 1.2.8.5 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS E DENDOGRAMAS

As distâncias genéticas e os dendogramas foram obtidos usando o programa “*Njbafd*” (TAKEZAKI, 1997). Foram calculadas as seguintes distâncias: *Dst* (NEI, 1972) e *D<sub>a</sub>* (NEI *et al.*, 1983). A construção dos dendogramas foi feita usando o algoritmo de *Neighbour-Joining* (NJ) (SAITOU e NEI, 1987). A robustez da topologia dos dendogramas foi testada por *Bootstrap*, incluindo 1.000 replicações.

## 2 - RESULTADOS

### 2.1 - ANÁLISE DOS DIFERENTES MARCADORES

Tal como foi referido no capítulo anterior, neste estudo foram amplificados 26 marcadores. Destes, três acabaram por ser rejeitados, devido ao facto de se mostrarem em desequilíbrio de HW em praticamente todas as populações estudadas.

Como os marcadores foram amplificados e sujeitos a separação electroforética em *multiplex*, a ordem de apresentação dos resultados da variabilidade dos microssatélites reportar-se-á a cada *multiplex*.

#### 2.1.1 - MULTIPLEX IMCI (INRA006, MCM527, CSSM066 E ILST011)

Neste multiplex foram retirados os marcadores McM527 e CSSM06, pelas razões anteriormente apontadas. Relativamente aos dois marcadores que restaram e que se apresentam no electroferograma da Figura 5, podemos afirmar que apresentaram uma boa amplificação, com tamanhos distintos e picos com algumas diferenças, o que ajudou a uma melhor identificação.

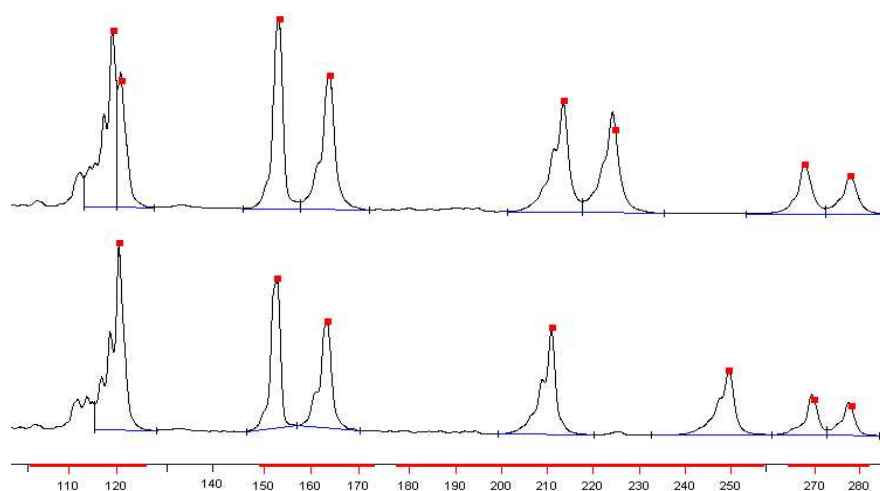


FIGURA 5 – Electroferograma correspondente ao multiplex IMCI (INRA006, McM527, CSSM66 e ILSTS011).

##### 2.1.1.1 - INRA006

Este marcador mostrou um sinal relativamente forte, os seus alelos caracterizaram-se por um pico alto, seguido de dois outros bem definidos, sucessivamente mais pequenos, correspondentes a bandas de deslizamento (*slippage*).

Neste marcador identificou-se um número máximo de 11 alelos (Quadro I do Anexo 1), num universo de 412 amostras de DNA amplificadas, com tamanhos que variaram entre 102-126 pb (Quadro I do Anexo 1), com uma periodicidade de 2 pb. Dentro das raças estudadas, a Serrana foi a que mostrou o maior número de alelos (11), enquanto que o menor número de alelos (9) foi encontrado nas raças Algarvia, Bravia e Saanen (Quadro I do Anexo 1).

O microssatélite INRA006 apresentou uma distribuição alélica gráfica semelhante nas raças Bravia, Charnequeira, Serpentina e Serrana (Figura 1 do Anexo 2). Nestas raças, o alelo mais frequente foi o de 112 pb, atingindo a frequência máxima de 0,650 na raça Bravia. Nas restantes raças, ainda que as distribuições alélicas gráficas não tenham diferido muito umas das outras, o alelo mais frequente não tinha o mesmo tamanho em nenhuma delas: Algarvia 118 (0,239), Saanen 120 (0,417) e Alpina 116 (0,290).

Após consulta do Quadro II do Anexo 1, verifica-se que este marcador apresentou desequilíbrio de HW nas raças Bravia, Charnequeira e Serrana. O  $n_e$  oscilou entre 2,62 e 6,58 (Quadro III do Anexo 1). É de salientar que, para o mesmo número de alelos (9), enquanto que a raça Algarvia apresentou um  $n_e$  igual a 9,75, a Bravia apresentou um  $n_e$  de apenas 2,62.

#### 2.1.1.2 - ILSTS011

Como se pode observar no electroferograma, embora a intensidade dos picos deste marcador não tenha sido muito elevada não houve qualquer problema na identificação dos diferentes alelos.

Das várias raças em estudo, 384 amostras de DNA foram amplificadas, tendo-se identificando um total de 11 alelos. O tamanho destes alelos variou entre 264 e 286 pb, com uma periodicidade de 2 pb. O maior número de alelos registou-se na raça Serrana (10) e o menor na raça Saanen (6). A raça Algarvia mostrou possuir 8 alelos neste marcador e as restantes raças 7 alelos. Este marcador mostrou ainda possuir dois alelos exclusivos, um na raça Bravia (264 pb) e outro na raça Serrana (286 pb).

Nas diferentes raças estudadas, o microssatélite ILSTS011 apresentou uma distribuição alélica gráfica muito semelhante (Figura 1 do Anexo 2). O alelo mais frequente não tinha o mesmo tamanho em todas elas, ainda que tivesse assumido apenas dois valores distintos – 276 e 278 pb. Assim, o alelo de tamanho 276 pb tinha uma frequência de 0,429 na raça Algarvia, de 0,354 na raça Serpentina e de 0,320 na raça

Serrana. Por seu turno, o alelo 278 pb atingiu a frequência de 0,408 na raça Bravia, de 0,437 nas raças Charnequeira e Saanen e de 0,354 na raça Alpina.

Após observação do Quadro II do Anexo I, verifica-se que este marcador apresentou desequilíbrio de HW nas raças Algarvia e Serrana. O valor do  $n_e$  variou de 3,17 a 5,31, atingindo o seu valor mínimo na raça Charnequeira (3,17) e o máximo na raça Serrana (5,31) (Quadro III do Anexo 1).

### 2.1.2 - MULTIPLEX MRB (McM53, RM006 E BM6526)

Neste *multiplex*, dois marcadores apresentaram picos muito intensos e um apresentou uma amplificação algo mais débil (Figura 6). Por outro lado, observaram-se artefactos e fenómenos de deslizamento, o que de certa forma tornou a identificação dos alelos mais morosa.

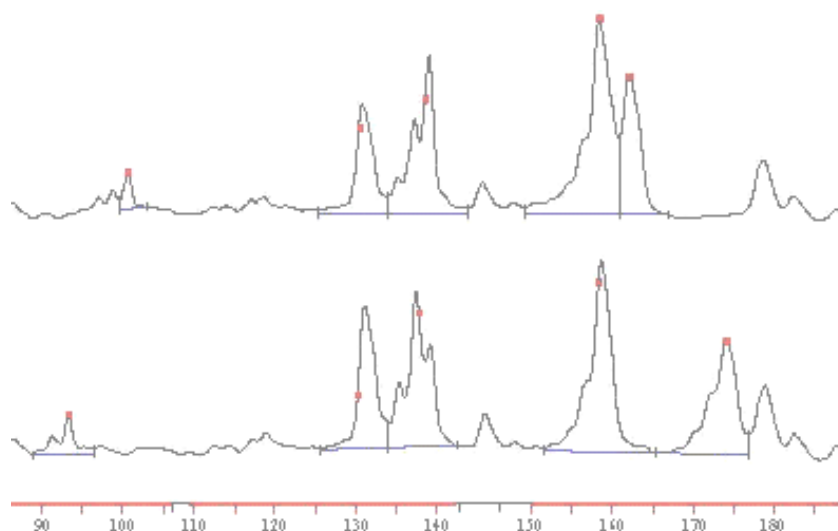


FIGURA 6 – Electroferograma correspondente ao multiplex MRB (McM53, RM006 e BM6526).

#### 2.1.2.1 - McM53

A amplificação deste *locus* apresentou um pico menos intenso do que o dos outros dois *loci* do mesmo *multiplex*. Este marcador mostrou possuir três picos sucessivamente menores, nem sempre identificáveis em todos os animais, sinal da presença das denominadas bandas sombras.

Deste *locus* foram obtidas 409 amplificações de DNA, tendo o tamanho dos 14 alelos identificados variado entre 80 e 106 pb (Quadro I do Anexo 1), com uma periodicidade de 2 pb. O número mínimo de alelos foi encontrado na raça Saanen (7) e o máximo na raça

Algarvia (12). Valores intermédios foram encontrados nas raças: Bravia (8), Charnequeira (9), Serrana e Alpina (10) e Serpentina (11).

Com o microssatélite McM53, as distribuições alélicas gráficas revelaram-se semelhantes em algumas raças. Assim, as raças Charnequeira e Bravia possuíam um padrão de distribuição alélica muito semelhante (Figura 2 do Anexo 2), sendo o alelo mais frequente (92 pb) o mesmo nas duas raças, com frequências de 0,356 e 0,383, respectivamente. Nas raças Serpentina e Serrana, o alelo mais frequente foi o mesmo (92 pb) das raças anteriormente referidas. Contudo, estas raças possuíam um segundo alelo de tamanho igual a 90 pb, também com elevadas frequências (Figura 2 do Anexo 2). Nestas raças, o padrão de distribuição alélica assemelhou-se mais a uma distribuição bimodal. Nas raças Saanen e Alpina, a distribuição alélica foi claramente bimodal (Figura 2 do Anexo 2), continuando a ser o alelo 92 pb o mais frequente (0,330 e 0,320, respectivamente). Nestas raças, o segundo alelo mais frequente foi no entanto diferente, embora tivesse o mesmo tamanho (100 pb). A raça Algarvia apresentou uma distribuição alélica gráfica diferente da de todas as outras raças (Figura 2 do Anexo 2) e tinha como alelos mais frequentes o 86 pb, com uma frequência de 0,264, e o 84 pb, com uma frequência de 0,245.

Em nenhuma das raças estudadas, este microssatélite apresentou desequilíbrio de HW.

O  $n_e$  oscilou entre 3,83 (Bravia) e 6,28 (Serpentina). É de salientar o facto do  $n_e$  na raça Bravia ter sido muito baixo, relativamente ao número de alelos deste *locus* (11), comparativamente ao da raça Saanen que, embora só tivesse manifestado um total de 7 alelos, apresentou um  $n_e$  igual a 5,00.

#### 2.1.2.2 - RM006

Através do eletroferograma representado na Figura 6, pode-se observar a morfologia típica dos alelos deste marcador. Assim, em cada alelo, observaram-se três picos sucessivamente mais pequenos, que nalguns animais se tornaram quase imperceptíveis, devido ao reduzido tamanho do electroferograma. Nestes casos, o electroferograma foi sujeito a um *Zoom*, de forma a possibilitar uma apreciação destes picos com mais nitidez. Imediatamente depois do intervalo de variação deste *locus* e imediatamente antes do próximo marcador, apareceu uma amplificação inespecífica, que em nada prejudicou a identificação dos diferentes alelos.

As 14 variantes alélicas, encontradas a partir de 416 amostras de DNA amplificadas, possuíam um tamanho que variou entre 112 e 140 pb (Quadro I do Anexo 1). Nas diferentes raças estudadas, o número de alelos observados variou entre 8 (Saanen) e 14 (Serpentina). As restantes raças apresentaram o seguinte número de alelos: 10 (Alpina), 11 (Bravia), 12 (Algarvia e Serrana) e 13 (Charnequeira).

Nas raças Algarvia e Bravia, o microsatélite RM006 apresentou o mesmo alelo (130 pb) mais frequente (0,366 e 0,531, respectivamente), de tamanho relativamente mediano. Nestas duas raças, a distribuição gráfica dos restantes alelos foi bastante semelhante (Figura 2 do Anexo 2). Algo parecido ocorreu nas raças Serpentina e Serrana, pois o alelo de maior frequência (0,219 e 0,305, respectivamente) era o mesmo e a distribuição alélica gráfica era muito semelhante (Figura 2 do Anexo 2). Por fim, agruparam-se as raças Charnequeira, Saanen e Alpina, pois embora o alelo mais frequente não tivesse o mesmo tamanho em nenhuma delas, o padrão de distribuição gráfica dos restantes alelos não foi distinto (Figura 2 do Anexo 2).

Das várias raças estudadas, apenas a Serpentina mostrou desequilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 3,45 (Bravia) e 7,71 (Serpentina) (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.2.3 - BM6526

O electroferograma deste marcador mostrou uma morfologia parcialmente semelhante ao anterior, no que respeita à existência de três picos. Porém, neste marcador, os três picos tornaram-se gradualmente mais pequenos e menos perceptíveis do que sucedeu no marcador anterior. Há que referir ainda a existência de um artefacto dentro da amplitude de variação deste marcador, o que de certa forma complicou um pouco mais a identificação dos alelos.

Foram identificados 18 alelos, num universo de 409 amostras de DNA amplificadas, com tamanhos que variaram entre 106-126 pb (Quadro I do Anexo 1). O número de alelos nas diferentes raças estudadas variou entre 10 (Alpina) e 16 (Algarvia). Valores intermédios foram encontrados nas raças Bravia e a Saanen (12), Charnequeira (13) e Serpentina e Serrana (15).

Com o microsatélite BM6526, as raças: Bravia, Serpentina, Serrana e Saanen apresentaram, de um modo geral, uma distribuição alélica gráfica semelhante e o tamanho dos alelos mais frequentes em cada uma delas oscilou apenas entre 162 e 164 pb, com

frequências de 0,292; 0,226; 0,336 e 0,277, respectivamente. As raças Algarvia e Charnequeira mostraram uma distribuição alélica gráfica um pouco diferente da das raças anteriormente mencionadas (Figura 3 do Anexo 2). A distribuição alélica gráfica da raça Alpina foi diferente de todas as restantes, tendo o tamanho do seu alelo mais frequente sido de 184 pb, com uma frequência de 0,190 (Figura 3 do Anexo 2).

Este marcador apenas apresentou desequilíbrio de HW na raça Algarvia (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 5,00 (Bravia) e 8,48 (Serpentina) (Quadro III do Anexo 1).

### 2.1.3 - MULTIPLEX BCIB (BM8125, CSSM031, ILSTS005 E BM1818)

Como se pode observar a partir do electroferograma, os três primeiros marcadores deste multiplex apresentaram uma franca amplificação (Figura 7). A amplificação do último marcador revelou-se particularmente débil, embora o seu único pico, em *Zoom*, tenha sido identificado sem dificuldade.

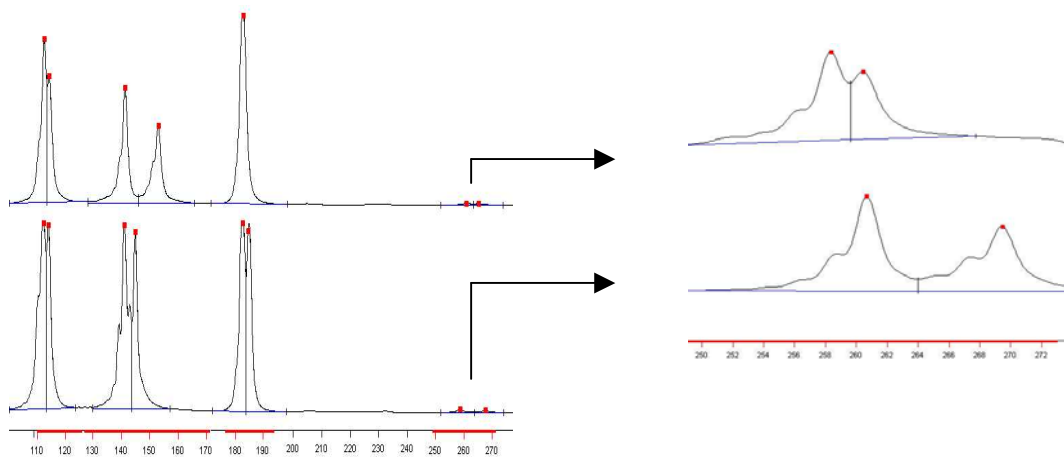


FIGURA 7 – Electroferograma correspondente ao multiplex BCIB (BM8125, CSSM031, ILSTS005 e BM1818).

#### 2.1.3.1 - BM8125

Na identificação deste marcador surgiram algumas dificuldades, dado o facto de este apresentar um pico bastante intenso, seguido de outro de intensidade semelhante, o que poderia, em alguns casos, ter levado à identificação errónea de dois alelos, quando na realidade era apenas a actividade “+A”. Esses casos foram tomados em consideração e analisados de uma forma mais profunda. Por vezes, tivemos que amplificar novamente as amostras provenientes dos animais duvidosos.

Da amplificação de 425 amostras de DNA, foram identificadas 12 formas alélicas, com um tamanho que variou entre 106 e 126 pb (Quadro I do Anexo 1). O número mínimo de alelos foi encontrado na raça Saanen (6) e o máximo nas raças Serpentina e Alpina (10). Valores intermédios foram observados nas raças Bravia e Charnequeira (7) e Algarvia e Serrana (9). Há ainda a referir o facto do alelo de tamanho 108 pb só ter aparecido na raça Alpina (Quadro IV do Anexo 1).

O microssatélite BM1818 apresentou um alelo mais frequente, de dois tamanhos possíveis – 116 pb ou 118 pb –, dependendo da raça autóctone portuguesa em questão. No que concerne às raças exóticas, o alelo mais frequente na raça Saanen tinha 114 pb de tamanho (0,300) e o da Alpina 116 pb (0,300). O alelo de 118 pb atingiu a sua maior frequência (0,402) na raça Serrana. Quanto à distribuição alélica gráfica (Figura 3 do Anexo 2), de um modo geral, pode dizer-se que ela diferiu muito de raça para raça. Porém, as raças Serrana e Serpentina apresentaram uma distribuição alélica gráfica muito semelhante (Figura 3 do Anexo 2).

Este marcador apenas apresentou desequilíbrio de HW na raça Serpentina (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 4,45 e 7,89 (Quadro III do Anexo 1). É de salientar que, frente ao mesmo número de alelos identificados, o valor de  $n_e$  (Quadro III do Anexo 1) encontrado na raça Alpina (5,26) se revelou muito inferior ao observado na raça Serpentina (7,89).

#### 2.1.3.2 - CSSM031

Da observação do electroferograma (Figura 7), resulta claro que a identificação deste marcador não foi prejudicada pela existência de uma banda sombra bastante evidente.

Este marcador foi amplificado em 422 amostras de DNA, de que resultou a identificação de 20 alelos, com um tamanho que variou entre 125 e 167 pb (Quadro I do Anexo 1). Este *locus* revelou-se, assim, um dos mais polimórficos. A raça com maior número de variantes foi a Serrana (19) e as menos polimórfica foram a Algarvia e a Saanen (13). Este marcador apresentou dois alelos exclusivos, um na raça Serrana (125 pb) e outro na raça Saanen (167 pb).

O microssatélite CSSM031 revelou uma distribuição alélica gráfica muito variável entre as raças autóctones portuguesas, excepto no que concerne às raças Charnequeira e Serrana, em que apresentou algumas semelhanças gráficas (Figura 4 do Anexo 2). O alelo mais frequente coincidiu nestas duas raças (141 pb), com frequências de 0,347 e 0,250,

respectivamente. As raças Saanen e a Alpina revelaram uma distribuição parecida, embora a primeira tivesse menos alelos. O alelo 139 pb atingiu as suas maiores frequências (0,240 e 0,190) nas raças exóticas, embora na raça Alpina o alelo 141 pb tivesse igualmente alcançado uma frequência de 0,190. De todas as raças estudadas, a que mostrou ter um alelo com maior frequência (0,348) foi a Charnequeira (Figura 4 do Anexo 2).

Nas várias raças estudadas, o microssatélite CSSM031 mostrou-se em equilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$ , oscilou entre 6,10 e 9,89 (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.3.3 - ILSTS005

O electroferograma confirma a boa amplificação deste *locus* e a identificação de apenas um pico (Figura 7).

Nas 422 amostras de DNA analisadas, 11 alelos diferentes foram identificados. O tamanho destes alelos variou entre 174 e 194 pb (Quadro I do Anexo 1). O número máximo de alelos verificou-se na raça Serrana (10), enquanto que o mínimo foi observado na raça Charnequeira (6). Nove alelos foram encontrados nas raças Algarvia, Bravia e Serpentina.

O microssatélite ILSTS005 mostrou uma distribuição alélica gráficamuito semelhante em todas as raças estudadas (Figura 4 do Anexo 2), tendo sido o alelo mais frequente (182 pb) coincidente em todas elas. Na raça Alpina, o alelo 180 pb atingiu a mesma frequência do alelo 182 pb. Os outros alelos apresentaram uma distribuição gráfica algo diferente. Nas restantes raças, os valores da frequência do alelo 182 pb variaram entre 0,430 (Bravia) e 0,653 (Algarvia) (Figura 4 do Anexo 2).

Em todas as raças estudadas, este microssatélite revelou-se em equilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 6,10 e 9,89 (Quadro III do Anexo 1). Nestas raças, quando se comparou o número de alelos com o  $n_e$ , verificou-se que, embora o número de alelos fosse igual (6), a raça Charnequeira apresentava um  $n_e$  inferior ao da raça Alpina, respectivamente, 2,66 e 5,01.

#### 2.1.3.4 - BM1818

Em comparação com os marcadores anteriores, a amplificação deste microssatélite foi algo débil, como se pode observar através da Figura 7. Porém, após *Zoom*, este *locus* revelou um pico de fácil identificação.

De um total de 391 amostras de DNA amplificadas, 12 alelos diferentes foram identificados (Quadro I do Anexo 1). O maior número de alelos (11) foi observado nas raças Algarvia, Serpentina e Serrana. Por seu turno, o menor número de alelos (6) foi observado na raça Saanen. As restantes raças apresentaram números intermédios de alelos.

O microssatélite BM1818 apresentou um alelo mais frequente, com dois tamanhos possíveis – 259 e 261 pb –, dependendo da raça em questão. O alelo 259 pb atingiu a frequência mais elevada nas raças Bravia (0,317) e Saanen (0,470). Já o alelo 261 pb atingiu as frequências mais elevadas nas raças Serrana (0,193), Serpentina (0,226), Alpina (0,230) e Charnequeira (0,288).

Quanto à distribuição alélica gráfica, de uma maneira geral, esta diferiu muito de raça para raça (Figura 5 do Anexo 2). Contudo, as raças Serrana e a Serpentina apresentaram uma distribuição alélica semelhante (Figura 5 do Anexo 2).

De entre as várias raças estudadas, este marcador mostrou desequilíbrio de HW apenas nas raças Algarvia e Serrana (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 3,34 e 9,29. Quando relacionamos o  $n_e$  com o número de alelos observados em cada raça, verificou-se que, em alguns casos, para o mesmo número de alelos, o  $n_e$  tanto atingiu valores elevados como reduzidos (Quadro III do Anexo 1). A título de exemplo, refira-se o sucedido nas raças Bravia (9 alelos,  $n_e= 9,29$ ) e Alpina (9 alelos,  $n_e= 5,77$ ) (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.4 - MULTIPLEX MMB (MCM214, MAF65 E BM757)

Como já foi referido no início deste capítulo, alguns marcadores estudados foram eliminados.

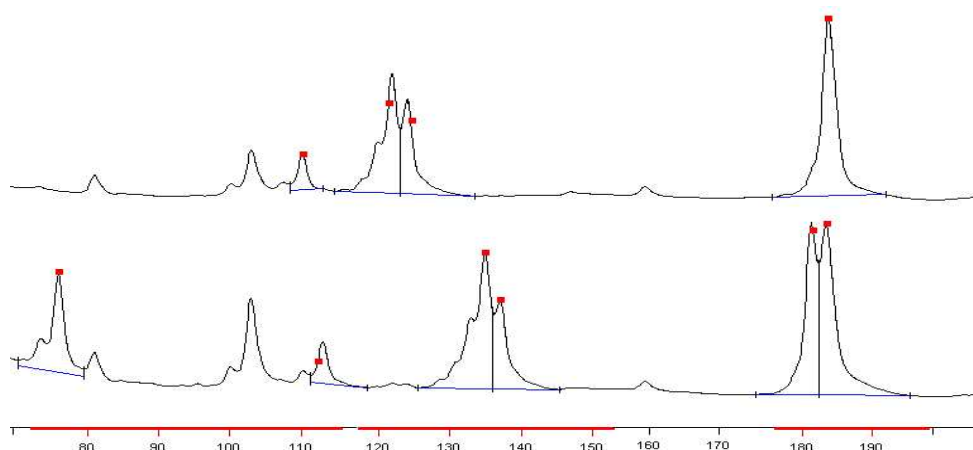


FIGURA 8 – Electroferograma correspondente ao *multiplex* MMB (McM214, MAF65 e BM757).

Neste *multiplex*, o primeiro marcador foi retirado pois, para além de na maioria das raças se mostrar em desequilíbrio de HW, a identificação dos alelos revelou-se bastante complicada, dado o número de artefatos que muitas vezes se confundiam com os verdadeiros alelos. Os outros dois marcadores mostraram um sinal bastante evidente, não tendo existido dificuldades de maior na sua identificação (Figura 8).

#### 2.1.4.1 - MAF65

Da observação do electroferograma (Figura 8), pode-se afirmar que o sinal emitido por este marcador era bastante evidente e que era composto por um pico proeminente, seguido de um outro mais pequeno.

Utilizaram-se 415 amplificações de DNA, que permitiram identificar 14 formas alélicas (Quadro I do Anexo 1). O maior número de alelos foi identificado nas raças Charnequeira e Serrana (14). Por seu turno, o menor número de alelos foi observado nas raças Bravia e Saanen (10).

No microssatélite MAF65, as distribuições alélicas gráficas mostraram-se muito semelhantes em todas as raças estudadas, revelando uma tendência bimodal (Figura 4 do Anexo 2). Desta forma, foram identificados dois grupos de alelos, mais ou menos separados, apresentando cada um deles um alelo predominante (Figura 5 do Anexo 2). As maiores frequências foram quase sempre atingidas no conjunto de alelos do lado direito, excepto na raça Serrana. Assim, os alelos mais frequentes tinham um tamanho de 135 ou 137 pb, podendo atingir frequências que variaram entre 0,235 (Algarvia) e 0,296 (Saanen). No conjunto do grupo de alelos da parte esquerda, dois alelos revelaram-se mais frequentes, apresentando um tamanho de 123 ou 125 pb. De um modo geral, as frequências destes alelos mostraram-se inferiores às do grupo da direita, embora o alelo 123 pb tenha atingido uma frequência de 0,220 na raça Serrana e o alelo 125 pb uma frequência de 0,266 na raça Saanen (Figura 5 do Anexo 2).

O microssatélite em análise apenas apresentou desequilíbrio de HW na raça Bravia (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou de 5,25 a 6,97 (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.4.2 - BM757

As formas alélicas deste marcador podem ser observadas no electroferograma (Figura 8), através do aparecimento de um pico de grande intensidade, seguido de um outro mais pequeno (banda de deslizamento).

A partir das 410 ampliações de DNA, foram identificadas 7 formas alélicas distintas, com um tamanho que oscilou entre 178 e 188 pb (Quadro I do Anexo 1). De todos os marcadores utilizados neste estudo, este foi o que se revelou menos polimórfico (Quadro I do Anexo 1).

O número máximo de alelos foi encontrado na raça Alpina (6), enquanto que o mínimo verificou-se na raça Bravia (3). A raça Serpentina apresentou 5 alelos, sendo o de tamanho 176 pb, com uma frequência de 0,024, exclusivo desta raça.

O microssatélite BM757 apresentou uma distribuição alélica gráfica muito semelhante em todas as raças (Figura 6 do Anexo 2). Também o alelo mais frequente (184 pb) coincidiu em todas as raças, à exceção da Alpina, em que o alelo mais frequente tinha o tamanho imediatamente inferior (182pb). O alelo 184 pb atingiu a frequência máxima de 0,875 na raça Bravia (Figura 6 do Anexo 2).

Neste marcador e nas várias raças em estudo, não se verificaram desequilíbrios de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 1,56 e 2,44 (Quadro III do Anexo 1).

### 2.1.5 - MULTIPLEX SR12, 9, 5 (SRCRSP12, SRCRSP9 E SRCRSP5)

Ainda que a amplificação do primeiro marcador tenha sido mais débil do que a dos restantes dois, este não apresentou grandes dificuldades de identificação. O segundo marcador exigiu um pouco mais de atenção, mas o terceiro foi igualmente de fácil identificação (Figura 9).

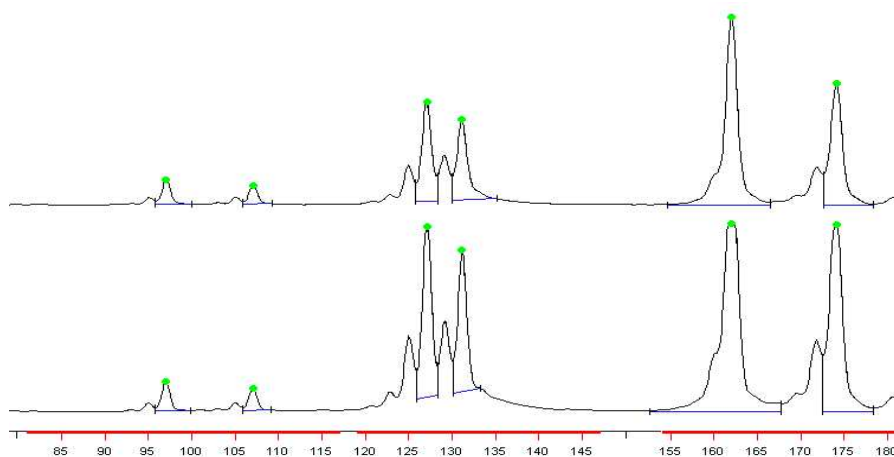


FIGURA 9 - Electroferograma correspondente ao *multiplex* SR12, 9, 5 (SRCRSP12, SRCRSP9 e SRCRSP5).

#### 2.1.5.1 - SRCRSP12

Apesar de em algumas animais este marcador ter mostrado uma amplificação algo débil, as diferentes formas alélicas caracterizaram-se por um pico de fraca intensidade, seguido de um outro ainda menor. Mais uma vez, esteve patente o efeito de deslizamento.

De um total de 401 amostras de DNA amplificado, obtiveram-se 15 formas alélicas distintas, com tamanhos que variaram entre 87 e 117 pb (Quadro I do Anexo 1). O número máximo de alelos (14) foi observado nas raças Algarvia, Bravia, Serpentina e Serrana. Por seu turno, o menor número de alelos (13) verificou-se nas raças Charnequeira, Saanen e Alpina. Verificou-se também que o alelo 117 pb apenas surgiu nas raças autóctones portuguesas.

O Microssatélite SRCRSP12 revelou um padrão de distribuição alélica gráfica que diferiu de raça para raça. Porém, algumas raças puderam ser agrupadas, pois apresentavam um padrão idêntico de distribuição gráfica (Figura 6 do Anexo 2). Assim, embora com uma distribuição alélica complexa, as raças Bravia, Charnequeira e Serrana mostraram um padrão de distribuição alélica gráfica semelhante, ainda que os alelos de maior frequência não tenham sido sempre do mesmo tamanho (97 pb ou 113 pb). O alelo 97 pb atingiu uma frequência máxima de 0,259 na raça Serpentina e o alelo 113 pb de 0,180 na raça Alpina. As raças Serpentina e Saanen revelaram um padrão de distribuição alélica muito semelhante (Figura 2 do Anexo 2), tendo o alelo mais frequente o mesmo tamanho nas duas raças (97 pb). As raças Algarvia e Alpina apresentaram distribuições alélicas gráficas diferentes entre si e das das outras raças (Figura 6 do Anexo 2).

Em nenhuma das raças estudadas, este marcador mostrou desequilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 6,17 e 11,39 (Quadro III do Anexo 1). Comparando o número de alelos observados com o  $n_e$  (Quadro III do Anexo 1), verificou-se que, em alguns casos, para o mesmo número de alelos, o  $n_e$  tomou valores bastante diferentes. Assim, como exemplo, pode-se apontar o sucedido com as raças Charnequeira (13 alelos,  $n_e = 11,39$ ) e Saanen (13 alelos,  $n_e = 6,17$ ) (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.5.2 - SRCRSP9

Como se pode observar através do electroferograma (Figura 9), este microssatélite apresentou uma franca amplificação, com um pico bastante evidente, seguido de um outro mais pequeno que, nalguns casos pontuais, dificultou a identificação dos alelos, obrigando à realização de algumas repetições.

A partir de 414 amostras de DNA amplificado, obtiveram-se 15 formas alélicas distintas, cujo tamanho variou entre 119 e 147 pb (Quadro I do Anexo 1). O maior número de alelos (14) foi observado nas raças Algarvia e Bravia. Por seu lado, o menor número de alelos verificou-se nas duas raças exóticas (11). De salientar o facto do alelo 119 pb ter surgido em exclusivo na raça Algarvia (Quadro I do Anexo 1).

Na maioria das raças estudadas, o microssatélite SRCRSP9 apresentou um alelo mais frequente, cujo tamanho variou, no entanto, em função da raça (Figura 7 do Anexo 2). O alelo com maiores frequências foi o 131 pb, nas raças Saanen (0,420), Serrana (0,389) e Bravia (0,375). Na raça Alpina, o alelo mais frequente tinha um tamanho de 143 pb e uma frequência de 0,1600. A distribuição gráfica dos outros alelos diferiu de raça para raça, assemelhando-se em alguns casos a distribuições bimodais e noutros a unimodais (Figura 7 do Anexo 2).

Em todas as raças em estudo, este *locus* cumpriu o equilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 4,74 (Saanen) e 8,98 (Alpina). Da comparação feita entre o número de alelos observados e o  $n_e$ , dois aspectos mereceram destaque (Quadro III do Anexo 1). Primeiro, a raça Charnequeira, com 12 alelos, mostrou um  $n_e$  muito superior ao da raça Algarvia (que até apresentava um número de alelos mais elevado (14). Por outro lado, a raça Alpina, com apenas 11 alelos, apresentou o  $n_e$  mais elevado (8,98).

#### 2.1.5.3 - SRCRSP5

Este marcador exibiu um pico bastante proeminente, seguido de uma banda sombra muito pronunciada (Figura 9).

Das 415 amplificações de DNA analisadas, 11 alelos foram identificados. O tamanho destes alelos variou entre 160 e 180 pb (Quadro I do Anexo 1). No conjunto das raças estudadas, a Charnequeira e a Serrana foram as que apresentaram um maior número de alelos (11). Por seu turno, a Bravia foi a que apresentou um menor número de alelos (7).

Nas raças autóctones portuguesas e na Saanen, o microssatélite SRCRSP5 apresentou sempre o mesmo alelo (174 pb) mais frequente. Este alelo, nas raças autóctones portuguesas, atingiu sempre frequências elevadas e de valor aproximado (0,500-0,540). Nestas raças, a distribuição gráfica dos outros alelos revelou-se semelhante (Figura 7 do Anexo 2). Na raça Saanen, a distribuição gráfica dos alelos pareceu aproximar-se a uma distribuição bimodal. A raça Alpina apresentou uma distribuição mais complexa, com um alelo (160 pb) de maior frequência (0,300) no limite inferior do intervalo de variação deste locus (Figura 7 do Anexo 2).

No conjunto das raças estudadas, este marcador mostrou-se em equilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 3,17 e 5,64 (Quadro III do Anexo 1). Nas raças Serrana e Serpentina, possuidoras do mesmo número de alelos, o  $n_e$  adquiriu, respectivamente, os valores de 3,57 e 5,64 (Quadro III do Anexo 1). Situação idêntica observou-se entre as raças Serpentina e Alpina.

### 2.1.6 - MULTIPLEX (SRCRSP15, SRCRSP14 E SRCRSP8)

Este *multiplex* apresentou uma boa amplificação do primeiro e terceiro marcadores. Quanto ao segundo marcador, este apresentou uma amplificação bastante débil, da qual apresentamos uma ampliação para melhor apreciação (Figura 10).

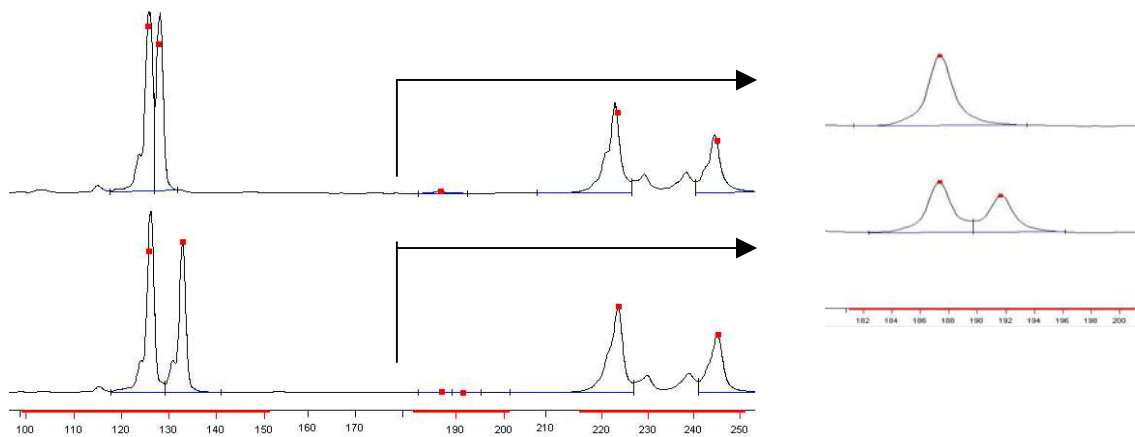


FIGURA 10 – Electroferograma correspondente ao multiplex SR15, 14, 8 (SRCRSP15, SRCRSP14 e SRCRSP8) e ampliação do marcador SRCRSP14.

#### 2.1.6.1 - SRCRSP15

Como podemos observar a partir da Figura 10, o electroferograma do primeiro marcador revelou a existência de um pico de grande intensidade, seguido de dois outros mais pequenos, resultantes de fenómenos de deslizamento. Por outro lado, há ainda a referir a existência de um artefacto, por volta dos 126 pb.

De um universo de 391 amostras de DNA amplificadas, foi possível identificar 11 formas alélicas, cujos tamanhos variaram entre 183 e 201 pb (Quadro I do Anexo 1). A raça que apresentou maior número de alelos foi a Serrana (10). Por seu turno, o menor número de alelos foi detectado na raça Alpina (6). Nesta última raça, há ainda a referir a existência de um alelo exclusivo de 184 pb, com uma frequência de 0,020.

Todas as raças em estudo mostraram uma distribuição alélica gráfica semelhante (Figura 8 do Anexo 2). O alelo mais frequente tinha o mesmo tamanho em todas as raças (187 pb). As raças em que este alelo alcançou maiores frequências foram a Serpentina (0,780), a Charnequeira (0,717) e a Saanen (0,533).

Este marcador apenas mostrou desequilíbrio de HW na raça Serrana (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 1,98 e 4,75 (Quadro III do Anexo 1). Comparando o número de alelos observados com o respectivo  $n_e$ , verificou-se que, apesar da raça Serpentina ter apresentado um número razoáveis de alelos (8), o seu  $n_e$  foi o menor entre o conjunto das raças estudadas.

#### 2.1.6.2 - SRCRSP14

Como já foi anteriormente referido, a fraca amplificação deste marcador levou à necessidade de apresentar uma ampliação deste fragmento do electroferograma (Figura 10). Contudo, este marcador não foi difícil de identificar. Na verdade, ele produziu apenas um pico.

Da análise de 420 amostras de DNA amplificadas, obtiveram-se doze formas alélicas, com tamanhos que variaram entre 117 e 139 pb (Quadro I do Anexo 1). O maior número de alelos foi observado nas raças Bravia e Serpentina (11), enquanto que o menor número de alelos foi identificado nas raças Algarvia, Charnequeira e Saanen (7).

Nas várias raças em estudo, o microssatélite SRCRSP14 revelou como alelo mais frequente o de tamanho 127 pb. Este alelo atingiu as frequências mais elevadas nas raças Algarvia (0,519), Saanen (0,430) e Charnequeira (0,375). Em todas as raças estudadas, verificou-se uma tendência para uma distribuição gráfica semelhante (Figura 8 do Anexo 2).

A lei de HW não se cumpriu nas raças Bravia e Charnequeira (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 3,38 e 8,12 (Quadro III do Anexo 1). Neste marcador, as raças Bravia e Serpentina mostraram o mesmo número de alelos (11) (Quadro III do Anexo 1), embora o  $n_e$  da primeira raça (8,12) tenha sido claramente superior ao da segunda (4,97).

#### 2.1.6.3 - SRCRSP8

Embora o último marcador deste *multiplex* tenha apresentado uma amplificação bastante evidente, com um pico de grande intensidade, frequentemente seguido de um outro, surgiu entre a amplificação dos dois alelos um artefato (235 e 240 pb) que, no

entanto, raramente pôde interferir com as verdadeiras ampliações alélicas, já que este marcador revelou uma verdadeira escassez de alelos nesta gama de tamanhos.

Amplificaram-se 413 amostras de DNA, o que possibilitou a identificação de 12 formas alélicas, com tamanhos que variaram entre 219 e 247 pb (Quadro I do Anexo 1). O maior número de alelos foi encontrado nas raças Bravia e Serrana (10). Por seu lado, o menor número de alelos registou-se na raça Algarvia (6). Nas diferentes raças estudadas, observou-se uma escassez de alelos de tamanhos intermédios e que quando surgiam mostravam frequências muito baixas. Há ainda a salientar a existência de alelos exclusivos nas raças exóticas (Quadro IV do Anexo 1). Assim, a raça Saanen apresentou um alelo exclusivo de 231 pb, embora com uma frequência de apenas 0,010. O alelo exclusivo da raça Alpina tinha 219 pb de tamanho e uma frequência igualmente muito baixa (0,010).

Nas diferentes raças, à excepção da Alpina, o microsatélite SRCRSP8 apresentou uma distribuição alélica gráfica semelhante à bimodal (Figura 9 do Anexo 2). Nestas raças, foram então identificados dois grupos diferentes, com um alelo central mais frequente (Figura 9 do Anexo 2). Porém, ao contrário do que sucedeu com o grupo da esquerda, o grupo da direita demonstrou possuir sempre alelos centrais com frequência elevada. Como exemplo podemos citar a raça Algarvia (245 pb e frequência de 0,448) e a Bravia (243 pb e frequência de 0,294).

Este marcador mostrou desequilíbrio de HW nas raças Bravia e Charnequeira (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 2,57 e 5,94. (Quadro III do Anexo 1). Será ainda oportuno referir que, para o mesmo número de alelos (8), as raças Bravia e Serpentina apresentaram  $n_e$  diferentes, respectivamente, de 5,94 e de 3,17.

### 2.1.7 - MULTIPLEX TI (TGLA40 E ILSTS030)

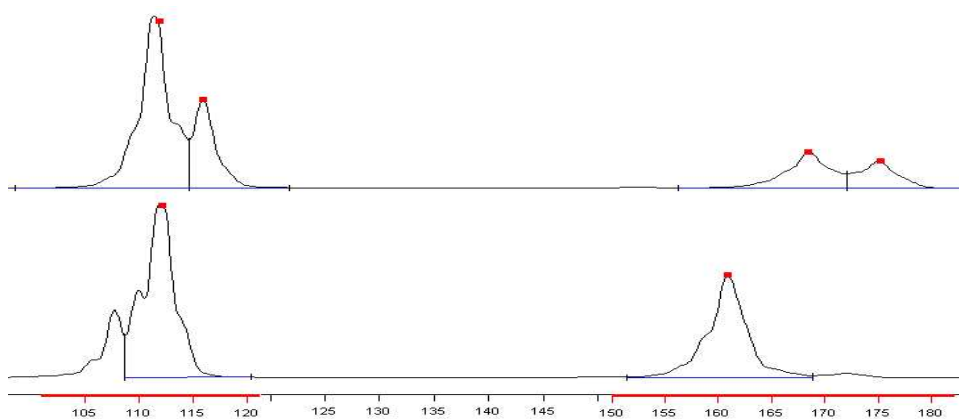


FIGURA 11 – Electroferograma correspondente ao *multiplex* TI (TGLA40 e ILSTS030).

Este *mutiplex* apresentou uma amplificação do primeiro marcador por vezes algo mais complexa, enquanto que no segundo, embora a intensidade dos seus picos fosse inferior, a identificação foi claramente mais simples.

#### 2.1.7.1 - TGLA40

Como se pode observar através da Figura 11, o electroferograma registou um pico bastante acentuado, seguido de dois outros menos marcados, sendo o último realmente um artefacto que, em determinados casos, dificultou a identificação do alelo e tornou necessária a realização de repetições.

Da amplificação de 421 amostras de DNA, identificaram-se 12 alelos distintos, cujos tamanhos variaram entre 95 e 117 pb (Quadro I do Anexo 1). A raça que mostrou maior número de alelos foi a Serrana (12), enquanto que a que apresentou menor número de alelos foi a Bravia (6). O alelo mais frequente nas raças Algarvia, Bravia, Charnequeira, Serpentina e Saanen foi o de tamanho 111 pb, que atingiu a maior frequência na primeira raça referida (0,387). Nas raças Serrana e a Alpina, o alelo de tamanho 105 pb foi o que apresentou maiores frequências (0,228 e 0,170).

Com o microssatélite TGLA40, as raças Algarvia, Bravia, Charnequeira, Serpentina e Saanen apresentaram um padrão de distribuição alélica gráfica semelhante (Figura 9 do Anexo 2). As raças Serrana e Alpina formaram um outro grupo com um padrão de distribuição gráfica semelhante (Figura 9 do Anexo 2).

Este marcador apresentou desequilíbrio de HW nas raças Charnequeira e Serrana (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 4,07 e 8,36 (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.7.2 - ILSTS030

Ainda que este marcador não tenha mostrado picos tão elevados como o anterior, eles acabaram por ser de muito fácil identificação. Apenas nalguns casos mostram uma banda de deslizamento.

De um total de 408 amplificações de DNA, 15 alelos foram identificados, com um tamanho que variou entre 150 e 178 pb (Quadro I do Anexo 1). A raça que mostrou um maior número de alelos foi a Serrana (15) e a que apresentou um menor número de alelos foi a Serpentina (12). As raças Algarvia, Charnequeira, Serpentina e Alpina apresentaram o mesmo alelo mais frequente (162 pb), atingindo este a maior frequência na raça Alpina (0,210). Nas raças Serrana e a Saanen, o alelo mais frequente tinha 164 pb de

comprimento, com frequências muito próximas (0,227 e 0,220). O alelo mais frequente da raça Bravia tinha um tamanho muito diferente do das outras raças (176 pb), com uma frequência de 0,262.

De um modo geral, as distribuições alélicas gráficas das raças Serrana e a Alpina assemelharam-se muito (Figura 10 do Anexo 2). A raça Serpentina, Charnequeira e Saanen apresentaram uma certa assimetria na distribuição da maioria dos alelos para a esquerda (Figura 6 do Anexo 2). Quanto à raça Algarvia, ela apresentou uma distribuição alélica um pouco mais centralizada, relativamente às anteriores (Figura 10 do Anexo 2).

Este marcador só apresentou desequilíbrio de HW na raça Serrana (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 7,44 a 9,45 (Quadro III do Anexo 1).

### 2.1.8 - MULTIPLEX MI (MAF64 E ILSTS034)

Como pode ser observado através da Figura 12, o electroferograma apresentou uma boa amplificação destes dois marcadores que, embora manifestassem fenómenos de deslizamento, em nada prejudicaram a sua identificação.

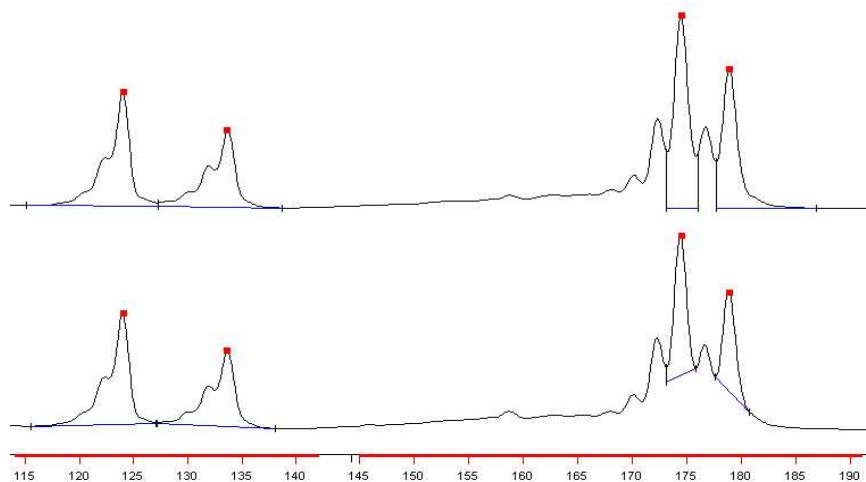


FIGURA 12 – Electroferograma correspondente ao multiplex MI (MAF64 e ILSTS034).

#### 2.1.8.1 - MAF64

A amplificação deste marcador revelou a existência de um pico bem desenhado, seguido de dois outros mais pequenos, consequência de fenómenos de deslizamento. Este marcador não apresentou qualquer dificuldade de identificação.

A partir das 409 amostras de DNA amplificadas, apenas nove alelos foram identificados, com um tamanho que oscilou entre 120 e 136 pb (Quadro I do Anexo 1).

Todas as raças apresentaram 9 alelos, excepto a Algarvia (8) e a Saanen (7). O alelo mais frequente foi o de 124 pb nas raças Algarvia, Charnequeira, Serrana e Saanen, atingindo a maior frequência na raça Algarvia (0,375).

Nestas raças, as distribuições alélicas gráficas revelaram-se muito idênticas (Figura 10 do Anexo 2). Nas raças Bravia, Serpentina e Alpina, os alelos mais frequentes eram de tamanhos diferentes. O padrão de distribuição alélica dos outros alelos variou igualmente muito de raça para raça (Figura 10 do Anexo 2).

Em todas as raças estudadas, este marcador estava em equilíbrio de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 4,64 e 7,02. O  $n_e$  foi mais elevado na raça Saanen (5,14), possuidora de 7 alelos, do que na Algarvia (4,64), detentora de 8 alelos (Quadro III do Anexo 1).

#### 2.1.8.2 - ILSTS034

Como pode ser observado no electroferograma (Figura 12), o último marcador deste multiplex resultou num pico maior, bem delineado, e na presença de dois outros mais pequenos, ainda que um deles também bastante pronunciado. Apesar de tudo, este marcador não apresentou dificuldades de maior na sua identificação.

De 422 amostras de DNA amplificadas, foi possível identificar 16 alelos diferentes, com um tamanho que variou entre 149 e 183 pb (Quadro I do Anexo 1). O alelo mais frequente apresentou o mesmo tamanho (159 pb) em todas as raças, excepto na Alpina (155 pb), tendo atingido a frequência máxima de 0,480 na raça Algarvia. Este marcador exibiu um alelo exclusivo na raça Alpina (184 pb).

A distribuição gráfica dos diferentes alelos foi semelhante em todas as raças, assemelhando-se a uma distribuição bimodal (Figura 11 do Anexo 2). O segundo alelo mais frequente não teve o mesmo tamanho em todas as raças, diferindo apenas de um par de bases. Na raça Alpina, o segundo alelo mais frequente era de tamanho igual ao primeiro das restantes raças. Nesta raça, a distribuição dos outros alelos, embora um pouco diferente das restantes raças, revelou igualmente uma tendência para frequências muito baixas ou mesmo inexistentes, dos alelos de tamanho mediano (Figura 11 do Anexo 2).

Neste marcador a única excepção à lei de HW relacionou-se com a raça Serpentina (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  oscilou entre 3,34 e 7,47 (Quadro III do Anexo 1). Relativamente à comparação do  $n_e$  com o número de alelos observados para cada raça, não houve nada de relevante a salientar.

### 2.1.9 - MULTIPLEX HA (HEL10 E ANPRC)

O primeiro marcador mostrou uma amplificação perfeita (Figura 13), com um único pico bastante evidente. O segundo marcador, embora constituindo um sinal mais fraco, também não causou problemas de identificação.

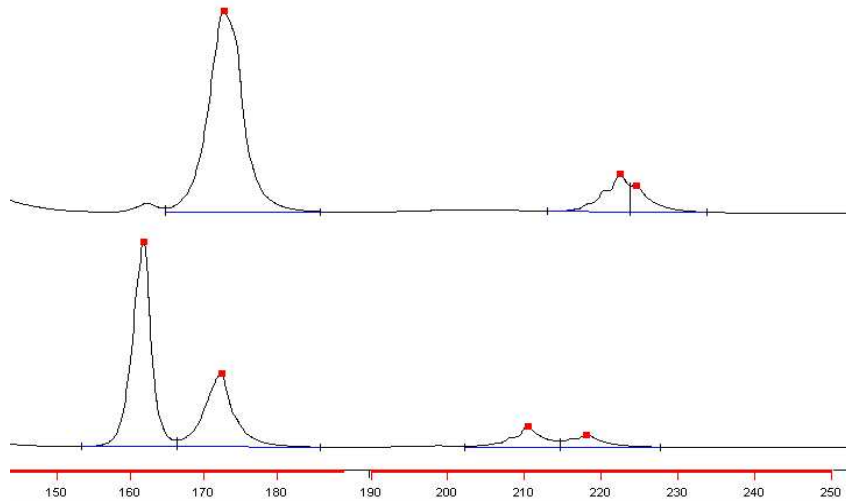


FIGURA 13 – Electroferograma correspondente ao *multiplex* HA (HEL10 e ANPRC).

#### 2.1.9.1 - HEL10

Tal como foi referido, a identificação deste marcador foi muito fácil, uma vez que originou apenas um pico.

De 417 amostras de DNA amplificadas, foi possível identificar 15 alelos distintos, com um tamanho que oscilou entre 155 e 183 pb (Quadro I do Anexo 1). A raça que apresentou um maior número de alelos foi a Bravia (15), enquanto que o menor número de alelos foi identificado nas raças Algarvia e Serpentina (11).

Na raça Algarvia, o microssatélite HEL10 apresentou um alelo de tamanho intermédio (169 pb), que atinge a maior frequência nessa raça (0,189) (Quadro I do Anexo 1). Na raça Alpina ocorreu algo semelhante, embora o alelo mais frequente fosse do tamanho imediatamente superior (171 pb), o que também sucedeu na raça Saanen. Nas restantes raças, o alelo mais frequente era de tamanho bastante inferior ao das raças já citadas (161 pb), ainda que fosse o mesmo em todas elas. Este alelo atingiu a sua frequência máxima na raça Serrana (0,242).

Quanto à distribuição gráfica dos outros alelos, apesar do alelo mais frequente não coincidir nas raças Serpentina, Serrana e Saanen, ela foi muito parecida nas diferentes raças – do tipo bimodal (Figura 11 do Anexo 2).

Nas raças estudadas, este marcador comportou de acordo com a lei de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 7,23 e 9,60 (Quadro III do Anexo 1). Comparando o  $n_e$  com o número de alelos, não houve nada a salientar.

#### 2.1.9.2 - ANPRC

Embora com um sinal mais débil do que o do marcador anterior e de apresentar um pico seguido de outros dois mais pequenos (fenómeno de deslizamento), a identificação deste marcador não foi difícil.

De um total de 387 amostras de DNA amplificadas, este marcador foi, de todos os utilizados neste estudo, o que permitiu identificar um maior número de alelos distintos (23). O tamanho destes alelos variou entre 190 e 240 pb (Quadro I do Anexo 1). As raças em que se distinguiram pelo maior número de alelos (19) foram a Charnequeira e a Serrana. O menor número de alelos foi identificado (13) na raça Algarvia.

O microssatélite ANPRC revelou um alelo de tamanho intermédio (218 pb), que atinge frequências mais elevadas nas raças Charnequeira (0,136), Bravia (0,210), Serpentina (0,225), Serrana (0,225) e Alpina (0,280). Na raça Algarvia, o alelo mais frequente tinha um tamanho inferior ao das raças anteriormente mencionadas. Pelo contrário, na raça Saanen, o alelo mais frequente era de tamanho superior ao dessas raças. A distribuição gráfica dos alelos variou claramente de raça para raça (Figura 12 do Anexo 2). De todas as raças estudadas, a Serrana foi a única que não apresentou o alelo 240 pb que, em algumas raças como na Saanen, atingiu a frequência máxima (0,250) e noutras mediana ou baixa.

Nas diferentes raças estudadas, este marcador comportou-se de acordo com a lei de HW (Quadro II do Anexo 1). O  $n_e$  variou entre 6,81 e 7,90 (Quadro III do Anexo 1). Comparando o número de alelos observados com o  $n_e$ , há que referir que, para o mesmo número de alelos (19), o  $n_e$  tomou valores de 11,21 na raça Charnequeira e de apenas 6,81 na raça Serrana.

Neste estudo, o grupo de microssatélites utilizados possibilitou a identificação de um reduzido número de alelos exclusivos nas diferentes raças estudadas (Quadro IV do Anexo 1). Por sua vez, o número de alelos exclusivos exibidos por cada uma das raças revelou-se igualmente diminuto. As raças que apresentam um número de alelos exclusivos mais elevados foram a Alpina (5) e a Serrana (4). Na grande maioria dos casos, estes alelos apresentam valores extremos e frequências muito baixas, normalmente inferiores a 0,05.

## 2.2 - ERRO PADRÃO DA FREQUÊNCIA ALÉLICA

Em todas as raças, para cada *locus*, foi calculado o erro padrão, ou seja, a raiz quadrada da variância de cada frequência.

A raça que apresentou o erro padrão mais elevado foi a Algarvia (0,053), no *locus* SRCRSP5, com o alelo 174 pb, e no *locus* SRCRSP15, com o alelo 187 pb. Nesta raça, o valor mínimo do erro padrão (0,010) observou-se nos seguintes *loci* e respectivos alelos: ILSTS005 (176, 192 e 194 pb), ILSTS034 (149 e 171 pb), MAF65 (121, 127 e 129 pb), BM8125 (124 e 126 pb), McM53 (100 e 106 pb), RM006 (114 e 134 pb) e ILSTS011 (272 e 274 pb).

A raça com o segundo maior erro padrão foi a Charnequeira (0,051), no *locus* ILSTS011, com o alelo 278 pb. Nesta raça, o valor mínimo do erro padrão (0,009) verificou-se nos seguintes *loci* e respectivos alelos: BM6526 (154 e 178 pb), ILSTS030 (154 pb), ILSTS034 (183 pb), MAF64 (120 pb), MAF65 (121 pb), SRCRSP5 (166 e 180 pb), BM757 (178 pb), CSSM031 (135, 153, 157 e 161 pb), SRCRSP8 (239, 241 e 247 pb) e TGLA (99 pb).

As raças Saanen e Alpina apresentaram valores máximos de erro padrão (0,05) nos *loci* ILSTS005 (182 pb) e BM757 (182 pb). O valor mínimo foi também igual nas duas raças (0,010), tendo surgido nos seguintes *loci* e respectivos alelos: MAF65 (131 pb), TGLA40 (117 pb), RM006 (126 pb) e CSSM031 (129 e 155 pb). Porém, relativamente à raça Alpina, a raça Saanen apresentou um maior número de alelos com o erro padrão mínimo.

As raças Bravia e Serpentina apresentaram valores máximos de erro padrão muito próximos, ou seja, de 0,047 para a raça Bravia, no *locus* ILSTS011, alelo 278 pb, e de 0,046 para a Serpentina, no mesmo *locus*, mas no alelo 276 pb. Nestas raças, o valor mínimo do erro padrão foi de 0,008, sensivelmente no mesmo número de alelos. Em comum, este valor surgiu nos seguintes *loci* e respectivos alelos: SRCRSP8 (239 pb), RM006 (138 pb) e SRCRSP9 (125 pb).

Finalmente, a raça Serrana mostrou os menores valores do erro padrão, máximo e mínimo, quando comparados com as raças anteriores. Assim, o valor máximo do erro padrão foi de 0,038, para os seguintes *loci* e respectivos alelos: HEL10 (161 pb), SRCRSP13 (187 pb) e SRCRSP8 (245 pb). O valor mínimo foi de 0,002, nos seguintes *loci* e respectivos alelos: ILSTS011 (272 pb) e INRA006 (104 pb).

Neste estudo, o tamanho da amostra recolhida variou em função da população estudada. Assim, a partir das frequências alélicas e respectivos erros padrões procedeu-se a uma simulação, para estimação do erro padrão que terá sido cometido em determinada frequência alélica, tendo em conta o tamanho da amostra: 15, 25, 50 ou 100 animais (Figura 14).

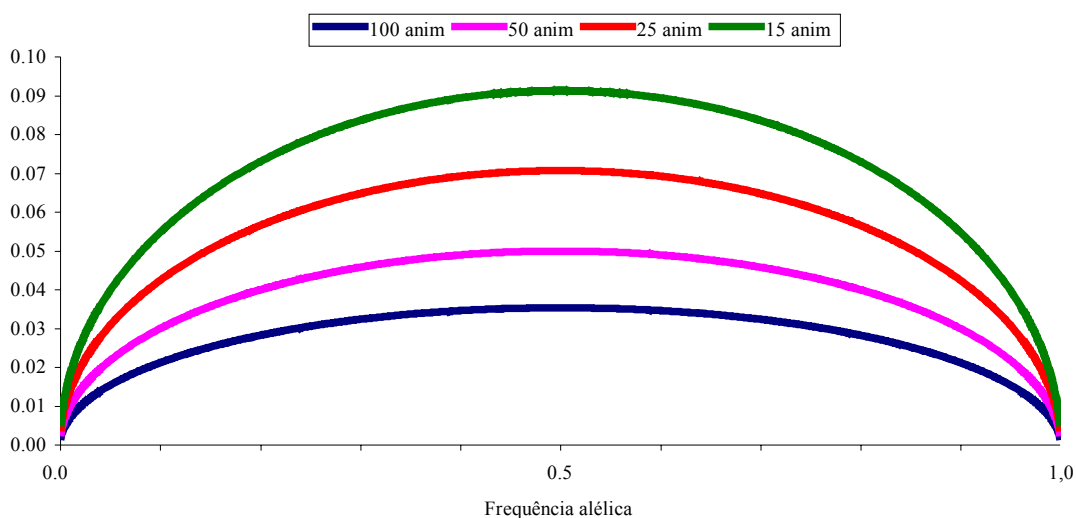


FIGURA 14 - Erro padrão cometido para cada frequência, no caso do tamanho da amostra ser de 100, 50, 25 ou 15 animais.

## 2.3 – ECÓTIPOS

Da análise dos vários marcadores estudados, relativamente aos diferentes ecótipos das raças Serrana e Charnequeira, apenas serão assinalados os factos mais relevantes.

### 2.3.1 - INRA006

O ecótipo mais polimórfico foi o Transmontano, seguindo-se o Ribatejano e por fim o Jarmelista. O alelo mais frequente nestes três ecótipos foi o de 112 pb. Neste marcador, a Charnequeira Alentejana (A) e a Charnequeira Beiroa (B) apresentaram o mesmo número de variantes e o mesmo alelo mais frequente (112 pb) (Figura 13 do Anexo 2).

### 2.3.2 - ILSTS011

Os ecótipos que apresentaram o maior número de alelos (8) foram o Transmontano e o Ribatejano, enquanto que o Jarmelista apresentou apenas 6 alelos. O ecótipo

Transmontano, Ribatejano e Jarmelista exibiram o mesmo alelo mais frequente (276 pb). No ecótipo Jarmelista, é ainda de referir a existência de um outro alelo (268 pb), com a mesma frequência. A distribuição gráfica das frequências alélicas foi muito semelhante no ecótipo Transmontano e Jarmelista, diferindo ligeiramente do Ribatejano (Figura 13 do Anexo 2).

As Charnequeira A e B apresentaram o mesmo número de alelos (6). Nestes dois ecótipos, os alelos mais frequentes diferiram em apenas um par de bases. A distribuição alélica gráfica, como se pode observar na (Figura 13 do Anexo 2), foi semelhante.

### **2.3.3 - McM53**

Com este marcador, o ecótipo que mostrou um maior número de alelos foi o Jarmelista (9 alelos), seguindo-se o Transmontano (8 alelos) e o Ribatejano (7 alelos). O alelo com maior frequência em todos os ecótipos foi o 92 pb, embora no Transmontano se tenha verificado a existência de um outro alelo com igual frequência. Quanto à distribuição alélica gráfica, os ecótipos mais parecidos foram o Transmontano e o Jarmelista, sendo o Ribatejano o que mais se diferenciou em termos gráficos, dos outros dois (Figura 14 do Anexo 2).

As charnequeira A e B apresentaram o mesmo número de alelos (8). O alelo mais frequente foi o mesmo nos dois ecótipos (92 pb). As distribuições alélicas gráficas revelaram-se também semelhantes (Figura 14 do Anexo 2).

### **2.3.4 - RM006**

O ecótipo Jarmelista foi o que mostrou maior número de alelos (11 alelos), relativamente ao Transmontano (8) e ao Ribatejano (7). O alelo mais frequente em todos os ecótipos foi o 130 pb. É de referir a existência, no ecótipo Jarmelista, de um segundo alelo com frequência igual ao do 130 pb. A distribuição alélica gráfica dos ecótipos Jarmelista e Ribatejano foi semelhante. O ecótipo Transmontano foi o que mais se distinguiu em termos gráficos (Figura 14 do Anexo 2).

O ecótipo Charnequeira A apresentou apenas menos um alelo (12) do que o Charnequeira B (13). O alelo mais frequente foi comum aos dois ecótipos (132 pb) (Figura 14 do Anexo 2).

### **2.3.5 - BM6526**

O ecótipo como maior número de alelos foi o Tansmontano (13), seguindo-se o Jarmelista (11 alelos) e finalmente o Ribatejano (9 alelos). O alelo mais frequente foi coincidente nos três ecótipos.

As distribuições alélicas gráficas, como se pode observar na (Figura 15 do Anexo 2), são todas muito semelhantes. O ecótipo Charnequeira A apresentou menos alelos (10) do que o Charnequeira B (12). O alelo mais frequente nos dois ecótipos foi o 164 pb. As distribuições alélicas gráficas destas duas populações foram também muito semelhantes (Figura 15 do Anexo 2).

### **2.3.6 - BM8125**

O ecótipo que mostrou maior número de alelos foi o Transmontano (9), seguindo-se o Ribatejano (7) e o Jarmelista (7). O alelo mais frequente (118 pb) foi o mesmo em todos os ecótipos. As distribuições alélicas gráficas revelaram-se semelhantes nos três ecótipos (Figura 15 do Anexo 2).

O ecótipo Charnequeira B (6 alelos) apresentou menos um alelo (6) do que o Charnequeira A (7). O alelo mais frequente em ambos os ecótipos foi o 118 pb. A distribuição alélica gráfica foi muito semelhante nestas duas populações (Figura 15 do Anexo 2).

### **2.3.7 - CSSM031**

O ecótipo mais polimórfico foi o Transmontano (19 alelos), seguindo-se o Ribatejano (12) e o Jarmelista (11). O alelo mais frequente (141 pb) foi o mesmo nos três ecótipos. A distribuição alélica gráfica foi muito semelhante em todas as populações (Figura 16 do Anexo 2).

O ecótipo Charnequeira A apresentou 12 alelos, enquanto que o Charnequeira B revelou apenas 11. O alelo mais frequente (141 pb) foi o mesmo nos dois ecótipos. As distribuições alélicas gráficas foram muito idênticas (Figura 16 do Anexo 2).

### **2.3.8 - BM1818**

Os três ecótipos da Serrana mostraram o mesmo número de alelos (10). Quanto ao alelo mais frequente, este foi o mesmo nos ecótipos Ribatejano e Jarmelista (161 pb). No transmontano, o alelo mais frequente foi o 277 pb. Como pode ser observado através da

Figura 12 do Anexo 2, os ecótipos Ribatejano e Jarmelista apresentaram distribuições alélicas gráficas muito idênticas sendo, neste caso, a do ecótipo Transmontano a mais distinta das três (Figura 16 do Anexo 2).

A Charnequeira A apresentou menos variantes (7) do que a Charnequeira B (10). O alelo mais frequente (261 pb) foi o mesmo nos dois ecótipos. As distribuições alélicas gráficas revelaram-se um pouco diferentes nos dois ecótipos (Figura 16 do Anexo 2).

### **2.3.9 - ILSTS005**

Relativamente a este marcador, o ecótipo mais polimórfico foi o Transmontano (10) seguindo-se o Jarmelista (6) e finalmente o Ribatejano (5). O alelo mais frequente (182 pb) coincidiu nos três ecótipos, diferindo apenas o número de alelos expresso em cada ecótipo. As distribuições alélicas gráficas foram muito semelhantes (Figura 17 do Anexo 2).

O ecótipo Charnequeira A revelou-se menos polimórfico (4) do que o Charnequeira B (6). Nestes ecótipos, o alelo mais frequente foi o mesmo (182 pb). As distribuições alélicas gráficas mostraram-se semelhantes (Figura 17 do Anexo 2), diferindo apenas no número de alelos exibidos por cada ecótipo.

### **2.3.10 - MAF65**

Os três ecótipos Serranos apresentaram algumas diferenças nas distribuições alélicas gráficas (Figura 17 do Anexo 2). Os alelos mais frequentes não foram coincidentes, diferindo também o número de alelos exibidos por cada ecótipo.

Os ecótipos da Charnequeira mostram o mesmo número de alelos (11). As diferenças observadas nas distribuições alélicas gráficas (Figura 17 do Anexo 2) relacionaram-se com o facto dos alelos de maior frequência serem diferentes nos dois ecótipos.

### **2.3.11 - BM757**

Este marcador, como já foi anteriormente referido, apresentou poucos alelos e as diferenças observadas nos vários ecótipos relacionam-se apenas com diferenças no número de alelos, já que o alelo mais frequente (184 pb) foi o mesmo nos três ecótipos. O ecótipo que apresentou maior número de alelos foi o Transmontano (4), seguindo-se o Ribatejano e finalmente o Jarmelista (3). As distribuições alélicas gráficas foram semelhantes (Figura 18 do Anexo 2).

Os ecótipos da raça Charnequeira comportaram-se de forma muito idêntica aos da raça Serrana, aplica-se aos ecótipos da raça. Porém, neste caso, o ecótipo mais polimórfico foi o Charnequeira B.

#### **2.3.12 - SRCRSP12**

O número de alelos dos ecótipos da Serrana variou entre 14 (Transmontano) e 8 (Ribatejano). O alelo mais frequente diferiu nos três ecótipos. As distribuições alélicas gráficas foram também distintas nos três ecótipos (Figura 18 do Anexo 2).

Quanto aos ecótipos da Charnequeira, o A apresentou menos um alelo do que o B e a sua distribuição alélica (Figura 18 do Anexo 2) revelou uma elevada frequência do alelo 97 pb. No ecótipo B, dois alelos (95 e 97 pb) possuíam frequência máxima, muito inferior à frequência máxima do ecótipo A encontrada no alelo 97 pb. com frequência de 0,217.

#### **2.3.13 - SRCRSP9**

Embora os três ecótipos da raça Serrana tenham apresentado um número de alelos diferente, variando entre 11 (Transmontano) e 7 (Ribatejano), o alelo mais frequente foi o mesmo (131 pb). As distribuições alélicas gráficas também foram semelhantes (Figura 19 do Anexo 2).

O ecótipo Charnequeira A apresentou apenas 8 alelos, enquanto que o Charnequeira B apresentou 11 alelos. O alelo mais frequente diferiu nos dois ecótipos. Porém, as distribuições alélicas gráficas não foram muito diferentes (Figura 19 do Anexo 2).

#### **2.3.14 - SRCRSP5**

As diferenças encontradas nos ecótipos da raça Serrana, relacionaram-se apenas com o número de alelos, que variou entre 6 (Transmontano e Jarmelista) e 9 (Ribatejano). O alelo mais frequente foi o mesmo nos três ecótipos. As distribuições alélicas gráficas foram também muito semelhantes (Figura 19 do Anexo 2).

A Charnequeira A apresentou 7 alelos e a Charnequeira B 10 alelos. O alelo mais frequente foi o mesmo nos dois ecótipos, tendo sido as distribuições alélicas gráficas também semelhantes (Figura 19 do Anexo 2).

#### **2.3.15 - SRCRSP15**

Os ecótipos Transmontano e Jarmelista, embora tenham apresentado um número de alelos diferente, as suas distribuições alélicas gráficas revelaram-se semelhantes (Figura 20

do Anexo 2), tendo o mesmo alelo mais frequente (187 pb). O ecótipo com maior número de alelos foi o Ribatejano (8), sendo o mais frequente de tamanho 185 pb.

Os ecótipos da Charnequeira apresentaram o mesmo número de alelos, o mesmo alelo mais frequente (187 pb) e distribuições alélicas gráficas muito semelhantes (Figura 20 do Anexo 2).

#### **2.3.16 - SRCRSP14**

Os ecótipos da raça Serrana que apresentaram distribuições alélicas gráficas mais parecidas foram os Transmontano e o Ribatejano (Figura 20 do Anexo 2). Apesar do ecótipo Transmontano ter apresentado mais um alelo do que o Ribatejano (8 alelos), ambos apresentaram o mesmo alelo mais frequente (127 pb). A distribuição gráfica do Jarmelista revelou-se um pouco distinta (Figura 20 do Anexo 2), tendo como alelo mais frequente o 133 pb. O número total de alelos deste ecótipo foi de 6.

No que se refere aos ecótipos da Charnequeira, a única diferença evidente relacionou-se com o número de alelos que cada um exibiu. Enquanto que a Charnequeira A exibiu 7 alelos, a Charnequeira B exibiu apenas 5.

#### **2.3.17 - SRCRSP8**

As distribuições alélicas gráficas dos três ecótipos da Serrana foram semelhantes (Figura 21 do Anexo 2), mostrando o mesmo alelo mais frequente. O número de alelos variou entre 9 (Transmontano) e 6 (Jarmelista). No ecótipo Ribatejano, há que salientar a existência de um segundo alelo, com frequência elevada que difere dos encontrados nos outros ecótipos.

As distribuições alélicas gráficas dos ecótipos da Charnequeira foram muito idênticas (Figura 20 do Anexo 2), diferindo apenas no número de alelos, que na Charnequeira A foi de 6 e na Charnequeira B de 9.

#### **2.3.18 - TGLA40**

Os três ecótipos da raça Serrana apresentaram diferentes distribuições alélicas gráficas (Figura 20 do Anexo 2). Assim, o Transmontano exibiu 12 alelos, tendo como alelo mais frequente o tamanho de 107 pb. O ecótipo Jarmelista mostrou apenas 10 alelos e o alelo mais frequente foi o de tamanho 103 pb. Finalmente, o ecótipo Ribatejano apresentou apenas 8 alelos, sendo o alelo mais frequente de tamanho 105 pb.

Os ecótipos Charnequeira A e Charnequeira B apresentaram igualmente distribuições alélicas gráficas diferentes (Figura 20 do Anexo 2), embora tenham exibido o mesmo número de alelos (8) Na Charnequeira A, o alelo mais frequente foi o de 113 pb e na Charnequeira B o de 111 pb.

#### **2.3.19 - ILSTS030**

O ecótipo com maior número de alelos foi o Transmontano (15), seguido do Jarmelista (12) e finalmente do Ribatejano (8). O alelo mais frequente foi o mesmo nos três ecótipos (164 pb), ainda que as distribuições alélicas gráficas tenham variado um pouco em função do ecótipo (Figura 22 do Anexo 2).

Os ecótipos Charnequeira A e Charnequeira B apresentaram distribuições alélicas gráficas um pouco diferentes (Figura 22 do Anexo 2). A Charnequeira A apresentou 14 alelos e o seu alelo mais frequente foi o de 166 pb. A Charnequeira B revelou apenas 13 alelos e o seu alelo mais frequente foi o de 162 pb.

#### **2.3.20 - MAF64**

As distribuições alélicas gráficas dos três ecótipos Serranos revelaram-se ligeiramente diferentes (Figura 22 do Anexo 2). Os ecótipos Transmontano e Ribatejano apresentaram o mesmo número de alelos (8), mas o alelo mais frequente foi diferente nestes dois ecótipos, 134 pb e 124 pb respectivamente. O ecótipo Jarmelista apresentou 7 alelos, sendo o mais frequente de tamanho 124 pb.

As Charnequeiras A e B apresentaram distribuições alélicas diferentes (Figura 22 do Anexo 2). A Charnequeira A exibiu 8 alelos, tendo o mais frequente o tamanho de 124 pb. A Charnequeira B apresentou 9 alelos e o alelo mais frequente foi o de 130 pb.

#### **2.3.21 - ILSTS034**

Dos três ecótipos da raça Serrana, o que apresentou maior número de alelos foi o Ribatejano (13), seguindo-se o Transmontano (12) e finalmente o Jarmelista (10). O alelo mais frequente foi o mesmo em todos os ecótipos (159 pb). As distribuições alélicas gráficas diferiram um pouco umas das outras (Figura 23 do Anexo 2).

Os ecótipos da raça Charnequeira apresentaram distribuições alélicas gráficas muito parecidas (Figura 23 do Anexo 2). A Charnequeira A exibiu apenas 5 alelos, enquanto que

a Charnequeira B apresentou 8 alelos. O alelo mais frequente foi o mesmo nos dois ecótipos (159 pb).

### **2.3.22 - HEL10**

As distribuições alélicas gráficas dos três ecótipos da raça Serrana revelaram-se diferentes (Figura 23 do Anexo 2). O número de polimorfismos variou entre 7 (Ribatejano) e 12 (Transmontano). O alelo mais frequente foi o mesmo em todos os ecótipos (161 pb).

Os dois ecótipos da raça Charnequeira mostraram distribuições alélicas gráficas diferentes (Figura 23 do Anexo 2). A Charnequeira A apresentou 12 alelos, sendo o mais frequente de 161 pb. A Charnequeira B revelou 14 alelos, sendo o alelo mais frequente de 163 pb.

### **2.3.23 - ANPRC**

As distribuições alélicas gráficas dos ecótipos da raça Serrana diferiram entre si (Figura 24 do Anexo 2). O ecótipo Transmontano apresentou 12 alelos, sendo o mais frequente de 216 pb. O ecótipo Jarmelista mostrou 14 alelos, sendo o mais frequente de 218 pb. O ecótipo Ribatejano revelou apenas 9 alelos, sendo o mais frequente de 210 pb.

Os ecótipos da raça Charnequeira apresentaram igualmente distribuições alélicas gráficas distintas (Figura 24 do Anexo 2). A Charnequeira A exibiu 13 alelos, sendo o mais frequente de 220 pb. Por seu turno, a Charnequeira B apresentou 17 alelos, sendo o mais frequente também de 220 pb.

## **2.4 - VARIABILIDADE INTRAPOPULACIONAL E RELAÇÕES GENÉTICAS ENTRE POPULAÇÕES DE CAPRINOS**

Neste capítulo, analisaremos a variabilidade genética através da heterozigose média observada e esperada, tanto por *locus*, como relativamente ao seu valor médio encontrado nas diferentes populações de caprinos estudadas. No estudo das relações genéticas, utilizou-se a análise de componentes principais, as distâncias genéticas e os dendrogramas.

### **2.4.1 - HETEROZIGOTIA MÉDIA OBSERVADA E ESPERADA**

A heterozigotia média observada variou entre  $0,694 \pm 0,033$  (Algarvia) e  $0,773 \pm 0,015$  (Alpina) (Quadro X). O número médio de alelos por *locus* oscilou entre  $9,6 \pm 0,6$  (Saanen) e  $11,9 \pm 0,7$  (Serrana) (Quadro X).

QUADRO X – Parâmetros de variabilidade genética entre *loci*, para as diferentes raças estudadas

Raça	Número médio de alelos/ <i>locus</i>	Heterozigotia média observada	Heterozigotia média esperada
Algarvia	10,3±0,6	0,694±0,033	0,768±0,029
Bravia	9,9±0,9	0,702±0,034	0,760±0,030
Charnequeira	10,4±0,7	0,723±0,030	0,771±0,025
Serpentina	10,9±0,6	0,715±0,033	0,772±0,030
Serrana	11,9±0,7	0,714±0,026	0,795±0,023
Saanen	9,2±0,6	0,739±0,026	0,764±0,020
Alpina	10,2±0,5	0,773±0,015	0,829±0,013

A heterozigotia média observada em cada raça foi sempre inferior à esperada.

Quanto aos parâmetros acima mencionados, pudemos ainda “dividir” a raça Serrana e a Charnequeira nos respectivos ecótipos.

Em todos os ecótipos, com exceção do Charnequeira A, a heterozigotia observada foi sempre inferior à esperada (QuadroV do Anexo1). Os ecótipos mostraram sempre uma heterozigotia média observada superior à das respectivas raças. Por outro lado, nos ecótipos, existiu uma maior proximidade entre a heterozigotia média observada e a esperada.

QUADRO XI - Número médio de alelos/*locus* e heterozigotia média (observada e esperada) nos diferentes ecótipos estudados

Ecótipo	Número médio de alelos/ <i>locus</i>	Heterozigotia média observada	Heterozigotia média esperada
Transmontana	10,6±0,6	0,714±0,028	0,780±0,026
Ribatejana	7,7±0,3	0,710±0,034	0,790±0,028
Jarmelista	8,4±0,5	0,710±0,034	0,716±0,027
Charnequeira A	8,5±0,6	0,743±0,034	0,732±0,031
Charnequeira B	9,4±0,7	0,708±0,033	0,775±0,021

Da análise do Quadro XI, sobressai o facto de um conjunto de *loci* ter apresentado uma maior percentagem de heterozigose média observada, quando comparada com outros marcadores. Deste conjunto, pode-se salientar os *loci* BM6526, CSSM031, SRCRSP12,

MAF64, HEL10 e ANPRC. Este último atingiu valores máximos de heterozigotia nas raças Charnequeira (0,961), Bravia (0,965) e Saanen (0,920). O HEL10 apresentou valores máximos de heterozigotia observada nas raças Saanen (0,920) e Alpina (0,880). O SRCRSP12 revelou uma heterozigotia mais elevada nas raças Bravia (0,888) e Charnequeira (873). Por seu turno, o CSSM031 evidenciou valores de heterozigotia observada elevados nas raças Charnequeira (0,838) e Serpentina (0,832). Finalmente, o BM6526 mostrou valores máximos de heterozigotia observada nas raças Charnequeira (0,815) e Alpina (0,840).

O grupo de marcadores que apresentou médias de heterozigotia mais baixas era formado pelos marcadores: SRCRSP15, com valores que variaram entre 0,287 (Serpentina) e de 0,400 (Charnequeira), BM757, que apresentou valores reduzidos de heterozigotias observadas em todas as raças (0,219 e 0,620) e ILST005, com valores que oscilaram entre 0,521 (Algarvia) e 0,562 (Serpentina). Dentro deste grupo, o marcador BM757 foi aquele que, entre as diferentes raças estudadas, apresentou os valores mais baixos relativos ao  $n_e$  e ao PIC (Quadro III do Anexo 1), tendo os primeiros variado entre 1,56 e 3,02 e para os segundos entre 0,21 e 0,59.

Na maioria dos marcadores, a tendência geral foi no sentido da heterozigotia observada ser inferior à esperada. Porém, nalguns marcadores como o ANPRC, o HEL10 e o ILSTS034 verificou-se exactamente a tendência oposta na maioria das raças analisadas (Quadro V do Anexo 1).

## 2.5 - ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS

A análise de componentes principais permite condensar o essencial da informação obtida, num número mais restrito de variáveis independentes. Através dessas novas variáveis, pode-se descrever as relações existentes entre as populações estudadas.

Neste estudo, a análise de componentes principais efectuou-se a partir das frequências génicas dos alelos independentes (K-1) dos 23 *locus*, em 4 tipos de agrupamentos animais diferentes:

- No primeiro tipo, consideraram-se as cinco raças caprinas autóctones portuguesas conjuntamente com as duas raças exóticas (Saanen e Alpina).

- No segundo tipo, foram consideradas apenas as raças autóctones portuguesas.
- No terceiro tipo, consideraram-se todas as raças estudadas, mas neste caso as raças Serrana e a Charnequeira foram representadas pelos respectivos ecótipos (Transmontano, Jarmelista e Ribatejano) e (Charnequeira A e B).
- O quarto tipo era semelhante ao anterior, tendo apenas sido excluídas as raças exóticas.

No primeiro tipo de agrupamento, a análise de componentes principais teve por base 311-23 alelos independentes, dos 23 *loci* avaliados, nas 7 raças estudadas.

QUADRO XII – Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites: variância explicada e proporção de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais (CP) (raças autóctones portuguesas e exóticas)

	Primeira CP	Segunda CP	Terceira CP
Variância explicada	5,195	0,657	0,379
Proporção de variância explicada	74,22%	9,40%	5,43%
Proporção de variância explicada acumulada	74,22%	83,62%	89,06%

O Quadro XII discrimina a variância explicada e a proporção desta para as três primeiras componentes principais. A percentagem de variabilidade acumulada foi de 89,06%.

Na primeira componente principal verificou-se a intervenção de vinte alelos, com correlações superiores a 0,700 (Quadro XIII). Dos vinte alelos mencionados, os que mostraram uma correlação superior a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o SRCRSP8 245, o SRCRSP85 174, o SRCRSP15 174, o ILST005 182 e o BM757 184.

Na segunda componente participaram 21 alelos, com correlações superiores a 0,700 (valor absoluto). Os *loci* que participaram com correlações superiores a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o INRA006 116, INRA006 112, o RM006 130, o ILSTS034 268, o BM6526 184 e o SRCRSP5 174.

Por último, na terceira componente participaram 18 alelos, também com correlações superiores a 0,700 (valor absoluto). Os *loci* que participaram com correlações superiores a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o RM006 130, o RM006 136 e o INRA006 112.

QUADRO XIII – Análise de componentes principais (CP) para os *loci* microsatélites de cinco raças autóctones e duas exóticas. Valores entre 0,700 e 1,000 dos coeficientes de correlação, entre os alelos e as primeiras componentes principais

Componentes principais (% de variabilidade explicada)	Valores dos coeficientes de correlação: 0,700 a 1,000			
	Positivos		Negativos	
Primeira CP (74,220%)	BM757 184	(0,993)	BM8125 121	(-0,802)
	ILSTS005 182	(0,980)	ANRPC 196	(-0,801)
	SRCRSP15 174	(0,976)	SRCRSP8 231	(-0,797)
	SRCRSP5 174	(0,908)	ANRPC 204	(-0,795)
	SRCRSP8 245	(0,921)	BM757 188	(-0,788)
	ILSTS034 159	(0,887)	ILSTS011 272	(-0,787)
	SRCRSP14 127	(0,887)	SRCRSP14 119	(-0,785)
	ILSTS011 276	(0,829)	SRCRSP15 201	(-0,750)
	McM53 92	(0,807)		
	BM8125 118	(0,752)		
	TGLA40 111	(0,745)		
INRA006 112	(0,745)			
Segunda CP (9,402%)	BM6526 184	(0,974)	SRCRSP5 174	(-0,977)
	ILSTS034 268	(0,966)	RM006 130	(-0,949)
	INRA006 116	(0,905)	INRA006 112	(-0,916)
	ILSTS005 180	(0,848)	ILSTS034 159	(-0,808)
	SRCRSP15 185	(0,817)	BM757 184	(-0,819)
	BM8125 116	(0,798)	HEL10 161	(-0,772)
	SRCRSP5 168	(0,772)	SRCRSP9 131	(-0,759)
	SRCRSP8 243	(0,761)	ANPRC 220	(-0,755)
	ILSTS034 155	(0,740)	TGLA40-111	(-0,743)
	BM6526 188	(0,716)		
	ANPRC 218	(0,712)		
McM53 92	(0,701)			
Terceira CP (5,433%)	INRA006 112	(0,999)	RM006 136	(-0,997)
	RM006 130	(0,947)	INRA006 120	(-0,897)
	SRCRSP15 185	(0,883)	BM1818 259	(-0,878)
	SRCRSP8 243	(0,848)	SRCRSP9 131	(-0,850)
	SRCRSP5-174	(0,824)	SRCRSP8 223	(-0,835)
	BM8125 118	(0,720)		
	MAF64 124	(0,700)		
	BM8125 114	(0,720)		
	ILSTS005 192	(0,743)		
	SRCRSP14 127	(0,765)		
	MAF65 125	(0,788)		
ANPRC 240	(0,811)			
BM6526 158	(0,836)			

Através da Figura 15, que representa graficamente os resultados das diferentes raças autóctones e exóticas estudadas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais, verifica-se que, no plano da primeira componente principal, a qual explica

72,22% da variância, a raça Alpina está claramente separada das raças autóctones portuguesas e da Saanen, encontrando-se esta última ligeiramente afastada das raças autóctones portuguesas.

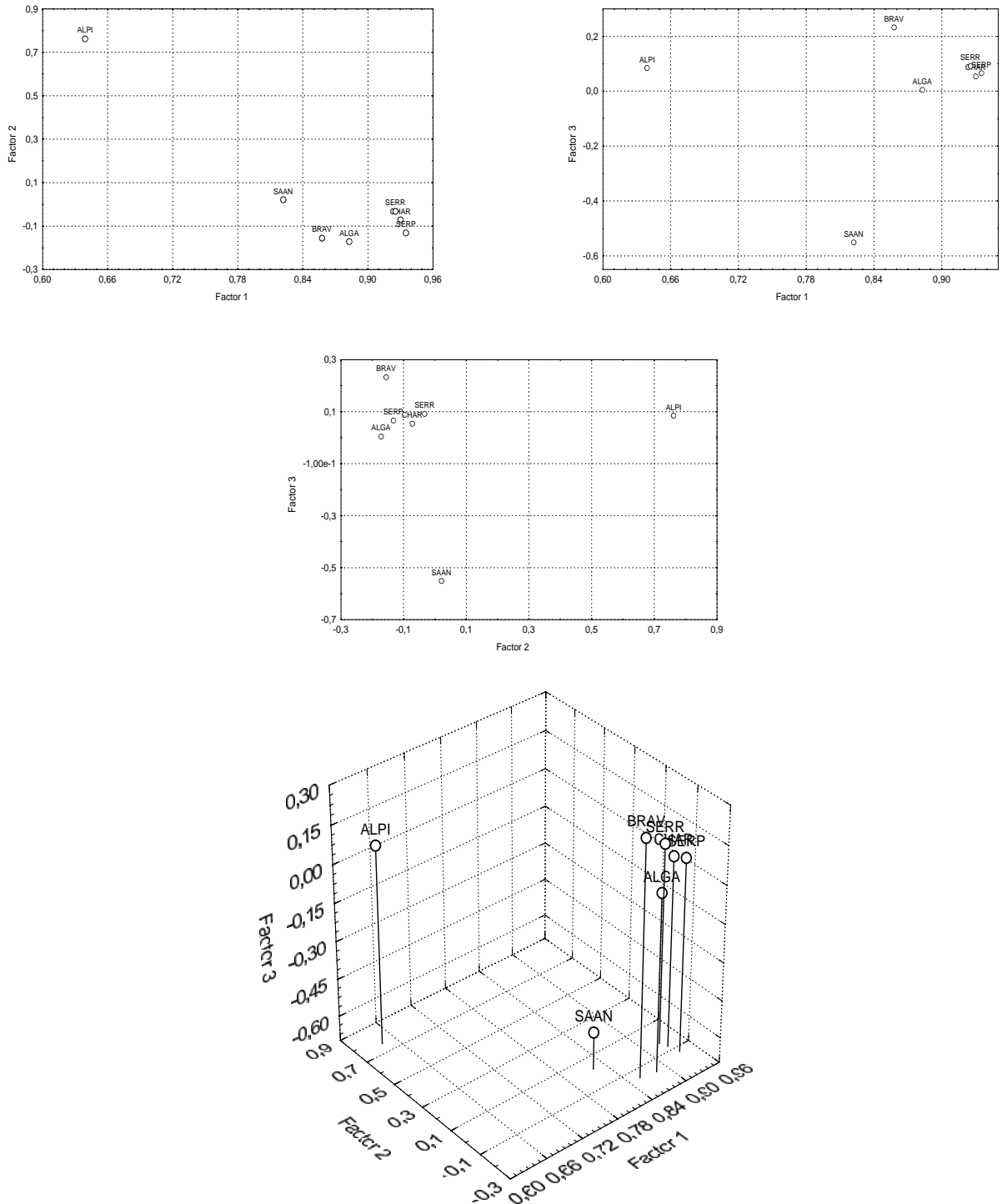


FIGURA 15 – Representação gráfica das diferentes raças autóctones e exóticas estudadas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais.

No plano da segunda componente principal, que explica 9,40% da variância, distingue-se um claro afastamento da raça Alpina relativamente às restantes raças. Finalmente, no plano da terceira componente principal, a qual explica 5,43% da variância, regista-se um afastamento notório da raça Saanen em relação às restantes raças estudadas.

No segundo tipo de agrupamento, a análise de componentes principais teve por base (313-23) alelos independentes, dos 23 *loci* estudados, nas 5 raças autóctones portuguesas.

O Quadro XIV mostra a variância explicada e a proporção desta para as três primeiras componentes principais, tendo sido a percentagem de variabilidade acumulada de 94,53%.

QUADRO XIV – Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites: variância explicada e proporção de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais (CP) (raças autóctones portuguesas)

	Primeira CP	Segunda CP	Terceira CP
Variância explicada	4,216	0,298	0,213
Proporção de variância explicada	84,32%	5,94%	4,28%
Proporção de variância explicada acumulada	84,32%	90,25%	94,53%

No Quadro XV podemos observar que na primeira componente principal houve a intervenção de vinte e um alelos com correlações superiores a 0,700. Dos vinte e um alelos mencionados os que mostraram uma correlação superior a 0,900 (valor absoluto) foram por ordem crescente, ILSTS005 182, SRCRSP 8 231, SRCRSP15 187, BM8125 108, CSSM031 167 e BM757 184. Para a segunda componente verificou-se a participação de 22 alelos. Os *loci* que participaram com correlações superiores a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, SRCRSP14 127, MAF64 124, INRA006 112 e SRCRSP8 245. Por último vem a terceira componente com a participação de 19 alelos com correlações superiores a 0,700. Os *loci* que participaram com correlações superiores a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o RM006 130 e o SRCRSP15 187. É ainda de referir que entre este último quadro e o anterior, na primeira componente principal as três correlações mais elevadas coincidem nos mesmos alelos.

QUADRO XV - Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites de cinco raças autóctones. Valores mais elevados dos coeficientes de correlação, entre os alelos e as primeiras componentes principais

Componentes principais (% de variabilidade explicada)	Valores dos coeficientes de correlação: 0,700 a 1,000				
	Positivos		Negativos		
1ª Componente (84,320%)	BM757 184	(0,986)	CSSM031 167	(-0,965)	
	ILSTS005 182	(0,913)	BM8125 108	(-0,940)	
	SRCRSP15 187	(0,925)	SRCRSP8 231	(-0,917)	
	SRCRSP5 174	(0,881)	SRCRSP15 184	(-0,895)	
	ILSTS034 159	(0,865)	ILSTSO34 153	(-0,873)	
	SRCRSP8 245	(0,859)	ILSTSO34 151	(-0,853)	
	INRA006 112	(0,803)	ANPRC 198	(-0,831)	
	ILSTS0011	(0,793)	BM8125 121	(-0,764)	
	SRCRSP14 127	(0,793)	BM757 188	(-0,746)	
	BM8124 118	(0,721)	ANPRC 196	(-0,712)	
	RM006 130	(0,705)			
2ª Componente (5,940%)		SRCRSP8 245	(0,996)	INRA006 112	(-0,982)
		MAF64 124	(0,964)	SRCRSP8 24	(0,867)
		SRCRSP14 127	(0,947)	RM006 130	(-0,840)
		SRCRSP5 16	(0,865)	McM53 92	(-0,817)
		ILSTS005 182	(0,812)	ILSTSO30 176	(-0,786)
		INRA006 11	(0,804)	BM1818 259	(-0,768)
		McM53 84	(0,801)	BM8125 116	(-0,733)
		McM53 86	(0,780)	MAF64 136	(-0,715)
		ILST011 276	(0,767)	ILSTS034 179	(-0,702)
		RM006 116	(0,745)		
	SRCRSP9 131	(0,711)			
	BM6526 182	(0,700)			
	SRCRSP9 129	(0,700)			
3ª Componente (4,283%)		RM006 130	(0,971)	SRCRSP15 187	(-0,992)
		BM757 184	(0,842)	SRCRSP14 125	(-0,884)
		McM53 84	(0,830)	CSSM031 141	(-0,866)
		BM6526 182	(0,763)	SRCRSP8 245	(-0,811)
		SRCRSP8 227	(0,755)	RM006 134	(-0,787)
		RM006 116	(0,742)	McM53 92	(-0,780)
		ILSTS011 266	(0,726)	SRCRSP9 141	(-0,730)
				ILSTS034 157	(-0,722)
			ILSTS034 117	(-0,714)	
			RM006 132	(-0,694)	

A representação gráfica das diferentes raças autóctones portuguesas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais, permite verificar que, no plano da primeira componente principal (explica 84,32% da variância), a raça Bravia está claramente separada das raças Serrana, Charnequeira e Serpentina, as quais se encontram agrupadas (Figura 16).

A raça Algarvia encontra-se também afastada deste grupo de raças, embora menos do que a Bravia.

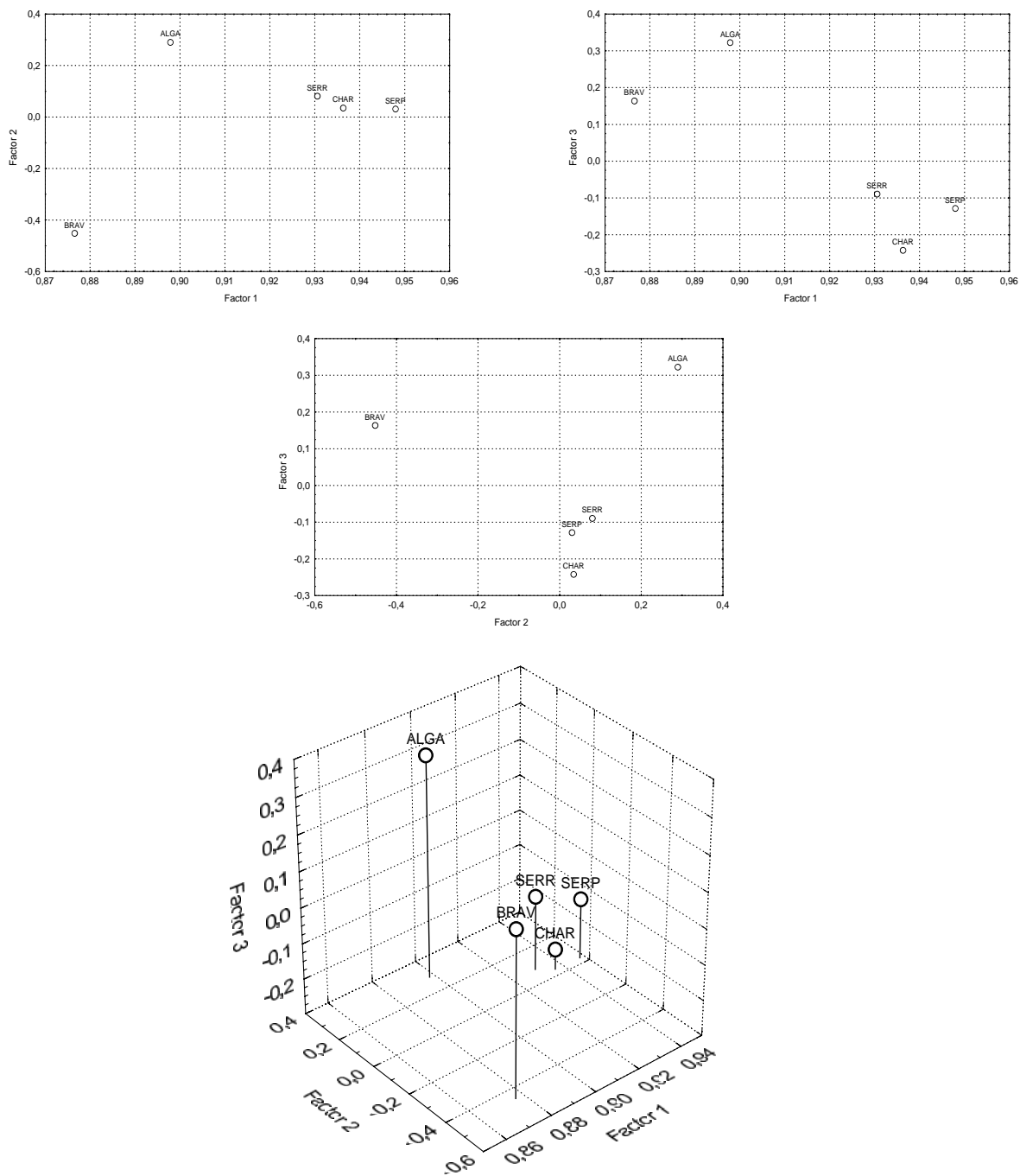


FIGURA 16 – Representação gráfica das diferentes raças autóctones portuguesas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais.

No plano da segunda componente principal (explica 5,94% da variância), a raça Bravia está claramente separada das restantes raças autóctones. A raça Algarvia afasta-se também, ainda que ligeiramente, do grupo formado pelas raças Serrana, Charnequeira e Serpentina.

No plano da terceira componente principal (explica 4,28% da variância), pode-se observar um claro afastamento da raça Algarvia em relação ao agrupamento de raças constituído pela Serrana, pela Serpentina e pela Charnequeira. A raça Bravia encontra-se também afastada deste agrupamento, embora menos do que a raça Algarvia.

No terceiro tipo de agrupamento, a análise de componentes principais teve por base 313-23 alelos independentes, dos 23 *loci* estudados, nas 10 populações analisadas.

O Quadro XVI revela a variância explicada e a proporção desta para as três primeiras componentes principais. A percentagem de variabilidade acumulada foi de 83,88%.

QUADRO XVI – Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites: variância explicada e proporção de variância explicada e acumulada para as três primeiras componentes principais (CP) (raças e ecótipos autóctones portugueses e raças exóticas)

	Primeira CP	Segunda CP	Terceira CP
Variância explicada	7,293	0,665	0,427
Proporção de variância explicada	72,92%	6,66%	4,28%
Proporção de variância explicada acumulada	72,92%	79,60%	83,88%

No Quadro XVII observa-se que na primeira componente principal a ordem dos sete primeiros alelos com correlações mais elevadas são coincidentes com os do Quadro XVII (todas as raças). Na segunda componente acontece o mesmo com os seis primeiros alelos com correlações mais elevadas. Na terceira componente principal apenas a ordem do primeiro alelo é coincidente.

Na primeira componente principal foram observados 22 alelos com correlações superiores a 0,700, em valor absoluto. Dos vinte alelos mencionados os que mostraram uma correlação superior a 0,009 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o SRCRSP15 187, ILSTS005 182 e BM757 184. Na segunda componente principal, o número de alelos reduziu-se para 20 e com correlações superiores a 0,900 em valor absoluto apenas houve a participação dos seguintes alelos: SRCRSP5 174, ILSTS011 268 e BM6526 184. Na terceira componente principal, o número de alelos com correlações superiores a 0,700 em valor absoluto, foi de 19. Nesta terceira componente principal os alelos que participaram com correlações superiores a 0,900, em valor absoluto foram os seguintes por ordem crescente: BM1818 259, TGLA40 105, RM006 13, RM006 130 e INRA006 112.

QUADRO XVII - Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites de cinco raças autóctones com respectivos ecótipos e duas raças exóticas. Valores mais elevados dos coeficientes de correlação entre os alelos e as primeiras componentes principais

Componentes principais (% de variabilidade explicada)	Valores dos coeficientes de correlação: 0,700 a 1,000			
	Positivos		Negativos	
1ª Componente (72,92%)	BM757 184	(0,991)	S-CRSP8 231	(-0,898)
	ILSTS005 182	(0,977)	BM8125 121	(-0,895)
	SRCRSP15 187	(0,967)	SRCRSP14 119	(-0,789)
	SRCRSP5 174	(0,879)	ANPRC 204	(-0,788)
	SRCRSP8 245	(0,875)	BM8125 108	(-0,787)
	ILSTS034 159	(0,872)	SRCRSP15 184	(-0,787)
	SRCRSP14 127	(0,864)	BM757 188	(-0,783)
	BM8125 118	(0,849)	ANPRC 196	(-0,774)
	ILSTS011 276	(0,809)	ILSTS011 272	(-0,774)
	McM53 92	(0,770)	BM1818 273	(-0,770)
	INRA006 112	(0,734)		
SRCRSP9 131	(0,700)			
2ª Componente (6,661%)	BM6526 184	(0,999)	SRCRSP5 174	(-0,914)
	ILSTS011 268	(0,921)	RM006 130	(-0,837)
	INRA006 116	(0,870)	INRA006 112	(-0,796)
	ILSTS05 180	(0,798)	ILSTS034 159	(-0,718)
	SRCRSP15 185	(0,894)	HEL10 161	(-0,695)
	BM8125 116	(0,888)	ANPRC 220	(-0,692)
	SRCRSP8 243	(0,868)	SRCRSP9 131	
	SRCRSP5 168	(0,839)		
	ILSTS034 155	(0,816)		
	ANPRC 218	(0,746)		
	BM6526 188	(0,712)		
McM53 92	(0,882)			
SRCRSP8 245	(0,785)			
3ª Componente (4,280%)	RM006 13	(0,971)	INRA006 112	(-0,984)
	BM1818 259	(0,935)	RM006 130	(-0,974)
	INRA006 120	(0,858)	TGLA40 105	(-0,941)
	TGLA40 111	(0,848)	SRCRSP5 174	(-0,882)
	SRCRSP15 187	(0,931)	MAF65 123	(-0,855)
	CMSS031 139	(0,879)	TGLA40 103	(-0,815)
	ANPRC 240	(0,860)	BM8125 118	(-0,810)
	SRCRSP14 127	(0,849)	ILSTS011 268	(-0,757)
	MAF65 137	(0,812)	SRCRSP15 185	(-0,715)
BM6526 158	(0,843)			

Através da representação gráfica das 10 populações estudadas (Figura 17), no plano das três primeiras dimensões das componentes principais, verifica-se que, no plano da primeira componente principal (explica 83,88% da variância), a raça Alpina está claramente separada das restantes raças, que se encontram agrupadas.

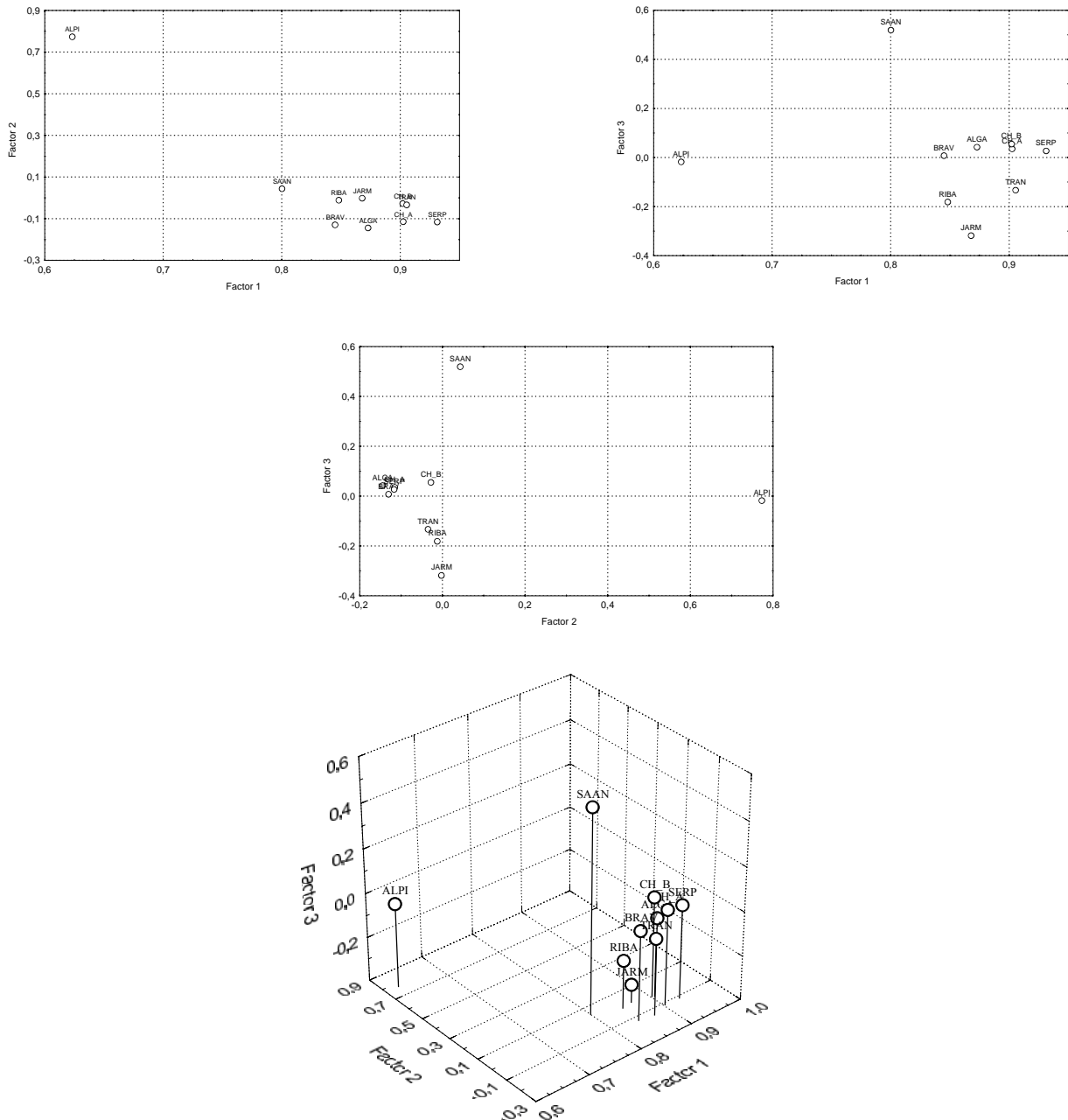


FIGURA 17 – Representação gráfica das diferentes raças e ecótipos autóctones e raças exóticas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais.

No plano da segunda componente principal (explica 6,66% da variância), a raça Alpina encontra-se afastada do agrupamento formado pelas restantes raças.

No plano da terceira componente principal, a raça Saanen encontra-se separada do agrupamento formado pelo conjunto das outras raças.

O Quadro XVIII mostra a variância explicada e a proporção desta para as três primeiras componentes principais, tendo sido a percentagem de variabilidade acumulada de 87,95%.

QUADRO XVIII – Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites: variância explicada, proporção de variância explicada e acumulada para as três componentes principais (CP) (raças e ecótipos autóctones portugueses)

	Primeira CP	Segunda CP	Terceira CP
Variância explicada	6,337	0,396	0,300
Proporção de variância explicada	79,23%	4,96%	3,77%
Proporção de variância explicada acumulada	79,23%	84,17%	87,95%

Na primeira componente principal houve a intervenção dezanove alelos com correlações superiores a 0,700 (Quadro XIX). Dos dezanove alelos mencionados, os que mostraram uma correlação superior a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o RM006 130 e o SRCRSP15 187. Na segunda componente verificou-se a participação de 22 alelos, com correlações superiores a 0,700 (valor absoluto). Os *loci* que participaram com correlações superiores a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o HEL10 171, o BM757 184, o SRCRSP15 187, o INRA006 112 e o SRCRSP5 174. Por fim, na terceira componente intervieram 18 alelos, também com correlações superiores a 0,700 (valor absoluto). Os *loci* que participaram com correlações superiores a 0,900 (valor absoluto) foram, por ordem crescente, o SRCRSP5 162, o MAF64 124, o BM757 184, o SRCRSP8 245 e o INRA006 112.

A Figura 18 constitui uma representação gráfica das 8 populações estudadas, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais. Da sua observação, resulta claro que, no plano da primeira componente principal (explica 79,23% da variância), há a formação de dois grupos distintos: de um lado temos a Charnequeira A e a B, muito próximas, e do outro o grupo formado pelos três ecótipos Serranos (Ribatejana, Jarmelista e Transmontana), que apresentam um afastamento entre si considerável, nalguns casos superiores aos observados entre algumas raças.

QUADRO XIX – Análise de componentes principais para os *loci* microssatélites das cinco raças autóctones e respectivos ecótipos e valores mais elevados dos coeficientes de correlação entre os alelos e as três primeiras componentes principais

Componentes Principais (% de variabilidade explicada)	Valores dos coeficientes de correlação: 0,700 a 1,000			
	Positivos		Negativos	
Primeira Componente (79,23%)	SRCRSP15 187	(0,999)	RM006 130	(-0,993)
	Sr CRSP8 245	(0,895)	SRCRSP15 189	(-0,843)
	ILSTS005	(0,870)	HEL10 171	(-0,764)
	SRCRSP5 174	(0,851)	INRA006	(-0,757)
	CMSS031 141	(0,828)	SRCRSP8 227	(-0,752)
	RM006 134	(0,819)	MAF65 123	(-0,701)
	ILSTS034 159	(0,788)		
	MAF65 137	(0,786)		
	ILSTS0034 117	(0,756)		
	SRCRSP14 125	(0,751)		
	SRCRSP14 127	(0,728)		
	BM6526 160	(0,716)		
	ILSTS030 166	(0,700)		
Segunda Componente (4,955%)	SRCRSP5 174	(0,992)	INRA006 112	(-0,985)
	BM757 184	(0,911)	SRCRSP15 187	(0,944)
	TGLA40 105	(0,900)	HEL10 165	(-0,907)
	SRCRSP15 185	(0,882)	ANPRC 220	(-0,871)
	ILSTS005 182	(0,818)	RM006 116	(-0,835)
	ANPRC 210	(0,801)	SRCRSP12 99	(-0,802)
	HEI10 171	(0,792)	TGLA40 111	(-0,769)
	ILSTS0030 164	(0,771)	SRCRSP5 162	(0,738)
	BM8125 118	(0,736)	MAF65 137	(-0,709)
	SRCRSP8 223	(0,710)		
	ILSTS011 274	(0,705)		
	SRCRSP9 127	(0,700)		
	McM53 100	(0,701)		
Terceira Componente (3,765%)	INRA006 112	(0,995)	SRCRSP8 245	(-0,986)
	BM757 184	(0,982)	MAF64 124	(-0,948)
	RM006 130	(0,887)	SRCRSP5 162	(-0,909)
	SRCRSP8 243	(0,809)	ILSTS034 157	(-0,874)
	TGLA40 111	(0,791)	INRA006 118	(-0,839)
	BM1818 259	(0,786)	INRA006 116	(-0,806)
	BM6526 162	(0,764)	TGLA40 109	(-0,714)
	McM53 92	(0,752)		
	ILSTS011 266	(0,734)		
	ILSTS030 176	(0,734)		
	BM8125 116	(0,732)		

No plano da segunda componente principal (explica 4,95% da variância), continua-se a distinguir os dois grandes grupos acima referidos, embora o afastamento dos ecótipos Serranos (Ribatejana, Jarmelista e Transmontana) se revele ligeiramente inferior, passando-se o mesmo com o agrupamento composto pela Charnequeira A e B.

No plano da terceira componente principal observa-se ainda a mesma tendência, embora aqui a separação entre a Charnequeira A e B seja quase inexistente e a separação entre os três ecótipos da Serrana seja ainda mais reduzida.

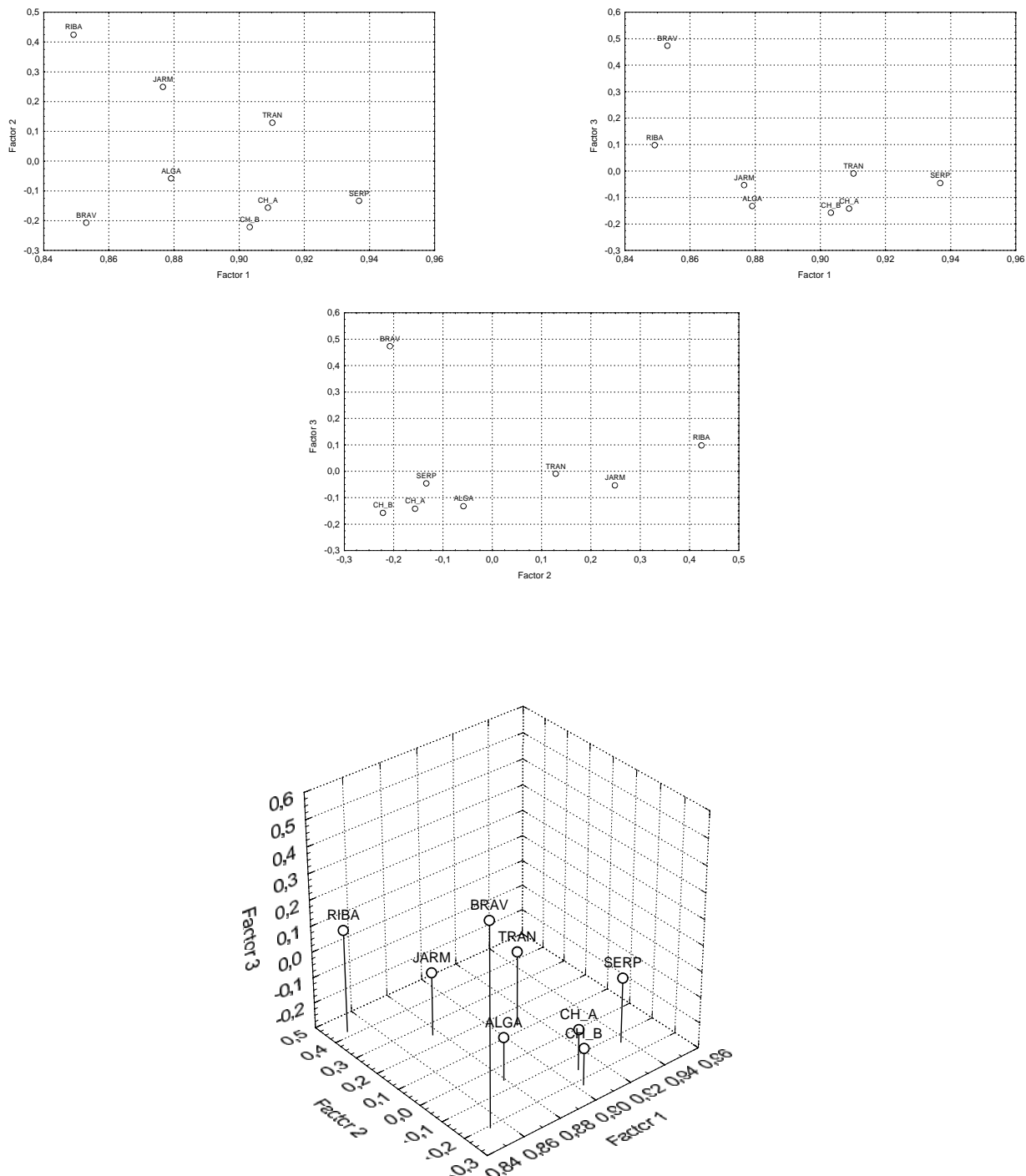


FIGURA 18 – Representação gráfica das diferentes raças e ecótipos autóctones, no plano das três primeiras dimensões das componentes principais.

## 2.6 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS

Tal como já foi anteriormente referido na revisão bibliográfica, as distâncias genéticas são usadas para medir, de uma forma global, as diferenças genéticas entre espécies ou populações (NEI, 1972 e SMITH, 1977). As distâncias utilizadas neste estudo fazem parte das ditas distâncias clássicas, como sejam: a distância *Standard* ( $D_S$ ), de NEI (1972), e a  $D_A$ , de NEI *et al.* (1983). Estas distâncias baseiam-se num modelo infinito de alelos e são utilizadas para estudos de populações recentemente separadas.

Da análise do Quadro XX, ressalta o facto de, segundo as distâncias  $D_S$  e  $D_A$ , existir uma maior proximidade entre as raças Charnequeira, Serpentina e Serrana, variando as distâncias entre elas de 0,061 a 0,084, quando se emprega a distância  $D_S$ , e de 0,070 a 0,081, quando se utiliza a  $D_A$ . De entre as raças autóctones portuguesas, as que mais se distanciam são a Algarvia e a Bravia, tanto para a distância  $D_S$  (0,206), como para a  $D_A$  (0,150).

Para as distâncias consideradas, a raça Alpina é a que apresenta distâncias mais elevadas em relação a todas as outras raças estudadas, atingindo sempre os valores mais elevados quando se considera a distância  $D_S$  relativamente à distância  $D_A$ . A segunda raça que mostra um maior distanciamento face a todas as outras é a Saanen, não conseguindo, no entanto, superar com algumas raças a distância observada entre a Algarvia e a Bravia, quer se utilize a distância  $D_S$  ou a  $D_A$ . Por fim, há que referir que, de um modo geral, as distâncias  $D_S$  apresentam valores superiores às distâncias  $D_A$ .

QUADRO XX – Distâncias genéticas obtidas a partir de microssatélites, nas diferentes raças. Sobre a linha diagonal estão representados os valores relativos à distância  $D_S$ , de NEI (1972), e sob a mesma linha os relativos à distância  $D_A$ , de NEI *et al.* (1983)

Raças	Algarvia	Bravia	Charnequeira	Serpentina	Serrana	Saanen	Alpina
Algarvia	–	0,206	0,129	0,104	0,117	0,219	0,405
Bravia	<b>0,150</b>	–	0,144	0,136	0,148	0,258	0,405
Charnequeira	<b>0,107</b>	<b>0,106</b>	–	0,061	0,084	0,179	0,302
Serpentina	<b>0,121</b>	<b>0,108</b>	<b>0,081</b>	–	0,081	0,190	0,347
Serrana	<b>0,107</b>	<b>0,102</b>	<b>0,075</b>	<b>0,070</b>	–	0,205	0,288
Saanen	<b>0,175</b>	<b>0,159</b>	<b>0,139</b>	<b>0,145</b>	<b>0,147</b>	–	0,347
Alpina	<b>0,235</b>	<b>0,233</b>	<b>0,185</b>	<b>0,204</b>	<b>0,172</b>	<b>0,229</b>	–

Estas mesmas distâncias foram também utilizadas no estudo dos dois ecótipos da raça Charnequeira – A e B – e nos três da raça Serrana – Transmontano, Jarmelista e Ribatejano. No que se refere à distância  $D_S$  (0,052), as Charnequeira A e B estão muito próximas (Quadro XXI). No caso da distância  $D_A$ , os pares Serpentina-Charnequeira B (0,091) e Transmontana-Serpentina (0,091) apresentam as menores distâncias. Porém, estas distâncias são muito próximas do distanciamento encontrado entre as Charnequeira A e B (0,106).

QUADRO XXI – Distâncias genéticas obtidas a partir de microssatélites, nas diferentes populações estudadas. Sobre a linha diagonal estão representados os valores relativos à distância  $D_S$ , de NEI (1972), e sob a mesma linha os relativos à distância  $D_A$ , de NEI *et al.* (1983)

Populações	Algarvia	Bravia	Char A	Char B	Serp	Trans	Ribat	Jarm	Saanen	Alpina
Algarvia	–	0,206	0,156	0,130	0,104	0,135	0,184	0,152	0,190	0,405
Bravia	<b>0,150</b>	–	0,168	0,148	0,136	0,165	0,225	0,175	0,258	0,405
Char A	<b>0,159</b>	<b>0,139</b>	–	0,052	0,077	0,129	0,184	0,117	0,196	0,358
Char B	<b>0,134</b>	<b>0,124</b>	<b>0,106</b>	–	0,070	0,109	0,174	0,105	0,191	0,282
Serp	<b>0,107</b>	<b>0,106</b>	<b>0,117</b>	<b>0,091</b>	–	0,101	0,165	0,100	0,190	0,347
Trans	<b>0,125</b>	<b>0,117</b>	<b>0,133</b>	<b>0,113</b>	<b>0,091</b>	–	0,130	0,100	0,236	0,325
Ribat	<b>0,186</b>	<b>0,162</b>	<b>0,184</b>	<b>0,166</b>	<b>0,154</b>	<b>0,143</b>	–	0,117	0,233	0,364
Jarm	<b>0,170</b>	<b>0,167</b>	<b>0,165</b>	<b>0,146</b>	<b>0,126</b>	<b>0,141</b>	<b>0,164</b>	–	0,252	0,283
Saanen	<b>0,175</b>	<b>0,159</b>	<b>0,174</b>	<b>0,152</b>	<b>0,145</b>	<b>0,174</b>	<b>0,182</b>	<b>0,210</b>	–	0,347
Alpina	<b>0,235</b>	<b>0,233</b>	<b>0,248</b>	<b>0,190</b>	<b>0,204</b>	<b>0,194</b>	<b>0,257</b>	<b>0,232</b>	<b>0,229</b>	–

Legenda: Char A – Charnequeira Alentejana, Char B – Charnequeira Beiroa, Serp – Serpentina, Trans – Transmontano, Ribat – Ribatejano e Jarm – Jarmelista.

Os ecótipos da raça Serrana apresentam, tanto para a distância  $D_S$ , como para a distância  $D_A$ , valores de distâncias intermédios ou baixos. Assim, com a distância  $D_S$  os valores observados variam entre 0,100 e 0,130. Por seu turno, com a distância  $D_A$  os valores registados oscilam entre 0,141 e 0,164. Nalguns casos, a distância encontrada entre ecótipos da raça Serrana é maior do que a observada entre algumas raças. Assim, por exemplo, para a distância  $D_S$  o par Serpentina-Algarvia está mais próximo (0,104) do que o par de ecótipos Transmontano-Ribatejana (0,130). O mesmo acontece com a distância  $D_A$ , uma vez que o par Bravia-Algarvia tem uma distância de 0,150 e o par de ecótipos Jarmelista-Ribatejano dista 0,164.

A raça que apresenta maior distância, relativamente às outras populações, é a Alpina, tanto com a distância  $D_S$ , como com a  $D_A$ . Quanto à raça Saanen, de um modo geral,

encontra-se mais distanciada das raças autóctones do que estas entre si. Contudo, nalguns casos, tanto com a distância  $D_S$ , como com a  $D_A$ , obtiveram-se maiores distanciamentos entre raças autóctones. A título de exemplo, pode-se referir, para ambas as distâncias ( $D_S$  e  $D_A$ ), o caso do par Algarvia-Bravia que toma valores (0,206 e 0,150, respectivamente) superiores ao distanciamento encontrado entre outras populações autóctones e a raça Saanen.

## 2.7 - DENDROGRAMAS

Para a construção dos dendrogramas, feita a partir das matrizes de distâncias calculadas, utilizou-se o método de agregação do “vizinho mais próximo” (NJ), já referido na revisão bibliográfica.

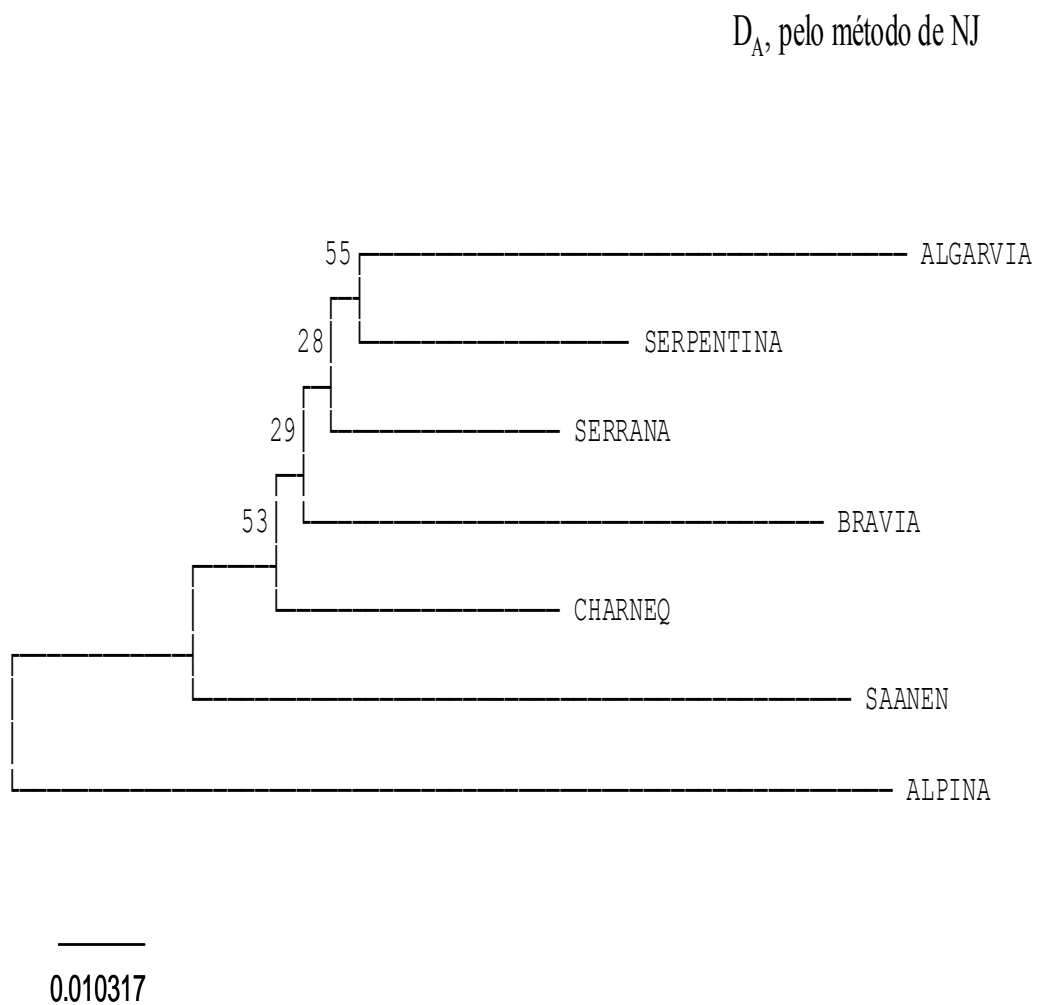


FIGURA 19 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância  $D_A$  e utilizando o método NJ, em cinco raças autóctones portuguesas e duas exóticas.

A análise de robustez do dendrograma foi efectuada pelo método de *bootstrap*, valores que se apresentam nas figuras seguintes, em determinados nós. Valores superiores a 75% foram considerados estáveis, enquanto que valores inferiores a 50% impõem uma certa precaução.

Nas Figuras 19 e 20, pode-se observar os dendrogramas obtidos a partir de 23 microssatélites, construídos com base nas distâncias  $D_S$  e  $D_A$ , utilizando o método NJ e relativos às cinco raças autóctones portuguesas e às duas exóticas estudadas. As duas raças exóticas destacam-se das autóctones, embora seja mais notório o afastamento da Alpina em relação às raças autóctones. Nestes casos, o valor de *bootstrap* é de 100%. Entre as raças autóctones, as que apresentam uma maior proximidade, independentemente da distância considerada ( $D_S$  ou  $D_A$ ), são a Algarvia e a Serpentina, embora o valor de *bootstrap* seja superior quando se utiliza a distância  $D_A$  (55%) do que quando se usa a distância  $D_S$  (40%). Com valores de *bootstrap* consideráveis (55%, com a  $D_A$  e 69%, com a  $D_S$ ) a raça Charnequeira separa-se das restantes raças autóctones.

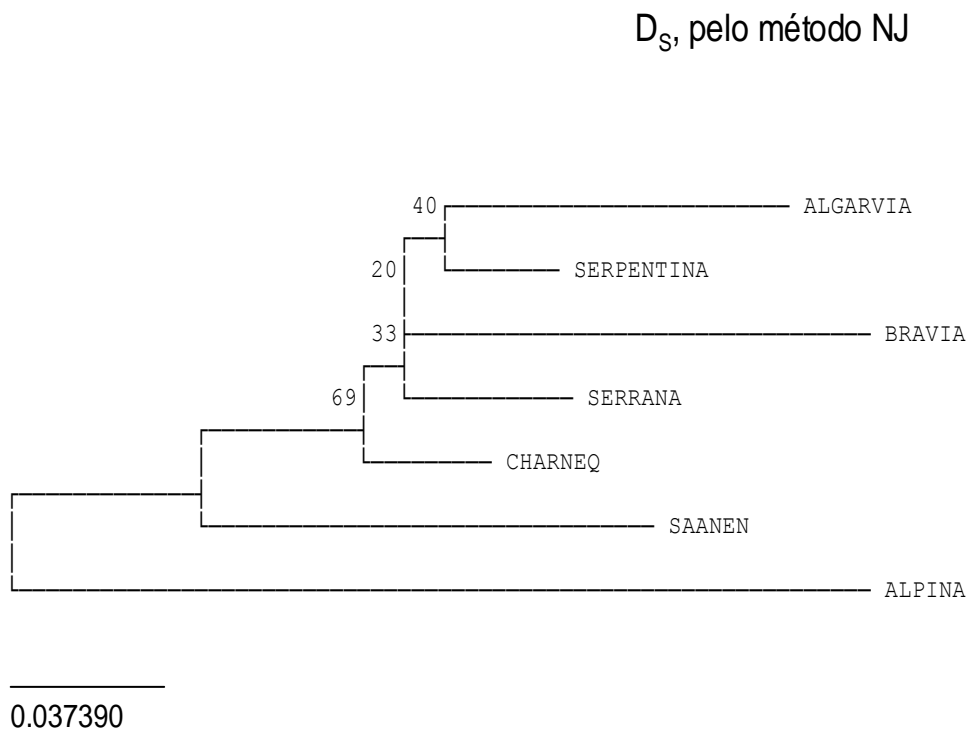


FIGURA 20 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância  $D_S$  e utilizando o método NJ, em cinco raças autóctones portuguesas e duas exóticas.

A posição das raças Bravia e Serrana, relativamente às outras raças autóctones, não é muito clara, uma vez que os valores de *bootstrap* são muito baixos nos dois dendrogramas,

respectivamente de 29% e 33% para a raça Bravia e de 28% e 20% para a raça Serrana. Estas raças possuem posicionamentos bem diferentes nos dois dendrogramas construídos.

Os dendrogramas a seguir apresentados foram igualmente obtidos com base em duas distâncias diferentes e utilizando o método de reconstrução filogenética NJ, mas foram construídos após “divisão” da raça Serrana e Charnequeira nos seus respectivos ecótipos.

Através do dendrograma da Figura 21 pode-se observar que as raças Alpina e Saanen são as que se encontram mais afastadas de todas as outras populações autóctones, com valores de *bootstrap* de 100%. Os ecótipos Charnequeira A e B aparecem muito próximos e com valores de *bootstrap* de 72%, quando se utiliza a distância  $D_A$ , e de 68%, quando se utiliza a distância  $D_S$ , o que fornece uma grande consistência ao posicionamento destes ecótipos nos dendrogramas.

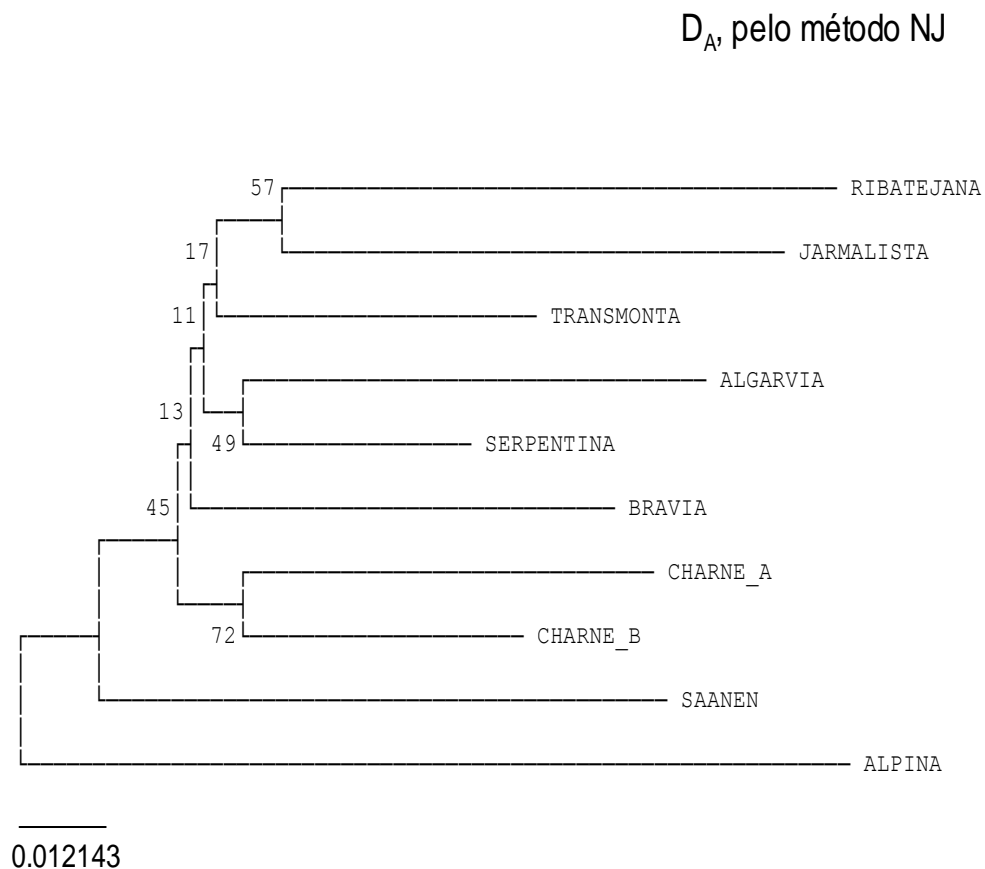


FIGURA 21 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância  $D_A$  e utilizando o método NJ, em 8 populações autóctones e duas exóticas.

Os ecótipos da raça Serrana aparecem bastante próximos, embora os valores de *bootstrap* para o ecótipo Transmontano, independentemente da distância utilizada ( $D_S$  – 25% ou  $D_A$  – 17%), serem sempre inferiores ao *bootstrap* encontrado para os outros dois

ecótipos: Ribatejano e Jarmelista (57% e 34%, respectivamente quando se utiliza a  $D_A$  ou a  $D_S$ ), o que lhe confere um posicionamento mais incerto.

As raças Algarvia e a Serpentina, independentemente de se utilizar a distância  $D_A$  ou  $D_S$ , aparecem bastante próximas, como nos dendogramas anteriores, mas com valores de *bootstrap*, respectivamente de 57% e 34%.

A raça Bravia, tal como já sucedia nos dendogramas anteriores, tanto utilizando a distância  $D_A$  como a  $D_S$ , aparece sempre com valores de *bootstrap* muito baixos, ocupando, conforme o caso, posicionamentos diferentes que evidentemente têm pouca consistência.

Da observação do dendrograma da Figura 22, sobressai o facto das raças exóticas continuarem a ser as que mais se afastam de todas as outras populações, embora a Saanen apareça menos afastada do que nos dendogramas anteriores.

### $D_S$ , pelo método de NJ

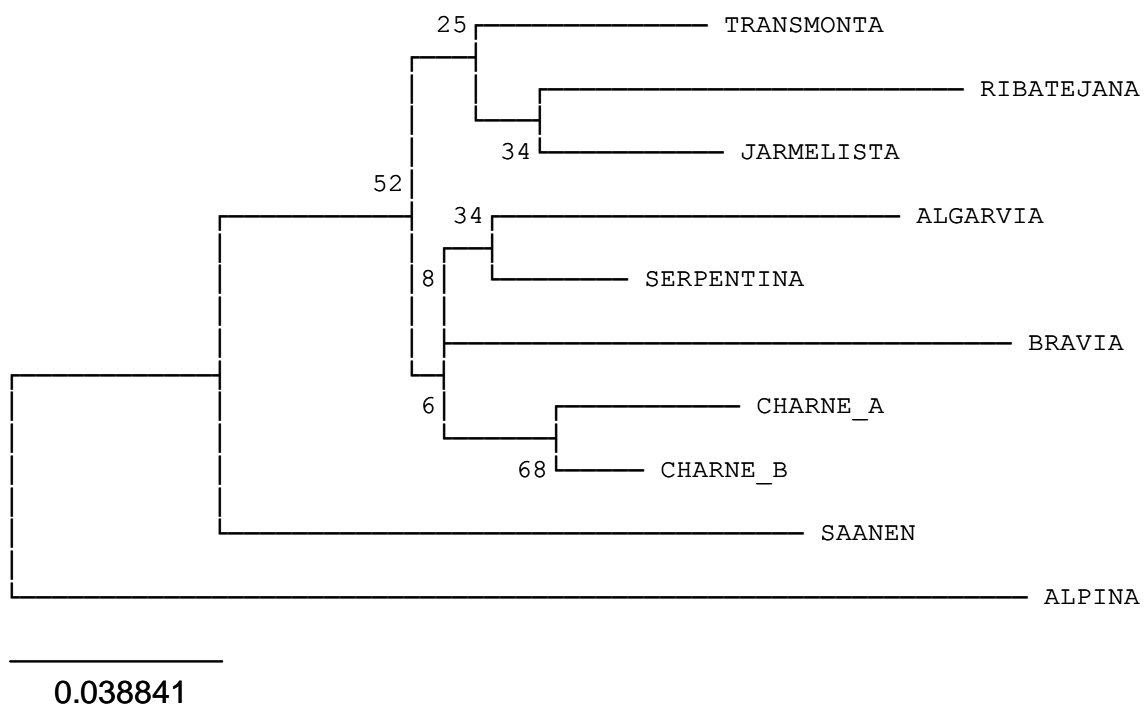


FIGURA 22 – Dendrograma obtido com 23 microssatélites, baseado na distância  $D_S$  e utilizando o método NJ, em 8 populações autóctones e duas exóticas.

As populações autóctones que mais se aproximam das exóticas são: a Jarmelista, a Ribatejana e a Transmontana. Seguem-se as Charnequeira B e A, por sua vez muito

próximas uma da outra. A seguir vem a raça Bravia e finalmente, formando o grupo mais afastado das raças exóticas, posicionam-se as raças Algarvia e Serpentina, que apresentam uma grande proximidade entre si. De um modo geral, os valores de *bootstrap* são muito pequenos.



### 3 - DISCUSSÃO

Antes de entrarmos na discussão propriamente dita dos resultados obtidos, gostaríamos de salientar alguns aspectos que, de alguma forma, condicionaram todo o trabalho desenvolvido. A tentativa de amostrar todas as raças e ecótipos autóctones caprinos, de uma forma representativa, ao longo de todo o país, revelou-se uma tarefa bastante difícil. Embora todas as Direcções das Associações de Caprinicultores se tenham mostrado abertas à colaboração, muitos caprinicultores recusaram-se a autorizar a recolha de amostras de sangue nas suas cabradas. Essa recusa, em algumas zonas do país, pode ser explicada pelo receio dos criadores em que a amostra de sangue se destinasse efectivamente ao controlo da brucelose. Noutras zonas do país, essa recusa só poderá ser explicada pela baixa instrução dos caprinicultores e pela dificuldade de entenderem o âmbito de um trabalho como este ou a más experiências anteriores.

A acrescentar a esta dificuldade, verificou-se haver uma quantidade não desprezável de animais que, embora apresentassem os requisitos necessários para pertencer ao livro genealógico, não se encontravam inscritos, por falta de entendimento com as Associações. À partida, estes animais foram eliminados da amostra. A raça Bravia foi particularmente difícil de amostrar, não só devido à dispersão do seu solar, como à elevada incidência de brucelose e coincidência temporal da realização da nossa amostragem com grande parte das inscrições dos animais no livro genealógico. Este último facto obrigou-nos a acompanhar a equipe de inscrição no livro genealógico, para depois podermos recolher as amostras.

Devido aos motivos anteriormente apontados, o tamanho da amostra não foi sempre a mais desejável, principalmente no que respeita aos ecótipos. Ainda relativamente a estes, gostaríamos de referir o facto do ecótipo da “Serra”, pertencente à raça Serrana e descrito pela “Direcção Geral de Pecuária” DGP (1987), não ser mencionado neste trabalho, pela simples razão de apenas termos encontrado dez exemplares, pelo que pensamos estar já extinto.

Juntamente com a amostragem de sangue tentou-se recolher o maior número possível de dados produtivos dos referidos animais, com o objectivo de se poderem relacionar com a informação genética obtida. Este último esforço revelou-se infrutífero, devido à enorme relutância apresentada por algumas associações em facultar os dados, outras apresentarem dados não fidedignos e inexistentes em vários casos.

A escolha das raças exóticas Alpina e Saanen como referência deveu-se ao facto de estas estarem exaustivamente descritas e padronizadas na bibliografia. Por outro lado, como ainda não existiam estudos reveladores de distâncias genéticas nas raças autóctones caprinas nacionais, pensou-se ser mais seguro escolher duas raças de referência em vez de uma.

### 3.1 - AMPLIFICAÇÃO DOS DIFERENTES MICROSSATÉLITES

Neste estudo foram amplificados 26 microssatélites (apesar de só terem sido aproveitados os dados referentes a 23, devido ao facto de três deles se encontrarem em desequilíbrio de HW em quase todas as populações estudadas), em cinco raças autóctones portuguesas e respectivos ecótipos e em duas raças exóticas, perfazendo um total inicial de 10.164 genótipos. Uma vez que houve necessidade de se proceder a algumas repetições, o total final foi de aproximado 10.600 genótipos.

Antes de se proceder à amplificação dos microssatélites no termociclador e à identificação dos diferentes alelos no sequenciador automático *ALF Express R DNA Sequencer*, foram realizados estudos prévios, tanto para a elaboração dos multiplex, como para avaliar a existência de possíveis factores que, de alguma forma, pudessem influenciar os resultados finais.

Nos diferentes *multiplex* estabeleceu-se um protocolo comum para a reacção da PCR, embora a concentração dos iniciadores na mistura tenha sido otimizada individualmente. Nos casos em que se obtiveram muitos produtos de amplificação inespecíficos, estes foram quase sempre resolvidos diminuindo a concentração de MgCl<sub>2</sub>, aumentando a temperatura de ligação ou diluindo um pouco mais a solução de DNA.

### 3.2 - ELECTROFORESE E IDENTIFICAÇÃO DOS ALELOS

Tal como já foi referido no capítulo de Material e Métodos, a utilização de um padrão externo e de outro interno, da correcção *Gold* e de animais referência, contribuiu para uma eficiente determinação do tamanho de cada microssatélite, dentro do mesmo gel ou entre diferentes géis. Mesmo em géis desnaturantes, diferenças nas sequências de DNA (na riqueza em GC e AT ou nas próprias estruturas secundárias) podem originar diferentes tempos de migração (LANDER, 1991).

Um procedimento que se revelou de extrema importância, foi o de evitar os extremos do gel para a colocação do padrão externo, prevenindo-se desta forma erros de

interpolação. Pelo mesmo motivo, os animais de referência também nunca foram colocados nos extremos do gel.

A exactidão na determinação do tamanho do alelo não depende apenas da escolha da combinação de marcadores externos e internos, mas também do gel e das condições da electroforese. Daí a nossa opção por um gel perfeitamente padronizado, o “Reprogel”. Este gel foi testado com duas e três corridas consecutivas, verificando-se apenas pequenas alterações na terceira corrida. Tendo em conta este resultado, neste estudo procedeu-se apenas à realização de duas corridas consecutivas no mesmo gel.

Outro aspecto ao qual se prestou bastante atenção foi a existência de bandas sombra, também referidas por vários autores (HAUGE e LITT, 1993; LITT *et al.*, 1993 e RODRIGUEZ *et al.*, 2001) como a perda de bases dos alelos amplificados, e que podem originar dois ou mais picos com intensidade inferior ao alelo esperado; isto é particularmente frequente em repetições dialélicas. A remoção das bandas sombras requer alguma experiência por parte do utilizador, pois o algoritmo procura os possíveis locais para o aparecimento das bandas sombra que serão ou não contabilizadas como tal, mediante a atribuição de um intervalo de intensidade admitido. No manual do programa “*AlleleLinks*” podemos observar valores recomendados. Estes valores foram vistos apenas como indicativos, já que à medida que se adquiriu uma certa prática foi sendo atribuída a amplitude mais ajustada a cada caso.

Há ainda a assinalar a actividade “+A” da *Taq Polimerase* (CLARK, 1988 e OLDROYD, 1995), que em alguns casos se fez sentir produzindo picos com intensidades muito próximas do pico esperado. A título de exemplo pode-se referir o multiplex BCIB, particularmente com o marcador BM8125 (Figura 7). Esta situação obrigou igualmente a uma leitura mais cuidadosa dos dados.

### 3.3 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE POPULACIONAL

A utilidade dos microssatélites, em estudos de variabilidade genética e estimação de distâncias genéticas entre diferentes populações ou raças mais ou menos relacionadas, tem sido mencionada por autores como BUCHANAN *et al.* (1994), CIAMPOLINI *et al.* (1995), ESTOUP *et al.* (1995), ARRANZ *et al.* (1996), BARKER *et al.* (1997), MACHUGH *et al.* (1997), ARRANZ *et al.* (2001), QUAFI *et al.* (2002) e LI *et al.* (2002).

A eleição destes marcadores moleculares deve-se ao facto de não serem influenciados por: factores ambientais, heterogeneidade genética, pleotropia e outras interacções genéticas complexas. Por outro lado, gozam de neutralidade, isto é, possuem

pouco ou nenhum valor de adaptação e de selecção (AJMONE-MARSAN *et al.*, 2001), e têm taxas de mutação elevadas, apresentando diferentes polimorfismos distribuídos por todo o genótipo (GOLDSTEIN e SCHLOTTER, 1999). Assim, neste estudo escolheram-se 23 microssatélites, tentando, sempre que possível, que estes se localizassem em diferentes cromossomas ou, pelo menos, que a distância entre eles fosse suficiente para evitar o fenómeno de ligação factorial. Desta forma, procurou-se evitar a ocorrência de ligação entre *loci*, uma vez que a informação obtida seria redundante. A análise molecular do genoma caprino foi feita recorrendo a sequências específicas caprinas e sequências heterólogas isoladas de bovinos e ovinos (VAIMAN *et al.*, 1996). Daí termos utilizado microssatélites específicos de caprinos e outros não específicos provenientes de bovinos e ovinos.

De um modo geral, todos os microssatélites analisados mostraram ter um polimorfismo elevado, com excepção do BM757. Nas diferentes populações estudadas, esta elevada variabilidade pode ser confirmada pelo número máximo de alelos afetos a cada *locus*. Assim, e por ordem decrescente, obtivemos: 19 alelos (CSSM031 e ANPRC), 16 (BM6526), 15 (ILSTS030 e HEL10), 14 (SRCRSP12, SRCRSP9, MAF65, ILSTS034 e RM006), 12 (McM53 e TGLA40), 11 (BM1818, INRA006, SRCRSP14), 10 (SRCRSP15, BM8125, SRCRSP8, ILSTS005, SRCRSP5 e ILSTS011), 9 (MAF64) e 6 (BM757). O número de alelos obtidos nos *loci* escolhidos parece-nos ter sido o adequado para um estudo deste tipo, uma vez que BARKER (1994) sugere que, para estudar distâncias genéticas, os *loci* microssatélites não deverão ter menos de 4 alelos, de forma a reduzirem os erros padrão das distâncias estimadas.

Embora com algumas excepções, como no caso dos *loci* BM6526 e BM757, podemos afirmar que, de um modo geral, a raça Serrana, para o conjunto dos microssatélites estudados, é aquela que se mostra mais polimórfica, enquanto que a Saanen é a menos polimórfica. O maior polimorfismo da raça Serrana não nos surpreendeu, já que esta é a raça autóctone nacional mais representativa, tanto em número como na sua distribuição geográfica ao longo de quase todo o país, possuindo, conforme a área de dispersão, diferentes ecótipos.

A raça Saanen foi a que mostrou um menor número de alelos em quase todos os *loci*. Num outro estudo realizado com animais desta raça, BRAGANÇA (1999) utilizando 14 microssatélites, 11 deles comuns aos usados no nosso trabalho, verificou igualmente, na maior parte dos marcadores, um menor número de polimorfismos quando comparados com os das raças autóctones portuguesas. Num estudo filogenético desenvolvido por QUAFI *et*

*al.* (2002), envolvendo raças caprinas marroquinas, francesas e suíças, foi avaliado paralelamente o impacto da selecção sobre a raça Saanen. Assim, a análise separada de animais dos anos 1990 e dos 2000, com os mesmos marcadores moleculares, permitiu verificar a ocorrência de um decréscimo no número médio de alelos, por marcador, nos últimos 10 anos. Isto pode significar que, apesar de se pensar que os microssatélites gozam de neutralidade relativamente aos processos adaptativos e de selecção, nem sempre isto acontece, até porque sabemos que alguns microssatélites estão ligados a genes produtivos e por isso susceptíveis de serem seleccionados (RIQUET, 1999). Nas raças caprinas portuguesas pensamos não se colocar este tipo de problema, uma vez que nenhuma delas foi sujeita a programas de selecção estabelecidos há vários anos. Logo, a diferença encontrada nas frequências alélicas das diferentes populações pode ser atribuída a efeitos fundadores, deriva genética, migrações e/ou mutações que geram novas ou já existentes variantes. Ainda relativamente ao processo de mutação, alguns autores como SCHLÖTTER e TAUZ (1992) e NAUTA e WEISSING (1996) apontam o fenómeno de deslizamento da polimerase, assim como as trocas desiguais de material genético na recombinação entre cromossomas homólogos (durante a meiose), como principais causas de mutação.

### **3.3.1 - TAMANHO DA AMOSTRA**

O tamanho da amostra, conjuntamente com o número de marcadores utilizados, influencia, de uma forma decisiva, a fiabilidade dos resultados obtidos. Há que procurar sempre uma relação de compromisso entre o tamanho da amostra e o número de marcadores, de modo a que os resultados não sejam significativamente afectados. No nosso estudo, fixado o número de 23 marcadores, e porque o tamanho da amostra não foi sempre o mesmo e o erro padrão da frequência alélica, calculado a partir da variância da frequência, constitui um indicador importante da fiabilidade da amostra. Assim, com as frequências obtidas realizou-se uma simulação do erro padrão para 15, 25, 50 e 100 animais. Os valores obtidos na simulação revelaram-se consentâneos com os referidos pela maioria dos autores, ou seja, de que o tamanho adequado da amostra se deve situar entre 30-60 animais (BARKER *et al.*, 1993 e MACHUGH, 1996).

### **3.3.2 - ALELOS EXCLUSIVOS NAS DIFERENTES RAÇAS ESTUDADAS**

Como já foi referido no capítulo anterior, o número de alelos exclusivos exibidos por cada raça foi muito diminuto. As raças Serrana e Alpina foram as que apresentaram um

maior número de alelos exclusivos (aproximadamente 5,5%), relativamente ao número de alelos encontrados nos 23 marcadores utilizados neste estudo. Num estudo semelhante levado a cabo por ARRANZ *et al.* (2001), com raças ovinas, utilizando 18 microssatélites, a percentagem de alelos exclusivos foi de 15%. LI *et al.* (2002), num estudo em que foram utilizados 26 microssatélites, envolvendo 12 raças caprinas chinesas, refere a presença de um alelo com a frequência de 74%, em apenas 3 populações caprinas do Tibete, para além da presença de um alelo exclusivo na raça Matou e outro na Small-Xiang. BARKER *et al.* (2001), num outro estudo de variabilidade genética, em 11 populações caprinas asiáticas, envolvendo 25 microssatélites, referem a raça Ujung Pandang como uma das que exibem maior número de alelos exclusivos (28 alelos, de um total de 283). Estes autores referem ainda a existência de alelos exclusivos nas restantes raças e que estes normalmente surgem nos extremos superiores ou inferiores da distribuição do tamanho dos alelos. Outros autores, como BUCHANAN *et al.* (1994) e FORBES *et al.* (1995), encontraram, em raças ovinas, percentagens de alelos exclusivos superiores às por nós encontradas. No nosso trabalho, a maior parte dos alelos exclusivos apresentou valores extremos e frequências muito baixas, nomeadamente inferiores a 0,05. O aparecimento destes alelos poderá ser atribuído a mutações recentes com sucesso em determinadas populações ou a deriva genética. Neste caso, o tamanho da amostra pode ter influenciado o número de alelos exclusivos encontrados. Embora o número de 40 a 52 indivíduos seja considerado representativo em análises de marcadores microssatélites (TAKEZAKI e NEI, 1996), talvez no caso específico referido (alelos exclusivos), não o seja.

### 3.3.3 - NÚMERO EFICAZ DE ALELOS

O  $n_e$  traduz o número de alelos equifrequentes que dá origem, no marcador, a um PIC de igual valor. A comparação deste parâmetro com o número de alelos observados em cada *locus*, para uma determinada raça, fornece informação sobre a predominância de certos alelos. Embora se tenha verificado uma multiplicidade de situações, algumas revelam-se particularmente interessantes, como as relacionadas com as raças Serrana e Saanen, abaixo descritas.

Uma das raças que apresentou maior número de alelos, nos diferentes marcadores estudados, foi a Serrana. Apesar do número de alelos observados ter sido quase sempre elevado, o  $n_e$  foi algumas vezes muito reduzido, como nos casos dos marcadores ANRPC, ILST005 e ILSTS034. Por seu turno, a raça Saanen apresentou o número de alelos mais

reduzido de todas as raças estudadas, apesar de alguns marcadores terem apresentado valores de  $n_e$  relativamente elevados, como os casos de McM53 e MAF64. O menor número de alelos exibidos pela raça Saanen na maior parte dos marcadores estudados, poderá revelar uma maior pressão de selecção dirigida a características leiteiras que tenha produzido uma diminuição no tamanho efectivo populacional ou uma redução no referido tamanho, juntamente com uma amostragem num número reduzido de famílias. Quanto ao  $n_e$  elevado encontrado em dois marcadores pode demonstrar uma dominância de certos alelos relativamente a outros (ARRANZ *et al.*, 2001).

### 3.3.4 - ECÓTIPOS

Da análise efectuada aos vários ecótipos, podemos salientar que, dos três ecótipos da raça Serrana – Transmontano, Jarmelista e Ribatejano –, o que, de uma forma geral, apresentou um maior polimorfismo foi o Transmontano, seguido dos outros dois com valores semelhantes. Na maior parte dos marcadores, o alelo mais frequente foi coincidente nos três ecótipos (ILSTS011, McM53, RM006, BM6526, BM8125, CSSM031, BM1818, ILST005, BM757, SRCRSP9, SRCRSP5, SRCRSP15, SRCRSP8 e HEL10). No mesmo sentido, o padrão de distribuição gráfica das frequências alélicas assemelharam-se muito nos três ecótipos. Porém, nos três ecótipos, os padrões de distribuição gráfica das frequências alélicas de alguns marcadores sensivelmente diferentes: RM006, SRCRSP12, TGLA40, ILSTS030, MAF65, ILSTS034, HEL10 e ANPRC.

No que respeita aos ecótipos Charnequeiras A e B, de um modo geral, para os marcadores escolhidos, o ecótipo Charnequeira B apresentou um maior número de alelos. Na grande maioria dos casos, os dois ecótipos mostraram ter o mesmo alelo mais frequente e/ou distribuições alélicas muito semelhantes. Este tipo de situação pode ser confirmada através dos seguintes marcadores: INRA006, ILSTS011, McM53, RM006; BM6526, BM8125, CSSM031, ILST005, BM757, SRCRSP5, SRCRSP15 e SRCRSP14. Também nos ecótipos desta raça apareceram alguns marcadores que, em termos de distribuições alélicas, distinguiram a Charnequeira A da Charnequeira B: SRCRSP12, TGLA40, ILSTS030, MAF64, HEL10 e ANPRC.

Os marcadores que mais distinguiram os três ecótipos da Serrana (Transmontano, Jarmelista e Ribatejano) coincidiram, na maior parte das vezes, com os que mais distinguiram as frequências alélicas dos dois ecótipos da Charnequeira. Este fenómeno

poderá estar relacionado com o facto de, nestas populações, estes marcadores terem exibido um elevado número de alelos, à excepção do MAF64.

### 3.3.5 - EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

De uma forma simplificada, pode-se dizer que uma população diplóide se encontra em equilíbrio de HW, sempre que os diferentes alelos de um *locus* estão aleatoriamente distribuídos pela população e quando não há associação nos pares de alelos que um indivíduo recebe dos seus pais (MACHUGH, 1996).

Como é do conhecimento geral, a lei de HW é extremamente robusta e a maior parte das amostras satisfazem esta lei (CAVALLI-SFORZA, 1994). Contudo, com alguma frequência surgem desvios, particularmente em populações de animais domésticos (MACHUGH, 1996; ZAJC *et al.*, 1997; BARKER *et al.*, 2001; BRITO, 2002 e LI *et al.*, 2002). Estes desvios surgem principalmente em:

- Cruzamentos não aleatórios.
- Subdivisões populacionais (princípio de “Wahlund”).
- Coancestralidade.
- Seleção.
- Migrações.
- Diferenças de frequência alélica atribuídas ao sexo.
- Factores cronológicos de amostragem.
- Presença de alelos nulos.

Tornou-se assim importante determinar se os desvios encontrados nos diferentes *loci* escolhidos eram ou não significativos. Nos 23 *loci* estudados, e em todas as populações, verificaram-se alguns desvios significativos ao equilíbrio de HW. Assim, a raça Algarvia apresentou desvio ao equilíbrio de HW nos *loci*: ILSTS0011, BM6526 e BM1818. A raça Bravia mostrou desvios ao equilíbrio de HW nos *loci*: INRA006, MAF65, SRCRSP14 e SRCRSP8. Por seu turno, a raça Charnequeira apresentou desvios ao equilíbrio de HW nos *loci* INA006, SRCRSP14 e SRCRSP8. A raça Serpentina evidenciou desvios ao equilíbrio de HW nos *loci*: RM006, BM8125 e ILSTS034. Finalmente, a raça Serrana foi a que apresentou maior número de desvios relativamente ao equilíbrio de HW, nos *loci*: INRA006, ILSTS011,

BM1818, SRCRSP8, TGLA40 e ILSTS030. As raças exóticas Saanen e Alpina não apresentaram desvios ao equilíbrio de HW nos vários *loci* estudados.

É difícil atribuir a cada população as causas exactas dos desvios ao equilíbrio de HW. Quanto à raça Serrana, pode-se avançar com a hipótese de haver subdivisão da raça, já que identificamos três ecótipos (Transmontano, Jarmelista e Ribatejano). Com a raça Bravia, os desvios ao equilíbrio de HW poderão relacionar-se com o facto de, em algumas áreas geográficas específicas, se terem produzido alguns cruzamentos da Serrana com a Bravia. Por outro lado, de um modo geral, as raças caprinas autóctones nacionais apresentam elevados índices de consanguinidade. Para este fenómeno muito contribui a pequena dimensão das cabradas e a grande desproporção entre machos e fêmeas. Nas raças exóticas estes fenómenos estarão seguramente mais esbatidos, já que a dimensão das cabradas onde a amostra foi recolhida é muito maior e os animais que as constituíam tinham diferentes proveniências. Há que lembrar, no entanto, que dos 26 marcadores inicialmente eleitos para a realização deste estudo, três (McM527, CSSM066 e McM214) tiveram de ser retirados, pois mostraram desvios ao equilíbrio de HW em praticamente todas as raças. Nestes marcadores talvez fosse de avançar com a hipótese da existência de alelos nulos, provavelmente devido à ocorrência de mutações na sequência complementar dos iniciadores. Este fenómeno tem sido observado com uma alguma frequência, quando se utilizam marcadores de uma dada espécie noutra relativamente próxima (BERUBE, *et al.*, 2003 e ARRANZ, *et al.*, 1998). Na verdade, os três marcadores retirados tinham sido isolados em bovinos e ovinos.

### **3.3.6 - HETEROZIGOTIA**

Uma das formas de avaliar a variabilidade genética de uma população é através da média da diversidade génica ou heterozigotia média. A heterozigose esperada diferencia-se da observada, pelo facto da primeira pressupor o equilíbrio de HW (NEI e KUMAR, 2000).

Neste estudo, a heterozigotia média observada variou entre  $0,694 \pm 0,033$ , na raça Algarvia e  $0,773 \pm 0,015$ , na Alpina. Por seu turno, a heterozigotia média esperada oscilou entre  $0,760 \pm 0,030$ , na Bravia, e  $0,826 \pm 0,013$ , na Alpina. Embora a bibliografia relativa a estudos de variabilidade genética em populações caprinas seja relativamente escassa, podem-se apontar alguns estudos cujos resultados serão utilizados como referência. LUIKART *et al.* (1999), num estudo de parentesco realizado com quatro raças de diferentes países, incluindo a Saanen, e usando dois *mutiplex* de 11 microssatélites cada, 6 dos quais

comuns aos por nós utilizados (ILSTS005, MAF65, SRCRSP5, SRCRSP15, SRCRSP8 e ILSTS011), obtiveram heterozigotias médias esperadas que variaram entre 0,556-0,665, valores da mesma ordem de grandeza dos nossos. Também SAITBEKOVA *et al.* (1999), num ensaio efectuado com oito raças caprinas suíças, usando 20 microssatélites, encontraram heterozigotias médias que oscilaram entre  $0,51\pm 0,05$  e  $0,58\pm 0,05$ , valores um pouco inferiores aos por nós observados, possivelmente devido ao facto dessas raças suíças estarem integradas em programas de selecção. Também com valores algo inferiores aos nossos, BARKER *et al.* (2001) referem uma diversidade genética média esperada de 0,52 (em onze raças autóctones do sudeste da Ásia para além das selvagens da Austrália, recorrendo a 25 microssatélites), mas cujos valores oscilaram entre 0,259-0,702. Num trabalho de TADLAOUI QUAFI *et al.*, (2002), levado a cabo com duas raças marroquinas e quatro francesas, recorrendo a 5 microssatélites, observaram-se valores de heterozigotia média que variaram entre  $0,630\pm 0,07$ , na raça Poitevine, e  $0,729\pm 0,04$ , na Saanen, valores mais próximos dos que nós encontramos. É ainda de salientar que, nas duas raças que tínhamos em comum com este estudo (Alpina e Saanen), os nossos resultados de heterozigotia média revelaram-se ligeiramente superiores, provavelmente devido aos programas intensivos de selecção a que estas raças têm sido sujeitas em França, nos últimos anos, e que são mesmo referidos por TADLAOUI QUAFI *et al.* (2002). Por fim, há que salientar o estudo realizado por LI (2002) e no qual os valores de heterozigotia média observada variaram entre 0,611-0,784, enquanto que os da heterozigotia média oscilaram entre 0,602 e 0,783. Estes valores mostraram-se igualmente muito próximos dos por nós obtidos.

Como já foi referido no capítulo anterior, a heterozigotia observada foi sempre inferior à esperada. A diferença mais acentuada foi obtida na raça Serrana, mostrando desta forma uma deficiência em heterozigotia. Esta deficiência, aliada aos desvios do equilíbrio de HW observados nesta raça, aponta para um possível efeito de “Wahlund”, descrito por autores como KIDD *et al.* (1980). Esta deficiência foi particularmente acentuada nos *loci*: ILSTS30, SRCRSP5, SRCRSP15, SRCRSP8 e BM1818. Destes *loci*, só o BM1818 apresentou também deficiências de heterozigotia nas restantes raças o que, neste caso em particular, levanta a suspeita da existência de alelos nulos, os quais são comuns principalmente quando os marcadores têm origem noutras espécies (ARRANZ *et al.*, 1998).

Da análise dos três ecótipos – Transmontana, Ribatejana e Jarmelista – destaca-se o facto das heterozigotias médias observadas estarem muito próximas umas das outras. De igual modo, as heterozigotias médias esperadas estão próximas umas das outras. Quando comparada a heterozigotia média esperada com a observada, para cada um dos ecótipos,

verifica-se um défice de heterozigóticos nos ecótipos Transmontano e Ribatejano, muitas vezes inferiores aos encontrados noutras raças estudadas. Nas Charnequeiras A e B, tanto as heterozigoses médias observadas, como as esperadas estão próximas. Da comparação das observadas com as esperadas sobressai o facto de na Charnequeira B haver um pequeno défice de heterozigóticos, enquanto que na Charnequeira A haver um ligeiro excesso de heterozigóticos.

Outro aspecto a salientar, é a proximidade da heterozigotia média observada entre as várias raças/ecótipos autóctones e as duas raças exóticas estudadas. A variabilidade encontrada é elevada, mas muito semelhante em todas as populações estudadas. Somando a estes resultados, aos de alguns trabalhos já anteriormente citados e aos de recentes estudos sobre a estrutura filogeográfica em caprinos através do estudo de mtDNA (LUIKART *et al.*, 2001), fica-se com a ideia de que as populações caprinas possuem um grau frágil de estruturação geográfica, ao contrário de outras espécies como a bovina. Este facto ficou, provavelmente, a dever-se a uma maior mobilidade destes animais, relativamente a outros, demonstrando uma capacidade de adaptação elevada a diversos meios. Assim se pode justificar o papel importante, que estes animais tiveram nas colonizações e migrações humanas para além de relações comerciais.

#### 3.4 - VARIABILIDADE INTERPOPULACIONAL

Neste subcapítulo, serão discutidos os resultados obtidos na análise de componentes principais, distâncias genéticas e dendrogramas.

A análise de componentes principais permite condensar o essencial da informação obtida por uma série de variáveis interdependentes, observadas directamente sobre um conjunto de indivíduos, num número mais restrito de variáveis fundamentais independentes (MALLO, 1985). A partir da análise de componentes principais, podemos saber qual a variância explicada por cada uma das componentes principais, a importância absoluta e relativa de cada um dos *loci* incluídos no estudo, para além das distâncias euclidianas permitirem a representação gráfica dos resultados (MALLO, 1985).

No estudo da análise de componentes principais do primeiro grupo (raças autóctones e exóticas), podemos verificar que a primeira componente principal explica 72,22% da variância, mostrando um afastamento claro da raça Alpina em relação às raças autóctones e à Saanen. Nesta primeira componente principal houve a intervenção de 20 alelos, com correlações superiores a 0,70. Destes alelos, os cinco que tiveram maior peso foram:

BM757 184, ILSTS005 182, SRCRSP15 182, SRCRSP5 174 e SRCRSP8, já que as correlações foram superiores a 0,90. O afastamento da raça Alpina relativamente às raças autóctones já era esperado, devido a esta apresentar uma clara diferença nos alelos mais frequentes na maioria dos marcadores analisados. No que concerne à raça Saanen, ela encontra-se afastada da raça Alpina e, de uma forma mais discreta, das raças autóctones portuguesas em estudo.

A segunda componente principal explica 9,40% da variância e define um claro afastamento da raça Alpina relativamente a todas as outras raças.

A terceira componente principal explica 5,43% da variância, mostrando um notório afastamento da raça Saanen relativamente às restantes raças. Neste caso, os cinco alelos que participaram com correlações mais elevadas foram, em valores absolutos, os: INRA006 112, RM006 136, RM006 130, INRA006 120 e BM1818 259. Estes resultados eram já esperados, uma vez que as raças Alpina e Saanen foram propositadamente seleccionadas, por serem raças padronizadas e por se prever um certo distanciamento relativamente às raças autóctones portuguesas em estudo. Quanto a este ponto, concluiu-se que a melhor raça, das exóticas, como termo de comparação era a Alpina. A proximidade das raças portuguesas entre si não é de estranhar, particularmente quando comparada com a observada relativamente à raça Alpina ou mesmo com a raça Saanen.

Ao criar um segundo grupo de análise, retirando-lhe as raças exóticas, podemos observar com maior pormenor as relações de distância entre as raças autóctones portuguesas. Assim, a primeira componente principal explica 84,32% e separa a raça Bravia do grupo formado pelas raças Serrana, Charnequeira e Serpentina. A raça Algarvia separa-se igualmente deste último grupo, embora menos do que a Bravia. Também neste caso houve a intervenção de 21 alelos, com correlações superiores a 0,70. Os cinco alelos com correlações mais elevadas, em termos de valor absoluto, foram: BM757, CSSM031, BM8125 108, SRCRSP15-187 e SRCRSP8 231. Na primeira componente principal, apenas um alelo é comum ao grupo anterior (raças autóctones e exóticas).

No plano da segunda componente principal é explicada 5,94% da variância e esta determina o afastamento claro da raça Bravia relativamente às restantes raças e um afastamento ligeiro da raça Algarvia em relação ao grupo das raças Serrana, Charnequeira e Serpentina.

No plano da terceira componente principal, que explica 4,28% de variância, observa-se um afastamento muito pronunciado da raça Algarvia relativamente ao agrupamento formado pelas raças Serrana, Serpentina e Charnequeira. Em termos de distância, a raça Bravia situa-se entre a raça Algarvia e o citado grupo de raças.

Em termos históricos, a origem das cabras portuguesas está pouco documentada e explicada. Embora alguns autores defendam a teoria segundo a qual tanto a raça Bravia como a Algarvia possam ter tido uma origem comum na Charnequeira, para além disso a Algarvia terá sofrido a infiltração de genes de cabras exóticas (DGP, 1987). Esta hipótese é difícil de testar mediante o tipo de dados por nós obtidos, uma vez que, não é evidente a origem comum da Bravia e da Algarvia, na Charnequeira já que estas apresentam muitas vezes um distanciamento considerável tanto da Charnequeira como entre si. No caso da Algarvia a interpretação ainda pode ser mais complicada se admitirmos a infiltração de diferentes genes de raças exóticas. Uma justificação, possível, para o afastamento da Bravia e Algarvia encontrado será o afastamento geográfico dos solares destas duas raças, a Bravia na região mais a Norte de Portugal e a Algarvia na região mais a Sul e suas consequências que daí possam advir. O facto das restantes raças se situarem muito próximas umas das outras não nos surpreendeu. Por outro lado, FONSECA (1998), as raças autóctones portuguesas tiveram origem em populações muito heterogéneas de animais, as quais, por diferentes condicionalismos como o relevo, a adaptação aos recursos alimentares locais, ao clima e à manutenção de alguns animais em populações mais ou menos fechadas, acabaram por resultar em populações com características próprias bem definidas, particularmente morfológicas.

A análise de componentes principais do terceiro grupo (raças autóctones portuguesa, ecótipos e exóticas) revelou que no plano da primeira componente principal se explica 72,92% da variância e que a raça Alpina está claramente separada das restantes populações, as quais se encontram agrupadas. Na primeira componente principal houve a participação de 22 alelos, com correlações superiores a 70,00%. Destes alelos, os cinco que apresentaram as correlações mais elevadas foram comuns aos apresentados no primeiro grupo (raças autóctones portuguesas e raças exóticas).

No plano da segunda componente principal foi explicada 6,66% da variância e verificou-se um claro distanciamento da raça Alpina relativamente a todas as outras raças.

No plano da terceira componente principal, que explica 4,28% da variância, a raça Saanen afastou-se das restantes raças. Nesta perspectiva, os resultados não diferem muito do primeiro grupo de análise (raças autóctones e exóticas).

Com o intuito de melhor poder discriminar as distâncias entre as populações de caprinos portugueses, retiraram-se as raças exóticas e surgiu assim o quarto grupo de análise, ou seja, o das raças e ecótipos autóctones.

No plano da primeira componente principal foi explicada 79,23% da variância e verificou-se uma formação clara de dois grupos. De um lado temos a Charnequeira A e a B, muito próximas, e do outro o grupo dos três ecótipos Ribatejano, Jarmelista e Transmontano, que apresentam entre si um certo afastamento, nalguns casos, maior do que observado entre raças. Também neste caso houve a intervenção de 20 alelos, com correlações superiores a 70,00%. Destes alelos, os cinco com correlações mais elevadas não coincidiram com os do primeiro grupo de estudo (raças autóctones); em comum, apenas se encontrou o alelo SRCRSP15 187. A proximidade entre as Charnequeiras A e B não nos surpreendeu, pois elas terão tido a mesma origem, embora, por ocuparem zonas geográficas distintas e terem estado sujeitas a condicionalismos ambientais próprios, tais como os de natureza alimentar, entre outros, tenham adquirido uma certa diferenciação morfológica, mas muito provavelmente não genética, pelo menos tendo em conta os marcadores por nós utilizados.

No plano da segunda componente principal foi explicada 4,95% da variância e continuaram a distinguir-se os dois grandes grupos já referidos no plano da primeira componente principal, embora o afastamento dos ecótipos – Ribatejana, Jarmelista e Transmontana – tenha sido ligeiramente inferior, observando-se o mesmo com a Charnequeira A e a Charnequeira B.

No plano da terceira componente principal observou-se a mesma tendência, embora a separação entre Charnequeiras A e B fosse quase inexistente e a separação dos três ecótipos da raça Serrana tenha sido também inferior. Para além do que foi referido, a raça Bravia mostrou um claro afastamento das outras populações caprinas. A formação de um grupo que, de uma forma mais ou menos evidente, se manteve ao longo dos vários planos das diferentes componentes principais, leva-nos a acreditar que a raça Serrana é uma das raças autóctones mais antigas, tal como referido por ORTIGOSA (1926) e que, por motivos de deriva genética ou outros, tenha dado origem a grupos distintos à medida que os anos decorreram. Na mesma perspectiva, pensamos que as Charnequeiras A e B, se tenham diferenciado por processos idênticos, mas há menos tempo, sendo provável, uma maior proximidade genética.

A análise das componentes principais destacou, claramente, o facto da raça Alpina apresentar o maior distanciamento em relação às restantes populações caprinas. A raça Saanen também se distanciou das populações autóctones portuguesas, embora este facto só se tenha tornado mais evidente no plano da terceira componente principal. É de referir o distanciamento das raças Bravia e Algarvia relativamente às demais raças autóctones, bem

como entre si, em alguns planos das componentes principais. Quando a análise foi feita a nível dos ecótipos das raças Serrana e Charnequeira, a relação destes com as raças exóticas Alpina e Saanen foi semelhante à observada aquando da análise conjunta das raças autóctones e exóticas. Enquanto que com os ecótipos Charnequeira A e Charnequeira B se verificou uma grande proximidade, já com os ecótipos Transmontano, Jarmelista e Ribatejano observou-se a formação de um grupo, cujas distâncias entre si eram, por vezes, superiores às encontradas entre algumas raças. Num caso já referido, a raça Serpentina, no plano da primeira componente principal, distanciou-se de todas as outras raças, embora no plano das restantes componentes principais esse distanciamento tenha deixado de ser notório. Pensa-se que, tanto esta raça como a Algarvia têm origem no ramo Charnequeira, com prováveis mestiçamentos, inclusivamente de raças espanholas (DGP, 1987).

### **3.4.1 - DISTÂNCIAS GENÉTICAS E DENDROGRAMAS**

O uso de distâncias genéticas permite-nos compilar toda a informação obtida pelos marcadores utilizados, indicando-nos algumas das diferenciações que possam existir entre as raças e ecótipos estudados.

Os dendrogramas são o método mais comum na análise filogenética. Estes são construídos usando uma matriz de distâncias entre todos os possíveis pares das  $n$  populações estudadas (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994). Existem muitas formas de cálculo das distâncias genéticas e muitos métodos de construção dos dendrogramas. Nesta perspectiva, cabe-nos, em primeiro lugar, justificar as opções que fizemos e que julgamos serem as mais apropriadas a este estudo.

A maior parte dos autores afirma, que as frequências alélicas são úteis para estudar as relações filogenéticas de espécies ou populações muito próximas. Desta forma, o cálculo das distâncias genéticas revelou-se muito importante e as primeiras distâncias foram calculadas assumindo um modelo de “*Infinite-Allele Model*” (IAM), ou seja, os novos alelos mutantes são sempre diferentes dos já existentes na população (KIMURA e CROW, 1964), situação bastante adequada aos marcadores clássicos, como as proteínas e os polimorfismos sanguíneos (NEI, 1987), assim como, em alguns casos, aos microssatélites.

Nos últimos anos, a utilização sistemática dos microssatélites nas análises filogenéticas e a constatação de que de uma forma geral, estes marcadores estariam sujeitos a um Modelo Mutacional em *Stepwise* (SMM), levou a que GOLDSTEIN *et al.* (1995b) e SHRIVER *et al.* (1995) desenvolvessem novas medidas de distâncias genéticas. Porém, a

eficácia destas medidas na reconstrução filogenética, relativamente às tradicionais, não é muito clara, quando estas são aplicadas aos microssatélites (TAKEZAKI e NEI, 1996). Diferentes factores podem contribuir para esta ocorrência, entre eles o facto do processo mutacional dos microssatélites ser irregular (FORBES *et al.*, 1995; GARZA *et al.*, 1995 e GOLDSTEIN *et al.*, 1995b), a existência de restrições nas repetições atingíveis (neste caso a linearidade com o tempo vai ser alterada), a diferentes taxas mutacionais em diferentes *loci* e a variações no tamanho das populações. Outro facto a não descurar é que, em populações muito próximas, a deriva genética parece gerar uma maior diferenciação do que o processo de mutação (PÉREZ-LEZAUN *et al.*, 1997).

Devido ao que foi exposto, e ao facto da distância  $D_A$  de NEI *et al.* (1983) poder admitir um modelo mutacional de IAM ou SMM, para além de ser uma das mais correctas na obtenção de topologia nos dendrogramas (TAKEZAKI e NEI, 1996), justifica-se assim, a nossa opção por esta. A segunda distância escolhida foi a  $D_S$ , visto ser muito utilizada, com bons resultados (BARKER *et al.*, 2001 e LI *et al.*, 2002), para além de permitir a comparação com outros estudos. BARKER *et al.* (2001) referem ainda que os resultados alcançados no seu estudo, através da distância de REYNOLDS (1995) (muito usada com microssatélites), foram muito semelhantes aos obtidos pela distância  $D_S$ . Apesar da distância –  $\delta\mu^2$  (GOLDSTEIN *et al.*, 1995b) – ter sido especialmente desenvolvida para microssatélites e aconselhada para estimar o comprimento dos ramos, nós não a elegemos, uma vez que esta distância se ajusta melhor a populações mais divergentes (GOLDSTEIN e POLLOCK, 1997) do que aquelas que calculávamos serem as nossas.

Segundo a bibliografia consultada, os métodos mais utilizados na reconstrução filogenética são o UPGMA (SKAL e MICHENER, 1958) e o NJ (SAITOU e NEI, 1987). Neste estudo optámos pelo NJ, dado que este método, no caso de existirem estrangulamentos das populações estudadas, garante melhores resultados do que o método UPGMA (TAKEZAKI e NEI, 1996). Outro motivo relaciona-se com o facto do método UPGMA oferecer uma melhor topologia do dendrograma, quando se utiliza a  $D_S$  no caso dos marcadores clássicos, mas não dos microssatélites (NEI e TAKEZAKI, 1994).

Um outro aspecto considerado prende-se com o possível cruzamento de informação obtida no nosso trabalho com a de outros autores, nomeadamente em estudos que envolveram caprinos. Aqui há que referir a escassez de informação publicada. Para além de outros problemas, como a impossibilidade de comparar os microssatélites com outro tipo de marcadores, uma vez que estes últimos são hipervariáveis e, como tal, produzem maiores distâncias quando comparados com outros marcadores. Estas distâncias também se

vêm afectadas pelo tamanho das populações, pela taxa de mutação dos marcadores e pela quantidade de marcadores utilizados.

A partir da análise das distâncias de  $D_A$  (NEI *et al.*, 1983) e  $D_S$  (NEI, 1972), para as 5 raças autóctones portuguesas e 2 exóticas, pode-se afirmar que, de um modo geral, os resultados encontrados estão em consonância com os obtidos através da análise das componentes já discutida. Assim, uma vez mais o maior distanciamento da raça Alpina relativamente a todas as outras raças consideradas foi evidente. A raça Saanen foi, em geral, a segunda raça a apresentar distâncias mais elevadas em relação às restantes raças. Contudo, em alguns casos, essa superioridade não foi mantida. Já que a sua distância relativamente às raças Charnequeira ( $D_A=0,175$  e  $D_S=0,179$ ), Serpentina ( $D_A=0,081$  e  $D_S=0,190$ ) ou Serrana ( $D_A=0,147$  e  $D_S=0,190$ ) foi idêntica ou inferior à distância encontrada entre as raças Bravia e Algarvia ( $D_A=0,150$  e  $D_S=0,206$ ). Em alguns planos das componentes principais, estes resultados também se fizeram sentir. Este maior distanciamento poderá ser justificado pelo grande afastamento geográfica que separa os solares das raças Bravia e Algarvia. Por fim, verificou-se uma proximidade elevada entre as raças Charnequeira, Serpentina e Serrana, o que de acordo com autores como ORTIGOSA (1926) e MAGRO (1959), não deveria acontecer, já que teriam uma origem distinta. Porém, as teorias destes autores nunca foram comprovadas. Segundo FONSECA (1988) e com o qual, os nossos resultados estão mais de acordo, este facto só pode ser justificado através da grande heterogeneidade da origem das populações caprinas nacionais e da ocorrência de possíveis mestiçamentos, principalmente nos limites das zonas de dispersão de cada raça, ou em áreas comuns de dispersão de diferentes raças. A avultar este problema, conta-se com a possibilidade de registar animais de origem incerta nos livros genealógicos, desde que obedeçam aos parâmetros estabelecidos para a raça.

A fim de calcular o segundo conjunto de distâncias atrás mencionado, para as mesmas populações, substituímos a raça Charnequeira pelos seus ecótipos A e B e a raça Serrana pelos seus ecótipos, Transmontano, Jarmelista e Ribatejano. De um modo geral, os resultados obtidos são concordantes com os observados através da análise de componentes principais, com ligeiras modificações. Assim, para a distância  $D_A$ , as populações mais próximas formaram o par Serpentina-Charnequeira e Transmontana-Serpentina, embora os ecótipos Charnequeiras A e a Charnequeira B continuassem a estar muito próximos, dado que a sua distância era da ordem de grandeza das outras. Com a distância  $D_S$ , as populações mais próximas foram a Charnequeira A e a Charnequeira B. No que respeita aos ecótipos da Serrana, as distâncias encontradas entre eles ( $D_A$  e  $D_S$ ) revelaram-se muito

superiores às encontradas entre os ecótipos Charnequeira A e charnequeira B. Em alguns casos, as distâncias entre ecótipos foram superiores a algumas distâncias entre raças autóctones. Este facto sugere que, admitindo uma origem comum para os diferentes ecótipos de cada raça, os da Serrana se tenham diferenciado há mais tempo do que os da Charnequeira ou que os efeitos da deriva tenham sido mais notórios na primeira. A pequena distância observada entre as Charnequeiras A e B poderá ser muito recente e ter origem num isolamento geográfico, uma vez que a Charnequeira A povoa o Sul do Alentejo (Santiago do Cacém, Sines e Odemira) e a Charnequeira B (população mais numerosa) habita uma zona mais para Norte (Castelo Branco, Idanha-a-Nova, Penamacor e Vila Velha do Rodão). Também em termos produtivos, a Charnequeira B tem melhores aptidões reprodutivas e leiteiras, enquanto que a Charnequeira A é mais utilizada para a produção de cabritos (DGP, 1987). Quanto aos ecótipos da raça Serrana, as diferenças não se reduzem a aspectos morfológicos visto que, de acordo com o ecótipo, varia a principal aptidão produtiva. Assim, por exemplo, o ecótipo Jarmelista possui uma aptidão leiteira mais vincada do que o Transmontano. Com as demais raças, os resultados encontrados mostraram-se semelhantes aos obtidos através do cálculo das distâncias para as 5 raças autóctones e 2 exóticas.

A construção de dendrogramas é o resultado final de um estudo filogenético, permitindo de uma forma gráfica pôr em evidência as diferentes relações entre as populações em estudo. Tendo por base as matrizes de distância genética e utilizando o método de NJ, obtivemos primeiramente dois dendrogramas referentes às cinco raças autóctones portuguesas e duas exóticas. O primeiro dendrograma teve por base a distância  $D_A$ , enquanto que o segundo teve por base a distância  $D_S$ . Estes dois dendrogramas mostram a separação das duas raças exóticas, com valores de *bootstrap* máximos, já observada noutros métodos de análise. Verificou-se uma certa imprecisão no posicionamento das raças Serrana e Bravia, com valores de *bootstrap* bastante baixos. Com a distância  $D_A$ , as raças Charnequeira e Bravia apareceram muito próximas, com um valor de *bootstrap* de 53%, o que nos leva a considerar como possível a origem comum destas raças (DGP, 1987). Como dado novo temos a proximidade entre as raças Algarvia e Serpentina, com valores de *bootstrap* consideráveis, o que se pode entender como resultado de fluxos de animais, uma vez que habitam áreas geográficas vizinhas.

Quando se passa à análise das diferentes raças, substituindo no entanto as raças Serrana e Charnequeira pelos respectivos ecótipos e utilizando para o efeito as distâncias  $D_A$  e  $D_S$ , obtiveram-se dois dendrogramas que, de um modo geral, revelaram ser

semelhantes, ainda que apresentassem algumas particularidades distintas. Em ambos os dendrogramas, as raças exóticas eram as que mais se distanciavam das outras raças, embora quando se utilizou a distância  $D_A$  este afastamento fosse mais notório, particularmente em relação à raça Saanen. No que se refere à raça Alpina, esta é a análise, das várias efectuadas, que melhor evidencia a sua distância relativamente às restantes raças caprinas estudadas. A proximidade da Charnequeiras A e Charnequeira B é apoiada por valores de *bootstrap* consideráveis, tanto com a distância  $D_A$  como com a distância  $D_S$ . A análise de componentes principais está em consonância com estes resultados. Os ecótipos da raça Serrana apresentaram-se mais próximos do que nos métodos de análise anteriormente utilizados, indo de encontro ao que teoricamente seria de esperar. A proximidade das raças Algarvia e Serpentina não é de estranhar, uma vez que a DGP (1987), refere a raça Serpentina como tendo uma possível origem espanhola e a raça Algarvia como sendo o produto do cruzamento entre animais da raça Charnequeira e animais de raças exóticas espanholas. Por outro lado, estas raças ocupam áreas geograficamente próximas, o que poderá ter permitido um fluxo genético entre elas. Os valores de *bootstrap* bastante débeis revelaram, mais uma vez, a posição incerta da raça Bravia (tanto com a distância  $D_A$  como com a distância  $D_S$ ). Pensamos que este último resultado não foi surpreendente pois, tal como já foi anteriormente referido, são vários os autores que acreditam que a raça Bravia teve origem na raça Charnequeira. Os dendrogramas indicam igualmente a existência de dois grandes grupos, que poderíamos interpretar como sendo os dois grupos étnicos e suas “variedades” referidos por ORTIGOSA (1926): a chamada raça da Serra e a Charnequeira. A partir daí, e por diferentes condicionalismos como o relevo, os recursos alimentares, as condições climáticas e a manutenção dos animais em populações mais ou menos fechadas produziu-se uma elevada heterogeneidade, a qual com o tempo, se foi tornando mais evidente e originou características morfológicas bem definidas (FONSECA, 1988). Posteriormente, estas teriam possibilitado a atribuição do estatuto de raças a algumas populações (FONSECA, 1988).

Segundo LUIKART (1999), o estudo da variação dos microssatélites contém muita informação acerca da história populacional, que na maior parte dos estudos não é aproveitada. No nosso estudo, aparentemente existem algumas incongruências nos resultados encontrados. Contudo, pensamos que elas podem ser entendidas como o reflexo de uma realidade em que temos de admitir uma fraca estruturação genética dos caprinos nacionais e que, frequentemente, advém de factos como a existência de mestiçagens e a possibilidade de se registarem fêmeas de origem desconhecida nos livros genealógicos,

desde que obedecem ao padrão da raça. Apesar de tudo, LI *et al.* (2002) chegaram à conclusão de que os microssatélites são marcadores que se adaptam bem a estudos de diversidade genética em caprinos, mesmo que estas populações estejam muito próximas. É evidente que a noção de “muito próxima” é relativa, uma vez que as raças chinesas, comparadas com as nossas, terão à partida uma maior probabilidade de se encontrarem muito mais afastadas umas das outras, á partida porque se encontram geograficamente mais dispersas. Por seu turno, SAITBKOVA *et al.* (1999), num estudo realizado com raças caprinas suíças, concluíram que, apesar de se pensar que os microssatélites são capazes de avaliar a variabilidade populacional e de esta poder ser interpretada em termos evolutivos, a sua utilidade para diferenciar populações ou indivíduos pode ser discutível. Por um lado, o cruzamento entre raças vizinhas é muito frequente em populações caprinas, o que dificulta a tentativa de diferenciar populações. Por outras, várias razões, persiste sempre o problema de saber qual deverá ser a distância entre duas populações para que estas sejam consideradas duas raças.

Sabe-se que, do ponto de vista zootécnico, as características que definem uma raça são primordialmente morfológicas, ainda que também sejam considerados alguns factores comportamentais e produtivos. Nos estudos genéticos, utiliza-se geralmente a variabilidade alélica de sequências de DNA (no nosso caso microssatélites) consideradas neutras do ponto de vista da selecção. A partir dela estimam-se parâmetros como as distâncias genéticas e criam-se dendrogramas que oferecem uma informação relativa ao grau de diferenciação genética que existe entre as populações estudadas e os resultados obtidos podem mesmo ser avaliados em termos de evolução. Contudo, quando se pretende definir populações ou raças o problema torna-se mais complexo. Até à presente data, não existem marcadores específicos de raças ou populações, o que seria muito útil para defender, de uma forma absolutamente idónea, certos produtos animais.

Segundo SAN PRIMITIVO (2002), os últimos factos acima mencionados explicam-se de uma forma simples. Os animais são classificados apenas por observação de características morfológicas externas, algumas fixadas devido a processos de selecção e pelas quais é responsável apenas uma pequena percentagem de genes (pensa-se que, na espécie humana, essa percentagem é de 0,1%). Quando se realiza a mesma classificação, utilizando para o efeito marcadores do tipo dos microssatélites considerados neutros frente à selecção e que parecem não intervir na determinação dos caracteres morfológicos externos, depara-se com uma variabilidade total próxima dos 90% de origem intrapopulacional (MACHUGH *et al.*, 1998 e ARRANZ *et al.*, 2001). Para obviar a esta

situação, SAN PRIMITIVO (2002) opina que, se as raças se caracterizam por aspectos morfológicos, de comportamento e/ou produtivos, se deve investigar no sentido de encontrar os genes responsáveis por estes caracteres, identificando os alelos que produzem cada fenótipo específico e confirmando-se que cada conjunto alélico se encontre presente em todos os indivíduos de uma raça. Nesta perspectiva, o estudo que aqui desenvolvemos, representa uma contribuição para a caracterização das raças autóctones caprinas.

Não esquecendo que numa perspectiva mais abrangente podemos situar este estudo e muitos dos já anteriormente citados no âmbito da preservação dos recursos genéticos e nesse ponto de vista, estamos de acordo com CREPALDI *et al.* (2001), ou seja, de que a protecção da diversidade genética não se deve apenas basear em informações fenotípicas, uma vez que estas são insuficientes para considerar características do genoma. Por outro lado, a utilidade dos marcadores moleculares, apenas, para a identificação de prioridades de conservação, será insuficiente, uma vez que, seria vantajoso poder detectar alelos valiosos e características adaptativas seleccionadas pelo ambiente e pelo homem, a que muitas vezes não se lhe deu a devida importância. De qualquer forma, a informação molecular pode identificar populações com histórias evolutivas comuns, albergando alelos originais para características que não estão sujeitas à pressão de selecção, mas potencialmente úteis no futuro, devendo ser consideradas como uma ferramenta complementar da caracterização fenotípica e produtiva.

As presentes limitações à interpretação dos dados moleculares só poderão ser ultrapassadas através da obtenção de resultados que permitam uma clara associação entre os genes e as características específicas raciais. Na verdade, a combinação de marcadores moleculares do tipo dos microssatélites e de genes ligados a determinadas características poderá permitir uma avaliação global do genoma. Esta, por sua vez, fornecerá informação complementar sobre a variação quantitativa das características de adaptação e de outras mais raras, frequentemente utilizadas como base de decisão na preservação de recursos genéticos.



#### 4 - CONCLUSÕES

Com este estudo foi possível constituir um conjunto de marcadores microssatélites, que podem ser amplificados conjuntamente (multiplex) e que se revelaram ótimos para a realização de estudos populacionais em caprinos, devido à sua elevada variabilidade e facilidade de identificação. No futuro, a metodologia desenvolvida neste trabalho poderá ser utilizada no estabelecimento, em raças autóctones, de sistemas que permitam o controlo de parentesco, para além de poder constituir a base para um sistema de rastreabilidade de produtos animais caprinos. Estes aspectos podem revelar-se de extrema importância na rentabilidade das explorações de raças caprinas autóctones portuguesas, servindo de ponto de partida para a conservação destas raças.

A variabilidade genética das populações autóctones caprinas nacionais foi semelhante e, nalguns casos, mesmo superior à de populações caprinas de outros países.

Os microssatélites analisados mostraram ter um elevado número de variantes alélicas. Assim, o número máximo de alelos afectos a cada *locus*, nas diferentes populações avaliadas, variou entre 6 (BM757) e 19 alelos (CSSM031 e ANPRC).

Quanto ao número médio de alelos para cada raça estudada, observou-se uma variação que oscilou entre  $12,7 \pm 0,8$ , na raça Serrana, e  $9,6 \pm 0,7$ , na raça Saanen. A maioria dos ecótipos revelou um número de alelos médios inferior, quer devido ao pequeno tamanho das amostras conseguidas, quer à existência de diferenças inerentes a cada ecótipo.

A heterozigotia média observada das raças autóctones portuguesas caprinas, apesar de ter atingido valores elevados ( $0,581 \pm 0,033$  a  $0,621 \pm 0,041$ ), mostrou um défice de heterozigotia que atingiu o seu máximo na raça Serrana e que poderá ser justificado pelo efeito de subdivisão da população ou efeito de “Wahlund”. No estudo dos ecótipos, o défice de heterozigotia não foi tão notório e a própria heterozigotia média observada atingiu valores mais elevados que em algumas das raças estudadas.

O número de alelos exclusivos exibidos por cada raça foi muito diminuto. A raça que mostrou um maior número de alelos exclusivos foi a Serrana, representando estes apenas 5,5% de todos os alelos encontrados.

Todas as metodologias empregues neste estudo, relativamente à variabilidade interpopulacional, demonstram um claro afastamento das raças autóctones face às exóticas, principalmente no que respeita à Alpina.

No que respeita às relações entre as raças autóctones portuguesas caprinas, há que salientar o seguinte:

- Os resultados obtidos através da análise de componentes principais, assim como das distâncias utilizadas, estão em consonância e revelaram um afastamento das raças Bravia e Algarvia, relativamente ao conjunto das raças Serpentina, Charnequeira e Serrana. Por outro lado, verificou-se também um afastamento claro entre as raças Bravia e Algarvia, que facilmente se poderá explicar pelo distanciamento geográfico dos seus solares. No que respeita aos ecótipos, registou-se uma grande proximidade entre o Charnequeira A e o Charnequeira B. Os ecótipos da raça Serrana mostraram-se mais afastados, apresentando por vezes distâncias maiores do que as observadas entre algumas raças.
- A análise dos dendrogramas revelou algumas diferenças relativamente à metodologia multivariante. Assim, há uma certa imprecisão no posicionamento das raças Bravia e Serrana, devido provavelmente a fluxo de genes entre elas. Há uma possibilidade de proximidade entre as raças Charnequeira e Bravia, também defendida por alguns autores, pelo facto de presumivelmente terem tido uma origem comum. A proximidade entre os ecótipos Charnequeira A e B viu-se reforçada por valores de *bootstrap* elevados. Os ecótipos da raça Serrana mostraram-se mais próximos do que nos métodos anteriores. Finalmente, verificou-se existir uma proximidade entre as raças Algarvia e Serpentina, que poderá ser facilmente explicada pela proximidade geográfica dos seus solares.

Numa perspectiva de conservação de recursos genéticos animais, em que urge a caracterização prévia das populações, esta não se deve restringir apenas a aspectos morfológicos ou produtivos, nem à utilização pura de marcadores moleculares que, embora sejam ferramentas muito úteis nestes estudos, não são capazes de distinguir pelo menos de uma forma precisa, as diferentes raças domesticadas. Outro aspecto a ter em conta, é o de que, apesar do grande esforço que se tem realizado na procura de modelos matemáticos que se ajustem perfeitamente ao comportamento dos microssatélites, estes estão longe de ser perfeitos, fornecendo-nos, por vezes, resultados ambíguos. Estas limitações ao uso dos marcadores moleculares como meios de distinção entre populações de uma mesma espécie, só poderão ser ultrapassadas, quando permitirem uma associação inequívoca entre os genes e as características raciais específicas para além da utilização de modelos matemáticos

mais ajustados à sua análise. Assim e tendo em conta as vantagens reconhecidas destas metodologias de estudo de populações de espécies animais, julga-se ser importante intensificarem-se os estudos nesse sentido.

De qualquer forma, e apesar das limitações anteriormente mencionadas, neste estudo, os microssatélites revelaram-se capazes de avaliar a variabilidade e as relações populacionais, demonstrando ser, no momento actual, uma das melhores ferramentas moleculares para o estudo das relações genéticas entre as diferentes raças.



### PARTE III – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ADACHI, J. e HASEGAWA, M., 1995. Molphy: Programs for molecular phylogenetics. Inst. Statist. Math, Tóquio, Japão.
- AJMONE-MARSAN, P., NEGRINI, R., CREPALDI, P., MILANESI, E., GORNI, C., VALENTINI, A. e CICOGNA, M., 2001. Assessing genetic diversity in Italian goat populations using AFLP markers. *Animal Genetics*, **32**: 281-288.
- ALDERSON, L., 1990. Genetic conservation of domestic livestock. CAB Internacional. Wallingford, Reino Unido.
- ALLARD, M.W., MIYAMOTO, M.M., JANECKI, L., KRAUS F. e TENNANT, M.F., 1992. DNA systematic and evolution of the artiodactyls family Bovidae. *Proc Natl ACAD SCI USA*, **89**: 3972-3975.
- ALLENDORF, F.W. e LEARY, R.F., 1986. Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. *In*: Conservation biology, M.E. SOULÉ (Ed). Sunderland: Sinauer Press, Stamford, EUA, 57-76.
- ALTARRIBA J., ZARAZAGA I. e CALAVIA, J., 1979. Primeros resultados obtenidos en la estimación de las relaciones filogenéticas existentes entre diez razas ovinas españolas, a partir de las mediciones del esqueleto cefálico y del hueso de la caña. *In*: IV Jornadas Científicas de la SEOC, Saragoça, Espanha, 77-83.
- AMOS, W. e RUBINSZTEIN, D.C., 1996. Microsatellites are subject to directional evolution. *Nature Genetics*, **12**: 13-14.
- ANDERSEN, R.M., MCEWAN, K.M., BIXLEY, M.J. e TATE, M.L., 1998. Identification and mapping of Species-specific AFLP bands in deer. *In*: Proceedings of XXXVI<sup>th</sup> International Conference on Animal Genetics Auckland, Nova Zelândia, 19 pp..
- APARÍCIO S. G., 1944. Zootecnia Especial. Córdova, Espanha.
- ARCHIBALD, A.L., HALEY, C.S., BROWN, J.B., COUPERWHITE, H.A., MCQUEEN, N.D., COPPIETERS, W., VAN de WEGHE, A., STRATIL, A. e WINTERO, A.K., 1995. The PiGMaP consortium linkage map of the pig. *Mamm Genome*, **6**: 157-175.

- AREVALO, E., HOLDER, D.S., DERR, J.N., BHEBHE, E., LINN, R.A., RUVUNA, F., DAVIS S.K. e TAYLOR, J.F., 1994. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at the SR-CRSP-1, SR-CRSP-2, SR-CRSP-3, SR-CRSP-4 e SR-CRSP-5 loci. *Anim Genet*, **3**: 202.
- ARRANZ, J.J., 1994. Estudio genético en poblaciones bovinas mediante polimorfismos bioquímicos y DNA (variaciones puntuales y microsátélites). Tese de doutoramento, Universidade de León, Leão, Espanha.
- ARRANZ, J.J., BAYÒN, Y. e SAN PRIMITIVO, F., 1996. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics*, **27**: 415-419.
- ARRANZ, J.J., BAYÒN, Y. e SAN PRIMITIVO, F., 1998. Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Animal Genetics*, **29**: 435-444.
- ARRANZ, J.J., BAYÒN, Y. e SAN PRIMITIVO, F., 2001. Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet Sel Evol*, **33**: 529-542.
- ASHWELL, M.S., REXROAD, C.E. Jr., MILLER, R.H. e VAN RADEN, P.M., 1996. Mapping economic trait loci for somatic cell score in Holstein cattle using microsatellite markers and selective genotyping. *Animal Genetics*, **27**: 235-242.
- ATLAS GEOGRÁFICO, 1991. A Vida na terra. Grande Enciclopédia Portuguesa e Brasileira, Parte III, Editorial Enciclopédia Ltd, Lisboa, Portugal, 474 pp..
- AZEVEDO, J.M.T., 1985. Contributo para o estudo dos sistemas de exploração ovina. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal, 164 pp..
- BALDING, D.J., 1995. Estimating products in forensic identification using DNA profiles. *Journal of the American Statistical Association*, **90**: 839-844.
- BARENDSE, W., ARMITAGE, S.M., KOSSAREK, L.M., SHALOM, A., KIRKPATRICK, B.W., RYAN, A.M., CLAYTON, D., LI, L., NEIBERGS, H.L. e ZHANG, N., 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genet*, **6**: 227-234.

- BARKER, J.S.F., 1994. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock. *In: Proceeding of 5<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, University of GUELPH, Ontario, Canadá, **21**: 501-508.
- BARKER, J.S.F., BRADLEY, D.G., FRIES, R., HILL, W.G., NEI, M. e WAYNE, R.K., 1993. An integrated global program to establish the genetic relationships among the breed of each domestic animal species. *Animal Production and Health*. Division FAO, Roma, Itália, 30 pp..
- BARKER, J.S.F., MOORE, S.S., HETZEL, J.S., EVANS, D. e TAN, S.G., 1997. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalus*) microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Anim Genet*, **28**: 103-115.
- BARKER, J.S.F., TAN, S.G., MOORE, S.S., MUKHERJEE, T.K., MATHESOM, J.-L., e SELVARAJ, O.S., 2001. Genetic variation within and relationship among populations of Asian goats (*Capra hircus*). *J Anim Breed Genet*, **118**: 213-233.
- BHATTACHARYYA, A., 1946. On a measure of divergence between two multinomial populations. *Sankhya*, **7**: 401-406.
- BEERY, D. e HARTIGAN, J.A., 1987. Asynchronous distance between homologous DNA sequences. *Biometrics*, **43**: 261-276.
- BERUBE, Y., RITLAND, C. e RITLAND, K., 2003. Isolation, characterization and cross-species utility of microsatellites in yellow cebar (*Chamaecypary notkatenis*). *Genome*, **46**: 353-365.
- BELKHIR, K., 2000. GENETIX (4.02), logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, França.
- BELYAEV, D.K., 1979. Destabilizing selection as a factor in domestication. *Journal of Heredity*, **70**: 301-308.
- BHEBHE, E., KOGI, J., HOLDER, D.A., AREVALO, E., DEER, J.N., LINN, R.A., RUVUNA, F., DAVIS, S.K. e TAYLOR, J.F. 1994. Caprine microsatellite dinucleotide repeat polymorphisms at SR-CRSP-6, SR-CRSP-7, SR-CRSP-8, SR-CRSP-9, SR-CRSP-10 loci. *Anim Genet*, **25**: 203.

- BINDER, K. e HEERMANN, D.W., 1988. Monte Carlo Methods in Statistical Physics. Springer-Verlag, Berlim, Alemanha, 127 pp..
- BISHOP, M.D., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., STONE, R.T., SUNDEN, F., HAWKINS, G.A., TOLDO, S.S., FRIES, R., GROSZ, M.D., YOO, J. e BEATTIE, C.W., 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, **136**: 619-639.
- BJORNSTAD, G. e ROED, K.H., 2001. Breed demarcation and potential for breed allocation of horsers assessed by microsatellite markers. *Anim Genet*, **32**: 59-65.
- BLOTT, S.C., WILLIAMS, J.L. e HALEY, C.S., 1998. Genetic relationships among European cattle breeds. *Anim Genet*, **29**: 273-382.
- BOTSEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. e DAVIS, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map using restrictions fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, **32**: 314-331.
- BOWCOCK, A. M., RUIZ-LINARES, J., MINCH, E. e KIDD, J.R., 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, **368**: 455-457.
- BRAGANÇA, P., 1999. Estabelecimento de um sistema de controlo de parentesco no gado caprino mediante Marcadores de ADN do tipo Microsatélite. *Relatório Final de Estágio*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, **64** pp..
- BRITO, A.N.V.B.V., 2002. Contributo para o estudo de algumas raças bovinas autóctones do noroeste de Portugal. Tese de Doutoramento. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro. Vila Real, Portugal.
- BULMER, M., 1991. Use of the method of generalized least squares in reconstructing phylogenies from sequence data. *Mol Biol Evol*, **8**: 862-883.
- BUNCH, T.D., 1978. Fundamental karyotype in domestic and wild species of sheep. *J Hered*, **69**: 77-80.
- BUCHANAN, F.C., ADAMS, L.J., LITTLEJOHN, R.P., MADDOX, J.F. e CRAWFORD, A.M., 1994. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, **22**: 397-403.

- CALDAS, E.C., 1991. A Agricultura Portuguesa através dos tempos. Instituto Nacional de Investigação Científica, Imprensa Nacional - Casa da Moeda, Lisboa, Portugal, 653 pp..
- CALHEIROS, F.C., 1981. Sheep and Goat production. Meeting of the cooperative Network on sheep production (26-29 Maio). Estação Zootecnica Nacional, Vale de Santarém, Portugal, 115 pp..
- CALLEN, D.F., THOMPSON, A.D., SHEN, Y., PHILLIPS, H., RICHARD, R.I., MULLEY, J.C. e SUTHERLAND, G.R., 1993. Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite marker. *Am J Hum Genet*, **52**: 922-927.
- CAÑON, J., ALEXANDRINO, P., BESSA, I., CARLEOS, C., CARRETERO, Y., DUNNER, S., FERRAN, N., GARCIA, D., JORDANA, J., LALOE, D., PEREIRA, A., SANCHEZ, A. e MOAZAMI-GOUDARZI, K., 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet Sel Evol*, **33**: 311-332.
- CAÑON, J., CHECA, M.L., CARLEOS, C., VEGA-PLA, J.L. e VALLEJO, D.S., 2000. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Anim Genet*, **31**: 39-48.
- CARRINGTON, M., MARTI, D., WADE, J., KLITZ, W., BARCELLOS, L. GLENYS, T., THOMPSON, T., CHEN, J.; TRUEDSSON, L.; STURFELT, G., ALPER, C., AWDEH, Z. e HUTTLEY, G., 1999. Microsatellite markers in complex disease: mapping disease-associated regions within the human major histocompatibility complex. *In*: Microsatellites evolution and applications. D.B. GOLDSTEIN e C. SCHÖTTERER (Eds). Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 225-236.
- CASTRO, A., 1984. A cabra. Livraria Freitas Bastos S.A., Rio de Janeiro, Brasil, 372 pp..
- CAVALLI-SFORZA, L.L., 1969. Human diversity. *Proc. 12<sup>th</sup> Intl. Cong. Genet.*, Tokyo, **3**: 405-416.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. e EDWARDS, A.W.F., 1964. Analysis of Human evolution. *In*: *Proc. 11<sup>th</sup> Intl. Cong. Genet.*, 923-933 pp..

- CAVALLI-SFORZA, L.L. e EDWARDS, A.W.F., 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am J Hum Genet*, **19**: 233-257.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. e PIAZZA, A., 1994. Introduction to concepts, data and methods. *In*: The history and geography of human genes, Princeton University Press, Nova Jersey, EUA, páginas pp..
- CHAPCO, W., 1976. An exact test of the Hardy-Weinberg law. *Biometrics*, **32**: 183-189.
- CHARKRABORTY, R., 1977. Estimation of time of divergence from phylogenetic studies. *Can J Genet Cytol*, **19**: 217-223.
- CHARKRABORTY, R., KIMMEL, M., STIVERS, D.N., DAVISON, J. e DEKA, R., 1997. Relative mutation rates at di-, tri- and tetranucleoides microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**: 1041-1046.
- CHAVES, R., GUEDES-PINTO, H., HESLOP-HARRISON, J. e SCHWARZACHER, T., 2000. The species and chromosomal distribution of the centromeric alpha-satellite. I sequence from sheep in the tribe Caprini and other Bovidae. *Cytogenet Cell Genet*, **91** (1-4): 62-66.
- CHEN, S., SUPAKAR, P.C., VELLANOWETH, R.L., SONG, C.S., CHATTERJEE, B. e ROY, A.K., 1997. Functional role of a conformational flexible homopurine/homopyrimidine domain of the androgen receptor gene promoter interacting with SP1 and a pyrimidine single strand DNA- binding protein. *Molecular Endocrinology*, **11**: 3-15.
- CHILDE, V.G., 1942. What happened in history. Penguin Books, Harmonds Worth. Torino, Itália.
- CHUNG, M.Y., RANUM, L.P., DUVICK, L.A., SERVADIO, A., ZOGHBI, H.Y. e ORR, H.T., 1993. Evidence for a mechanism, predisposing to intergenerational CAG repeat instability in spinocerebellar ataxia type I. *Nature Genetics*, **5**: 254-258.
- CIAMPOLINI, R., MOAZAMI-GOUDARZI, K., VAIMAN, D, DILLMANN, C., MAZZANATI, E., FOULLEY, J.L., LEVEZIEL, H. e CIANCI, D., 1995. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal of Animal Science*, **73**: 3259-32568.

- CLARK, J.M., 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalysed by prokaryotic and eukaryotic DNA polymerises. *Nucleic Acids Res*, **16**: 9677-9686.
- CLUTTON-BROCK, J., 1981. Domestic animals from early times. London e Kingsville, Tx: British Museum (Natural History) e Texas A&M University Press, Texas, EUA.
- CYMBRON, T., LOFTUS, R.T., MALBEIRO, M.I. e BRADLEY, D.G., 1999. Mitochondrial sequence variation suggests an african influence in Portuguese cattle. *Proc Soc Lond Ser*, **B 266**: 597-603.
- CORBET, G.B, 1978. The mammals of the palaeartic region: a taxonomic review. British Museum of Natural History, Londres, Reino Unido, 314 pp..
- CORBET, G.B. e HILL, J.E., 1990. A World list of Mammalian Species. British Museum (Natural History), Londres, Reino Unido.
- COCKETT, N.E., JACKSON, S.P., SHAY, T.L., NIELSEN, N., MOORE, S.S., STEELE, M.R., BARENDSE, W., GREEN, R.D. e GEORGES, M., 1994. Chromosomal localization of the callipygian gene in sheep (*Ovis aries*), using bovine DNA markers. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 3019-3023.
- COMPTON'S ENCYCLOPEDIA on line. Animals Domesticated.[http://www.optonline.com/comptons/ceo/00207\\_Ahtml.1-4pp](http://www.optonline.com/comptons/ceo/00207_Ahtml.1-4pp).
- COSTA JÚNIOR, J.J., 1939. Os gados riqueza nacional. Biblioteca Cosmos, 7ª Secção, Lisboa, Portugal, **17**: 95-97.
- COUTURIER, MA.J., 1962. Lê Bouquetin dès Alpes, Allier, Grenoble, França.
- CRAWFORD, A.M., DODDS, K.G., PIERSON, A.J.E.D.E., MONTEGOMERY, G.W., GARMONSWAY, H.G., BEATTIE, A.E., DAVIES, K., MADDOX, J.F., KAPPES, S.W., STONE, R.T., NGUYEN, T.C., PENTY, J.M., LORD, E., BROOM, J.E., BUITKAMP, J., SCHWAIGER, W., EPPLEN, J.T., MATTHEW, P., MATTHEWS, M.E., HULME, D.J., BEH, K.J., MCGRAW, R.A. e BEATTIE, C.W., 1995. An autosomal genetic linkage map of the sheep genome. *Genetics*, **140**: 703-724.

- CRAWFORD, R.D., 1990. Poultry genetic resources: Evolution diversity and conservation. *In: Poultry breeding and genetics*. R.D. CRAWFORD (Ed.). Elsevier, Amesterdão, Holanda, 43-60 pp..
- CRÉGUT-BONNOURE, E., 1992. Les Caprinae (Mammalia, Bovidae) du pléistocène d'Europe: intérêt biostratigraphique, paléoécologique et archéozoologique. *Mém Soc Géol*, **160**: 85-95.
- CREPALDI, P., NEGRINI, R., MILANESI, E., GORNI, C., CICOGNA, M. e AJMONE-MARSAN, P., 2001. Diversity in five goat populations of Lombardy Alps: comparison of estimates obtained from morphometric traits and molecular markers. *J Anim Breed Genet*, **118**: 173-180
- CULLIS, C.A., 2002. The use of DNA polymorphisms in genetic mapping. *Genet Eng*, **24**: 89-179.
- CURTAIN, C.C., 1971. On the origin of domesticated sheep. *Antiquity*, **45**: 303-304.
- CZKANOWSKI, J., 1909. Zur Differentialdiagnose der Neandertalgruppe. *Korrespondenzblatt Deutsch. Ges. Anthropol. Ethnol. Urgesch.* **40**: 44-47.
- DEAN, M. e MILLIGAN, B.G., 1998. Detection of genetic variation by DNA conformational and denaturing gradient methods. *In: Molecular Genetic Analysis of Populations*. A.R. HOELZEL (Ed). The Practical Approach Series, Oxford Univessity Press, Oxford, Reino Unido, 445 pp..
- DEKA, R., JIN, L., SHRIVER, M.D., YU, L.M. e DECROO, S., 1995. Population genetics of dinucleotide (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms in world populations. *Am J Hum Genet*, **56**: 461-474.
- DEMEKE, T. e ADAMS, R.P., 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant Taxonomy and evolution *In: PCR techonology currente innovations*. H.G. GRIFFIN e A.M. GRIFFIN (Eds). CRS Press, Londres, Reino Unido, 365 pp..
- DIAMOND, J., 2002. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature*, **418**: 700-7007.
- DIEZ-TÁSCON, M.C., 1998. QTLs implicados en la producción láctea ovina: estudio del cromosoma 6 mediante marcadores de tipo microsatélite. Tese de doutoramento, Universidade de León, Leão, Espanha.

- DIRECÇÃO GERAL DA PECUÁRIA, 1987. Recursos genéticos. Raças autóctones espécies ovina e caprina. Direcção Geral da Pecuária, Lisboa, Portugal, 207 pp..
- DIRECÇÃO GERAL DO DESENVOLVIMENTO RURAL, 2000. Apresentação e análise de dados de produção, preços e comercialização. ([http://www.idrha.min-agricultura.pt/produtos\\_tradicionais/estatisticas\\_2000/estatisticas.htm](http://www.idrha.min-agricultura.pt/produtos_tradicionais/estatisticas_2000/estatisticas.htm))
- DODGSON, J.B., CHENG, H.H. e OKIMOTO, R., 1997. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poult Sci*, **76** (8): 1108-1114.
- KONDO, Y.; MORI, M., KURAMOTO, T., YAMADA, J., BECKMANN, J.S., SIMON-CHAZOTTES, D., MONTAGUTELLI, X., GUENET, J.L. e SERIKAWA, T., 1993. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mamm Genome*, **4** (10): 571-576.
- ECK, R.V. e DAYHOFF, M.O., 1966. Atlas of Protein Sequence and Structure. Silver Springs, Md. *Natl. Biomed. Res. Found.*, EUA.
- ECA, (European Commission on Agriculture) 1999. Animal genetic resources in Europe. Item 9 of the Provisional Agenda. FAO. Roma, Itália, 65 pp..
- EDWARDS, A.W.F. e CAVALLI-SFORZA, L.L., 1963. The reconstruction of evolution. *Heredity*, **18**: 553.
- EMIGH, T.H. e KEMPTHORNE, O., 1975. A note on goodness-of-fit of population to Hardy-Weinberg structure. *Am J Hum Genet*, **27**: 778-783.
- ENCICLOPÉDIA EINAUDI, 1989. Homo-domesticação. Imprensa Nacional Casa da Moeda, Lisboa. Portugal, 368 pp..
- EPSTEIN, h., 1971. the Origin of the domestic animals of Africa. Africana publishing Corporation. Nova Iorque, EUA.
- ESTOUP, A., GARNEY, L., SOLIGNAC, M. e CORNUET, J.-M., 1995. Microsatellite variation in honey bee (*Apis Mellifera* L.) populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. *Genetics*, **140**: 679-695.
- FAO, 1995. The global strategy for the management of farm animal genetic resources. [www.fao.org](http://www.fao.org). Dad-is.

- FAO, 1998. Biodiversity for food and agriculture: farm animal genetic resources. Disponível em 23/6/00, em < URL <http://www.fao.org/sd/epidirect/epr0042.htm>
- FAO, 1999. The global strategy for the managements of farm animal genetic resources. Roma, Itália, 43 pp..
- FEINBERG, A. e VOGELSTEIN, B., 1983. A technique for radiolabeling DNA restrictions endonucleases fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, **132**: 6-13.
- FELDMAN, M.W., BERGMAN, A., POLLOOK, D.D. e GOLDSTEIN, D.B., 1996. Microsatellite genetic distances with rang constraints analytic description of problems of estimation. *Genetics*, **145** (1): 207-216.
- FELSENSTEIN, J., 1978. Cases in with parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Syst. Zool.*, **17**: 368-376.
- FELSENSTEIN, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol*, **17**: 368-376.
- FELSENSTEIN, J., 1988. Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann Rev Genet*, **22**: 521-565.
- FELSENSTEIN, J., 1993. Phylip: phylogenetic inference package. University of Washington Press, Seattle, EUA.
- FICH, W.M. e MARGOLIASH, E., 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*, **155**: 279-287.
- FITCH, W.M., 1971. Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool*, **20**: 406-416.
- FITCH, W.M., 1977. On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Amer Natur*, **3**: 223-257.
- FONSECA, P.D., 1984. Contributo para a avaliação de raças caprinas portuguesas nos seus sistemas de produção, EZN, Vale de Santarém, Portugal.
- FONSECA, P.D., 1989. Levantamento da caprinicultura em Portugal. *In*: Jornadas de Caprinicultura. XXI Reunião SPO, Castelo Branco, Portugal.

- FORBES, S.H., HOGG, J.T., BUCHANAN, F.C., CRAWFORD, A.M. e ALLENFORD, F.W., 1995. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and Bighorn sheep. *Mol Biol Evol*, **12**: 1106-1113.
- FRANKLIN, I.R., 1977. Systematics and phylogeny of sheep *in* the genetics of sheep. L. Piper e A. Ruvinsky. CAB Internacional. Londres, Reino Unido, 1-20 pp..
- FRAZÃO, T.L., 1981. Caprinos no Alentejo. I Jornadas Nacionais de Caprinicultura. Santarém, Portugal.
- GAHNE, B., JUNEJA, R.K. e GROLMUS, J., 1977. Horizontal polyacrylamide gradient gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin and post-transferrin albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. *Anim Blood Groups Biochem Genet*, **8**: 127-137.
- GAMA, L.T., 2002. Melhoramento genético animal. Escolar Editora, Lisboa, Portugal, 306 pp..
- GARCIA, E., CUENCA, R., PASTOR, J., GÓMEZ, M. e JORDANA, J., 2001. Caracterización hematológica, bioquímica y morfológica de cinco razas asnales españolas en peligro de extinción. *In*: IX Jornadas sobre producción Animal. *ITEA*, **22** (I): 109-111.
- GARCIA-PEREA, R. E GISBERT, J., 1997. Lista patrón de los mamíferos de la Península Ibérica, islas Baleares y Canarias. *Galemys*, **9** (Nº especial): 1-38.
- GARZA, J.C., SLATKIN, M. e FREIMER, N.B., 1995. Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees, with implications for constraints on allele size. *Mol Biol Evol*, **12**: 594-603.
- GASTIER, J.M., PULIDO, J.C., SUNDEN, S., BRODY, T., BUETOW, K.H., MURRAY, J.C., 1995. Survey of trinucleotide repeats in the human genome: assessment of their utility as genetic markers. *Hum Mol Genets*, **4**: 1829-1836.
- GEORGES, M., 1991. Perspectives for marker-assisted selection and velogenetics in animal breeding. *In*: Animal applications of research in mammalian development. Laboratory Press, Nova Iorque, EUA, 285-325.
- GEORGES, M., NIELSON, D., MACKINNON, M., MISHRA, A., OKIMOTO, R., PASQUINO, A.T., SARGERANT, L.S., SORENSEN, A., STEELE, M.R.,

- ZHAO, X., WOMACK, Y.E. e HOESCHELE, I., 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*, **139**: 907-920.
- GEORGES, M., GILMOUR, D.S., THOMAS, G.H. e ELAIN, S.C.R., 1989. Drosophila nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science*, **245**: 1487-1490.
- GILMOUR, D.S., THOMAS, G.H. e ELGIN, S.C.R., 1989. drosophila nuclear proteins bind regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science*, **245**: 1487-1490.
- GOLDSTEIN, D.B. e POLLOCK D.D, 1994. Least-squares estimation of molecular distance- noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theor Popu Biol*, **45**: 219-226.
- GOLDSTEIN, D.B. e POLLOCK, D.D., 1997. Launching microsattelites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, **88**: 335-342.
- GOLDSTEIN, D.B., RUIZ-LINARES, A., CAVALLI-SFORZA, L.L. e FELDAMAN, M.W., 1995a. Genetic absolute dating based on microssatélites and the origin of modern humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 6723-6727.
- GOLDSTEIN, D.B., RUIZ-LINARES, A., CAVALLI-SFORZA, L.L. e FELDAMAN, M.W., 1995b. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, **136**: 463-471.
- GOLDSTEIN, D.B. e SCHLÖTTER, C., 1999. Microsatellites evolution and applications. Oxford Press University, Oxford, Reino Unido, 330 pp..
- GORDON, L., LUDOVIC, GIELLY, L., EXCOFFIER, L., VIGNE, J.D., BOUVET, J. e TABERLET, P., 2001. Multiple maternal origins and Weak phylogeographic structure in domestic goats. *PNAS*, **98**: 5927-5932.
- GRAY, A.P., 1972. Mammalian Hybrids. A check-list with bibliography. Commonwealth Agriculture Bureaux. Farnham Royal, Bucks, Reino Unido.
- GREEN, P., FALLS, K. e CROOKS, S., 1998. Documentation for CRIMAP. University School of Medicine, Versão.2.4, St. Louis, EUA.

- GROBET, L. e HANSET, R., 1993. Identification et diagnostics de filiation par empreintes génétiques chez les animaux domestiques. *Ann Méd Vét*, **137**: 123-132.
- GROUSCLAUDE, F., AUPETIT, R.Y., LEFEBVRE, J. e MERIAUX, C., 1990. Essai d'analyse des relations génétiques entre les races bovines françaises a laide du polymorphisme biochimique. *Genet Sel Evol*, **22**: 317-338.
- GROSCLAUDE, F., MAHÉ, M.F., BRIGNON, G., DISTASIO, L. e JEUNET, R., 1987. A Mendellian polymorphism underlying quantitative variations of goat alpha S<sub>1</sub> casein. *Genet Cel Evol*, **19**: 399-412.
- GROSSE, W.M., KAPPES, S.M. e MCGRAW, R.A., 2000. Linkage mapping and comparative analysis of bovine expressed sequence tags (ESTs). *Animal Genetics*, **31**: 171-177.
- GROSS, D.S. e GARRD, W.T., 1980. The ubiquitous potencial Z-forming sequence of eukaryots (dT-dG)<sub>n</sub> (dA-dC)<sub>n</sub> is not detectable in the genomes of eubactéria, archaebacteria or mitochondria. *Mol Cell Biol*, **6**: 3010-3013.
- GUO, S.W. e THOMPSON, E.A., 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, **48**: 361-372.
- HAIG, S.M., 1998. Molecular contributions to conservation. *Molecular Techniques in Ecology*, **72** (2): 413-425.
- HALDANE, J.B.S., 1954. An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics*, **52**: 631-635.
- HALL, S.J.G. e RUANE, J., 1993. Livestock breeds and their conservation: a global overview. *Conservation Biology*, **7** (4): 823.
- HAMADA, H., PETRINO, M.G. e KAKUNAGA, T., 1982. A novel repeated element with Z-DNA-forming potential widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **79**: 6465-6469.
- HAMMOND, 1998. Identification and characterization of domestic animal diversity. FAO, Roma, Itália. Disponível em 23/06/00, em < URL <http://www.fao.org/docrep/t1300t/t1300T01.htm>

- HANCOCK, J.M., 1996. Microsatellites and other simple sequences in the evolution of the human genome. *In: Human genome evolution*. M.S. JACKSON, G. DOVER e T.S. STRACHAN (Eds). Bios, Oxford, Reino Unido, 191-210.
- HANSLIK, S., HARR, B., BREM, G. e SCHLOTERRER, C., 2000. Microsatellite analysis reveals substantial genetic differentiation between contemporary new world and old world Holstein Friesian populations. *Anim Genet*, **31**: 31-38.
- HARRIS, D.R., 1962. The distribution and ancestry of the domestic goat. *J Linn Soc Lond*, **173**: 79-91.
- HART, G.B., BURGER, H., WILLING, R. e SUCHENTRUNK, F., 1990. On the biochemical systematics of the Caprini e Rupicaprini. *Biochemical Systematics and Ecology*, **18**: 175-182.
- HASEGAWA, M. e HASHIMOTO, T., 1993. Ribosomal RNA tree misleading. *Nature*, 361-363.
- HAUGE, X.Y. e LITT, M., 1993. A study of the origin of shadow bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. *Hum Mol Genet*, **2**: 411-415.
- HECK, H., WURSTER, D. e BENIRSCHKE, K., 1968. Chromosome study of members of the subfamilies, Caprinae, Bovinae, family Bovidae: the musk ox, ibex, aroud, Congo buffalo and gaur. *Z Saugetierk*, **33**: 172-179.
- HELLMAN, M.B., 1965. Ovinotecnia I. Razas, producción, comercio y industria. Edições El Ateneo, Buenos Aires, Argentina.
- HEMMER, H., 1990. Domestication. The declive of environmental appreciation. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 208 pp..
- HENDY, M.D.e PENNY, D. 1989. A framework for the quantitative study of evolutionary trees. *Syst. Zool.*, **38**: 297-309.
- HERNÁNDEZ, JL. e WEIR, B.S., 1989. A disequilibrium coefficient approach to Hardy-Weinberg testing. *Biometrics*, **45**: 53-70
- HODGES, J., 1990. Conservation of animal genetic in developing countries. *In: Conservation of Domestic Livestock*. C.A.B. interaction on behalf of the rare

breeds survival trust, Animal Breeding and Genetic Resources, FAO, Roma, Itália.

HOLZEL, A.R., 1998. Molecular Genetic Analysis of Population, a practical Approach series. B.D. HAMES (Ed). 2º Edição, IRL Press, Oxford, Reino Unido.

HOTTELING, H., 1993. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J Ed Psych*, **24**: 417-520.

HUNTER, R.L. e MARKET, C.L., 1957. Histochemical demonstration of isozymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 124: 1294.

INSTITUTO NACIONAL de ESTATÍSTICA (INE), 2000. Estatísticas Agrícolas 2000 (<http://www.ine.pt>).

ISCNDA, 1989. International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. D. DI BERARDINO, H. HAYES, R. FRIES e S. LONG (Eds). *Cytogenet CellGenet*. **53**: 65-79.

JORDANA, F, FOLCH, P. e CUENCA, R., 1998. Clinical biochemical parameters of the endangered catalanian donkey breed: normal values and the influence of sex, age, and management practices effect. *Res Vet Sci*: **64** (1): 7-10.

JEFFREYS, A., WILSON, N.J. e THEIN, S.L., 1985. Hypervariable minisatellites regions in human DNA. *Nature*, **314**: 67-73.

JOPE, E.M., 1976. The evolution of plants and animals under domestication: the contribution of studies at the molecular level. *Phil Trans R Soc*, **275**: 99-109.

KASHI, Y., KING, D. e SOLLER, M., 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Tends in Genetics*, **13**: 74-78.

KEMP, S.J., HISHIDA, O., WAMBUGU, J., RINK, A., LONGERI, M.L., MA, R.Z., DA, Y., LEWIN, H.A., BARENDSE, W. e TEALE, A.J., 1995. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. *Anim Genet*, **26**: 299-306.

KIDD, K.K., 1969. Phylogenetics analysis of cattle breeds. Tese de doutoramento, Universidade de Wisconsin, Wisconsin, EUA.

- KIMURA, M. e CROW, J.F., 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**: 725-738.
- KING, D.G., SOLLER, M e KASHI, Y., 1997. Evolutionary tuning knobs. *Endeavour*, **21**: 36-40.
- KINGHORN, B., VAN ARENDONK, J. e HETZEL, J., 1994. Detection and use of major genes in animal breeding. *Agbiotech News and Information*, **6**: 297N-302N.
- KONDO, Y., MORI, M., KURAMOTO, T., YAMADA, J., BECKMANN, J.S., SIMON-CHAZOTTES, D., MONTAGUTELLI, X., GUENET, J.L. e SERIKAWA, T., 1993. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. *Mamm Genome*, **4** (10): 571-576.
- KOOREY, D.J., BISHOP, G.A. e MCCAUGHAN, G.W., 1993. Allele non-amplification: a source of confusion in linkage studies employing microsatellite polymorphisms. *Hum Mol Genet*, **2**: 289-291.
- KUHNER, M.K. e FELSENSTEIN, J., 1994. A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Mol Biol Evol*, **11**: 459-468.
- KUMAR, S., 1996. A stepwise algorithm for finding minimum evolution trees. *Mol Biol Evol*, **13**: 584-593.
- KUMAR, S., TAMURA, K. e NEI, M., 1993. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis. University Park, Pensilvânia, EUA.
- LANDER, E.S., 1991. Research on DNA typing catching up with courtroom application. *Am J Genet*, **48**: 819-823.
- LANDER, E.S. e SCHORK, N.J., 1994. Genetic dissection of complex traits. *Science*, **265**: 2037-2048.
- L'ELEVAGE FRANÇAIS, 2000. Bulletin de l'élevage français. Numéro spécial. 82 races bovines, ovines, caprines et porcines. Sopexa, Paris, França.
- LEVENE, H., 1949. On matching problem arising in genetics. *Annals of Mathematical Statistics*, **20**: 91-94.
- Li, C.C., 1955. Population genetics. University of Chicago Press, Chicago, EUA, 366 pp..

- Li, M., ZHAO, S., BIAN, C., WANG, H., WEI, H., LUI, B., YU, M., FAN, B., CHEN, S., ZHU, M., LI, S., XIONG, T. e Li, K., 2002. Genetic relationships among twelve Chinese indigenous goat populations based on microsatellite analysis. *Genet Sel Evol*, **34**: 729-744.
- Li, W.-H, 1977. Maintenance of genetic variability under mutation and selection pressures in a finite population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2509-2513.
- LITT, M., HAUGE, X. e SHARMA, V., 1993. Shadow bands seen when typing polymorphic dinucleotide repeats: some causes and cures. *Biotechniques*, **15**: 244-280.
- LOOFT, C.H.R., BASEDOW, M., BARENDSE, B., SCHONDELMAIER, J. e KALM, E., 1998. Genetic mapping of AFLP markers in bovine genome. *In: Proceedings of XXXVI<sup>th</sup> International Conference on Animal Genetics*, Auckland, Nova Zelândia, 92 pp..
- LUIKART, G., BIJU-DUVAL, M-P., ENTUGRUL, O., ZAGDSUREN, Y., MAUDET, C. e TABERLET, P., 1999. Power of 22 microsatellite markers in fluorescent multiplexes for parentage testing in goats (*Capra hircus*). *Animal Genetics*, **30**: 431-438.
- LUIKART, G., GIELLY, L., EXCOFFIER, L., VIGNE, J.-D., BOUVET, J. e TABERLET, P., 2001. Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Population Biology*, **98**: 5927-5932.
- LUSH, J.L., 1945. Animal breeding plans. 3<sup>a</sup> Edição, Iowa State University Press, Ames, EUA, 443 pp..
- MACKENZIE, D., 1967. Goat husbandry. 2<sup>a</sup> Edição, Faber and Faber, 368 pp..
- MACHUGH, D.E., 1996. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Tese de doutoramento, Universidade de Dublin, Dublin, Irlanda.
- MACHUGH, D.F. e BRADLEY, D.G., 2001. Livestock genetic origins: goats buck the trend. *PNAS*, **98**: 5385-5384.
- MACHUGH, D.E., SHRIVER, M.D., LOFTUS, R.T., CUNNINGHAM, P. e BRADLEY, D.G., 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution domestication and

phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*, **146**: 1071-1086.

MADDOX, J.F., DAVIS, K.P., CRAWFORD, A.M., HULME, D.J., VAIMAN, D., CRIBIU, E.P., FREKING, B.A., BEH, K.J., COCKETT, N.E., KANG, N., RIFFKIN, C.D., DRINKWATER, R., MOORE, S.S., DODDS, K.G.; LUMSDEN, J.M., VAN STIJN, T.C., PHUA, S.H., ADELSON, D.L., BURKIN, H.R., BROOM, J.E., BUITKAMP, J., CAMBRIDGE, L., CUSHWA, W.T., GERARD, E., GALLOWAY, S.M., HARRISON, B., HAWKEN, R.J., HIENDLEDER, S., HENRY, H.M., MEDRANO, J.F., PATERSON, K.A., SCHIBLER, L., STONE, R.T. e VAN HEST, B., 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.*, **7**: 1275-1289.

MAGRO, S. B., 1959. Caprinos Portugueses *cit* ALMENDRA, L., 1996. A cabra Serrana Transmontana: origem, caracterização da raça e sistema de produção. Direcção Regional de Agricultura de Trás-os Montes. Mirandela, Portugal 27 pp..

MAHALANOBIS, P.C., 1963. Primary structure and evolution of cytochrome C. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, **50**: 672-679.

MAIJALA, K.A.V., 1997. Genetic Aspects of domestication *In*: The genetics of sheep. L. PIPER e A. RUVINSKY (Eds). CAB Internacional, Londres, Reino Unido, 14-49 pp..

MAIJALA, K.A.V., CHEREKAEV, J., DEVILLARD, M., REKLEWSKI, Z., ROGNOMI, G., SINON, D.L. e STEANE, D.E., 1984. Conservation of animal genetic resources in Europe. EAAP, *Livestock Prod Sci*, **11**: 3-22.

MALLO, F.F., 1985. Analisis de componentes principales y tecnicas factoriales relacionadas. Gráficas Celarayn, S.A. Universidade de León. Leão, Espanha, 523 pp..

MANCEAU, V., DESPRÉS, L., BOUVET, J. e TABERLET, P., 1999. Systematics of the Genus *Capra* inferred from mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**: 504-510.

MANWELL, C. e BAKEN, C.M.A., 1977. *Ammotragus lervia*, Barbary sheep or Barbary goat? *Comp Biochem Physiol*, **58** (B): 267-271.

- MARK, K., 1867. Das kapital. Livro I. Meissner, Hamburgo, Trad Port Delfos, Lisboa, Portugal, 1975 pp..
- MASATOSHI, N., 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics, *Ann Rev Genet*, 371-403.
- MASON, I.L., 1984. Goat *in* Evolution of domesticated animals, Longman, Nova Iorque, EUA, 452 pp..
- MATOS, C.P., 2000. Diagnóstico da situação actual da produção de pequenos ruminantes em Portugal. *In*: X Congresso de Zootecnia. Vale de Santarém, Portugal.
- MATOS, C.P. e POTES, J.M., 2003. Sistemas de Producción Ovina y Caprina en Portugal. *XXVIII Jornadas científicas y VII Internacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, Badajoz, Espanha, 8 pp..
- MAY, R.M., 1990. Taxonomy as destiny. *Nature*, **347**: 129-130.
- METROPOLIS, N., ROSENBLUTH, A.W., ROSENBLUTH, M.N., TELLER, A.H. e TELLER, E., 1953. Equations of state calculations by fast computing machines. *Journal of Chemical Physics*, **21**: 1087-1092.
- MILLAN, D., RIQUET, J., YERLE, M., GOUREAU, A., SCHMITZ, A., CRIBIU, E.P. e GELLIIN, J., 1996. Homologous and heterologous FISH painting with PARM-PCR chromosome-specific probes in mammals. *Mammalian Genome*, **7**: 194-199.
- MINISTÉRIO DAS OBRAS PÚBLICAS. COMÉRCIO E INDÚSTRIA, 1873. Recenseamento geral dos gados, no continente do reino de Portugal, em 1870. Imprensa Nacional, Lisboa, Portugal, 102-107 pp..
- MIRANDA do VALE, J., 1949. Gado bissulco. Livraria Sá da Costa, 4ª Secção-2, Lisboa, Portugal, 418 pp..
- MOAZAMI-GOUDARZI, K. e LALOE, D., 2002. Is a multivariate consensus representation of genetic relationships among populations always meaningful? *Genetics*, **162**: 473-484.
- MOORE, H.D.M. e HOLT, W.V., 1990. Biotechnology and conservation of genetic diversity. *In*: Proceeding of a Symposium held at the Zoological Society of

London. The Zoological Society of London, Clarendon Press, Oxford, Reino Unido, 1240.

MURPHY, k.E. e STRINGER, J.R., 1986. RecA independent recombination of poly (d (GT)-d (CA)) in pBr322. *Nucleic Acids Res*, **14**: 7325-7340.

NALDER, C.F. e LAY, D.M., 1975. Chromosomes of some Asian wild sheep (*Ovis*) and goats (*Capra*). *Chrom Inform Ser*, **18**: 28-31.

NAUTA, M.J. e WEISSING, F., 1996. Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*, **143**: 1021-1032.

NEI, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, Nova Iorque, 511 pp..

NEI, M., 1996. Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annu Rev Genet*, **30**: 371-403.

NEI, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, **106**: 283-292.

NEI, M., 1973. The theory and estimation of genetic distance. In: genetic Structure of populations. N.E. MORTON (Eds). University of Hawai Press, Honolulu, EUA, 45-54.

NEI, M., 1991. Relative efficiencies of different tree-making methods for molecular data. In: Phylogenetic analysis of DNA sequences. M.M. MIYAMOTO e J.L. CRAFT (Eds). Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 90-128.

NEI, M. e KUMAR, S., 2000. Molecular evolution and philogenetic. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 333 pp..

NEI, M. e ROYCHOUDHURY, A.K., 1974. Sampling variance of heterozigosity and genetic distance. *Genetics*, **76**: 379-390.

NEI, M., TAJIMA, F. e TAETENO, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. *J Mol Evol*, **19**: 153-170.

NEI, M. e TAKEZAKI, N., 1994. Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis. In: 5<sup>th</sup> World Cong Genet Appl Livestock Prod, **21**: 405-4012.

- NEWTON, C.R., 1997. Introduction to biotechniques PCR. 2<sup>a</sup> Edição, Bios Scientific Publishers Ltd., Oxford, Reino Unido, 192 pp..
- NEWTON, C.R. e GRAHAM, A., 1997. PCR. 2<sup>a</sup> Edição. BIOS Scientific Publishers Ltd. Oxford, Reino Unido, 192 pp..
- NOWAK, R.M., 1991. Walken's Mammals of the world. 5<sup>a</sup> Edição, John Hopkins Press, Baltimore, EUA, 1629 pp..
- NESSE, L.L., 1990. Erythrocyte antigens in Norwegian goats: serological and genetic studies. *Anim Genet*, **21**: 303.
- NGUYEN, T.C. e BUNCH, T.D., 1980. Blood groups and evolutionary relationships among domestic sheep (*Ovis aires*), domestic goat (*Capra hircus*), aroudad (*Ammotragus lervia*) and European mouflon (*Ovis musimon*). *Ann Génét Sél Anim*, **12**: 169-180.
- NOTTER, D.R., 1999. The importance of genetic diversity in livestock populations. *J Anim Sci*, **77**: 61-69.
- NRC, 1993. Managing global genetic resources: livestock. National Academy Press, Washington DC, EUA, 259 pp...
- OHTA, T. e KIMURA, M., 1973. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genet Res Camb*, **22**: 201-204.
- OLDROYD, N.J., URQUHART, A.J., KIMPTON, C.P., MILLICAN, E.S., WATSON, S.K., DOWNES, T. e GILL, P.D., 1995. A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. *Electrophoresis*, **16**: 334-337.
- OLSEN, G.J., MATSUDA, H., HAGSTROM, R. e OVERBEEK, R., 1994. Fast DNAm: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood. *Comput Appl Biosci*, **10**: 41-48.
- ORDAS, J.G. e SAN-PRIMITIVO, F., 1986. Genetic variations in blood proteins within and between Spanish dairy sheep breeds. *Anim Genet*, **17**: 255-266.

- ORTIGOSA, F.L., 1926. Carneiros, cabras e cães de guarda. Livraria do Lavrador, Oficinas do comércio do Porto, Porto, Portugal, XXXIX, 255-276.
- PASCALI, L., DOBOSZ, M. e ALOJA, E., 1994. PCR in forensic science. *In: PCR technology current innovations*. H.G. GRIFFIN e A.M. GRIFFIN (Eds), CRS Press, Londres, Reino Unido, 289-306.
- PATERSON, A.H., TANKSLEY, S.D. e SORRELLS, M.E., 1991. DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*, **46**: 39-90.
- PATTERSON, S.D. e BELL, K., 1989. Applications of an affinity-electrophoretic and in situ oxidation method to study the equine protease inhibitory proteins. *Electrophoresis*, **10**: 40-45.
- PEARSON, K., 1926. On the coefficient of racial likeness. *Biometrika*, **18**: 337-343.
- PEARSON, K., 1991. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos Mag Ser*, **2** (6): 559-572.
- PEMBERTON, J.M., SLATE, J., BANCROFT, D.R. e BARRET, J., 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. *Molecular Ecology*, **4**: 249-252.
- PEPIN, L., AMIGUES, Y., LEINGLE, A., BERTHIER, J.L. e BENSALD, A. e VAIMAN, D. 1995. Sequence conservation of microsatellites between cattle (*Bos taurus*) and goat (*Capra hircus*), and related species. Examples use in parentage testing e phylogeny analysis. *Heredity*, **74**: 53-61.
- PÉREZ-LEZAUN, A., CALAFELL, F., MATEU, E., COMAS D., RUIZ-PACHECO, R. e BERTRABDETIT, J., 1997. Microsatellite variation and differentiation of modern humans. *Hum Genet*, **99**: 1-7.
- PIPER, L. e RUVINSKY, 1997. Systematic and phylogeny of the sheep. *In: The genetics of sheep*. I.R. FRANKLIN (Ed). CAB International, Londres, Reino Unido, 611 pp..
- PHARMACIA BIOTECH, 1996. AlleleLinks™ Version 1.00, User Manual. Edition AA, Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia, 122 pp..

- POLLOCK, D.D. e GOLDSTEIN, D.B., 1995. A comparison of two methods for constructing evolutionary distances from a weighted contribution of transition and trans version. *Mol Biol Evol*, **12**: 713-717.
- POLLOCK, D.D., BERGMAN, A., FELDMAN, M.W. e GOLDSTEIN, D.B., 1998. Microsatellite behavior with range constraints: parameter estimation and improved distances for use in phylogenetic reconstruction. *Theo Popul Biol*, **53** (3): 256-271.
- PORTUGAL, A.V., 2001. Sistemas de producción de alimentos de origen animal en el futuro. *Arch Zootec*, **50**: 213-229.
- QUAFI, A.T., BABILLIOT, J.-M., LEROUX, C. e MARTIN, P., 2002. Genetic diversity of two main Moroccan goat breeds: phylogenetic relationships with four breeds reared in France. *Small Ruminant Research*, **45**: 225-233.
- RANDI, E., FUSCO, G., LORENZINI, R., TOSO, S. e TOSI, G., 1991. Alloenzyme divergence and phylogenetic relationships among *Capra*, *Ovis* and *Rupricapra* (Artiodactyla, Bovidae). *Heredity*, **67**: 281-286.
- RAO, C.R., 1948. The utilization of multiple measurements in problems of biological classifications. *J Roy Stat Soc Bio*, **2**: 159-203.
- RAYMOND, M. e ROUSSET, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J Heredity*, **86**: 248-249.
- REED, C.A., 1969. The pattern of animal domesticated in prehistory Near East. *In*: Domestication and exploitation of plants and animals. P.J. UCKO e G.W. DIMBLEY (Eds). Duckworth, Londres, Reino Unido, 80-361.
- REED, C.A., 1984. The beginning of animal domestication. *In*: Evolution of domesticated animals. I. IAN (Ed). Mason Longman, FAO, Roma, Itália, 1-27.
- REICHERT, W., 1982. Agriculture's diminishing diversity, Increasing yields and vulnerability. *Environment*, **24** (9): 1-45.
- RICHARDS, R.I., HOLMAN, K., YU, S. e SUTHERLAND, G.R., 1993. Fragile X syndrome unstable element, p (CCG)<sub>n</sub> and other simple tandem repeat sequences are binding sites for specific nuclear proteins. *Hum Mol Genets*, **2**: 1429-1435.

- RIQUET, J., COPPIETERS, W., CAMBISANO, N., ARRANZ, J.J., BERZI, P., DAVIS, S.K., GRISART, B., FAMIR, F., KARIM, L, MNI, M., SIMON, P., TAYLOR, J.F., VANMANSHOVEN, P., WAGENAAR, D., WOMACH, J.E. e GEORGES, M., 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbreed populations: application to milk production in dairy cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**: 9252-9257.
- ROCHA, J.L. e BARATA, G.N., 1977. Marcadores Moleculares ao nível da cadeia de ADN: suas implicações no melhoramento animal I-Tipos de Marcadores moleculares. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. **92** (522): 82-91.
- RODERO, E. e HERRERA, M., 1998. El concepto de raza un enfoque epistemológico. *Arch Zootec*, **49**: 5-16.
- RODRIGUEZ, S., VISEDO, G. e ZAPATA, C., 2001. Detection of errors in dinucleotide repeat typing by nondenaturing electrophoresis. *Electrophoresis*, **22**: 2656-2664.
- ROGERS, J.S., 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. In: Studies in Genetics VIII. University of Texas publication 7213. University of Texas, Austin, Texas, USA.
- ROHRER, G.A., ALEXANDER, L.J., KEELE, J.W., SMITH, T.P. e BEATTIE, C.N., 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics*, **136**: 231-245.
- ROZEN, F.M.B., 1999. Búsqueda de regiones del cromosoma 9 ovino con influencia sobre la producción láctea. Tese de doutoramento, Universidade de León, Leão, Espanha.
- ROY, M.S., GEFFEN, E., SMITH, D., OSTRANDER, E.A. e WAYNE, RK, 1994. Patterns of differentiation and hybridisation in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol Biol Evol*, **11**: 553-570.
- RUTTAN, V.W., 1999. The transition to agricultural sustainability. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 5960-5967.
- RYDER, M.L., 1983. Sheep and man. Duckworth, Londres, Reino Unido, 846 pp..

- RYDER, M.L., 1984. Sheep. *In: Evolution of domestic animals*. I.L. MASON (Ed), Longman, Londres, Reino Unido, 63-85.
- RYSIECKI, G., CHILDS, W.P. e DUXBURY, N., 1977. Minisatellite analysis. *In: Laboratory methods for detection of mutations and polymorphisms in DNA*. G.R. TAYLOR (Ed). CRS Press Inc., Florida, EUA, 333 pp..
- RZHETSKY, A. e NEI, M., 1995. Tests of applicability of several substitution models for DNA sequence data. *Mol Biol Evol*, **12**: 51-131.
- RZHETSKY, A. e NEI, M., 1992. A simple method for estimating and testing minimum-evolution trees. *Mol Biol Evol*, **9**: 945-967.
- RZHETSKY, A. e NEI, M., 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Mol Biol Evol*, **10**: 1073-1095.
- RZHETSKY, A. e NEI, M., 1994. Metfree: a program package for inferring and testing minimum-evolution trees. *Comput Appl Biosci*, **10**: 409-412.
- SÁ, V., 1982. As cabras. Livraria popular francisco Franco, LDA. Lisboa, Portugal.
- SAIBEKOVA, N., GAILLARD, C., OBEXER-RUFF, G. e DOLF, G., 1999. Genetic diversity in Swiss goat breeds based on microsatellite analysis. *Animal Genetics*, **30**: 36-41.
- SAITOU, N. e NEI, M., 1986. The number of nucleotides required to determinate the branching order of three species, with special reference to the human-chimpanzee-gorilla divergence. *J Mol Evol*, **24**: 189-204.
- SAITOU, N. e NEI, M., 1987. The neighbour joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, **4**: 406-425.
- SAITOU, N. e IMANISHI, M., 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution e neighbour joining methods of phylogenetic reconstruction, in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol*, **6**: 514-525.
- SAMADI, S., ERAND, F., ESTOUP, A e JARNE, P., 1998. The influence of mutation selection and reproductive systems on microsatellite variability: a simulation approach. *Genetic Research*, **71**: 213-222.

- SAMBROOK, J., FRITSH, F.E. e MANIATIS, T., 1980. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press. Nova Iorque, EUA.
- SANGHVI, L.D., 1953. comparison genetical and morphological methods for a study of biological differences. *Amer. J. Phys Antropol.*, **11**: 405-416
- SAN PRIMITIVO, F., 1999. Estudos de variabilidade genética em razas autóctonas Espanholas. *In*: Congresso de Melhoramento Genético, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 65-81
- SAN PRIMITIVO, F., 2002. Criterios genéticos para la definición de poblaciones animales. *In*: V Congreso de SERGA y III Congreso de SPREGA, Madrid Espanha, 7 pp..
- SANCHEZ, A. e GUMERSINDO, 1944. *Zootecnia Especial*, Córdoba, Espanha.
- SAUER, C.O., 1969. *Seeds, spades, hearths and herds*. MIT Press, Cambridge, Reino Unido.
- SCANDALIOS, J.G., 1974. Isozymes in development and differentiation. *Annu Rev Plant Physiol*, **25**: 225.
- SCHALLER, G.B., 1977. *Mountain monarchs: wild sheep and goats of the Himalaya*, University of Chicago Press, Chicago, EUA, 476 pp..
- SCHERF, B.D., 1977. Lista mundial de vigilancia para la diversidad de los animales domésticos. 2ª Edição, FAO, Roma, Itália, 1997.
- SCHIBLER, L., VAIMAN, D., OUSTRY, A., GIRAUD-DELVILLE, C. e CRIBIU, P.E., 1998. Comparative gene matting: a fine-scale survey of chromosome rearrangements between ruminants and humans. *Genome*, **8** (9): 901-915.
- SCHILLHORN VAN VEEN, T.W., 1999. Agricultural policy and sustainable livestock development. *Int J Parasitol*, **29** (1): 7-15.
- SCHONIGER, M. e VON HAESLER, A., 1993. A simple method to improve the reliability of tree reconstructions. *Mol Biol Evol*, **10**: 471-483.
- SCHÖTTERER, C. e TAUZ, D., 1992. Slippage synthesis of simple DNA. *Nucl Acids Res*, **20**: 211-215.

- SCHÖTTERER, C. e WIEHE, T., 1999. Microsatellites, a neutral marker to infer selective seeps. *In: Microsatellites evolution and applications*. D.B. GOLDSTEIN e C.S. SCHÖTTERER (Eds). Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 238-247.
- SHACKLETON, D.M. e IUCN/SSC Caprinae Specialist Group, 1997. Wild sheep and goats and their relatives: status survey and conservation action plan for Caprinae, IUCN, Gland, Suíça.
- SHIBATA, D., 1999. Microsatellite analysis of human tumours. *In: Microsatellites evolution and applications*. D.B. GOLDSTEIN e C.S. SCHÖTTERER (Eds). Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 266-273.
- SHIQUAN W., FOOTE, W.C. e BUNCH, T.D., 1990. Transferrin and haemoglobin polymorphism in domesticated goats in USA. *Animal Genetics*, **21**: 91-94.
- SHRIVER, M.D., JIN, R., BOERWINKLE, E., DEKA, R., FERREL, R.E. e CHAKRABORTY, R., 1995. A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Mol Biol Evol*, **12**: 914-920.
- SLATKIN, M., 1995. A measure of population sub division based on microsatellites allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457-465.
- SMITH, C., 1984. Genetic aspects of conservation in farm livestock. *Livestock Prod Sci*, **11**: 37-48.
- SMITH, C.A.B., 1977. A note on genetic distances. *Ann Human Genet*, **21**: 254-276.
- SMITH, E.L. e CUYLER-YOUNG, T., 1972. The evolution of early agriculture and culture in Greater Mesopotamia: a trial model. *In: Population growth: antropological implications*. B.J. SPOONER (Ed). MIT Press, Cambridge, Reino Unido, 425 pp..
- SNEATH, P.H.A. e SOKAL, R.R., 1973. Numerical taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco, EUA, 573 pp..
- SKAL, R.R. e MICHENER, C.D., 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Sci. Bull.*, **28**: 1409-1438.
- SOOLER, M., 1994. Marker assisted selection - an overview. *Anim Biotech*, **5**: 193-207.

- SOUNDIS, J. e KRIMBAS, C., 1987. Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. *Mol Biol Evol*, **4**: 159-166.
- SOUTHERN, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**: 503-517.
- SPELMAN, R.J. e BOVENHUIS, 1997. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. *Animal Genetics*, **29**: 77-88
- SPELMAN, R.J., COPPIETERS, W., KARIN, L., VAN ANENDONK, J.A.M. e BOVENHUIS, H., 1996. Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on chromosome six in the Dutch Holstein Friesian populations. *Genetics*, **144**: 1799-1808.
- STALLING, R.L., 1994. Distribution of trinucleotide microsatellites in different categories of mammalian genomic sequence: implications for genetic diseases. *Genomics*, **21**: 116-121.
- STILLE, K.A. e MILLER, W.J., 1986. Immunogenetic relationships of erythrocytic antigens of goats and cattle. *Genetics*, **113**: 44.
- STATSOFT, Inc, 1997. STATISTICA for Windows (Computer program manual). Tulsa, EUA. <http://www.statsoft.com>
- STEPHAN, W., 1997. Tandemly repeated noncoding DNA sequences. *In*: Encyclopedia of molecular biology medicine. R.A. MEYERS (Ed). Vol. **6**, Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha, 1-10.
- STEPHENS, J.C., BIBERT, D.A., YUNKI, N. e O'BRIEN, S.J., 1992. Estimation of heterozygosity for single-probe multilocus DNA fingerprints. *Mol Biol Evol*, **9**: 729-743.
- STRACHAN, T. e READ, A.P., 1999. Genética molecular humana. Ediciones Omega, S.A., Barcelona, Espanha, 655 pp..
- SWFFORD, D.L., OLSEN, G.J., WADDELL, P.J. e HILLIS, D.M., 1996. Phylogenetic inference. *In*: Molecular systematics. HILLIS, D.M C. e MORITZ, B.K. (Eds). 2ª Edição, Sunderland, Reino Unido, 107-514.

- TADLAOUI-OUAFI, A., BABILLIOT, J.M., LEROUX, C. e MARTIN, P., 2002. Genetic diversity of the two main Moroccan goat breeds: phylogenetic relationships with four breeds reared in France. *Small Ruminant Research*, **45**: 233-255.
- TAETENO, Y., NEI, M. e TAJIMA, F., 1982. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data I. Distantly related species. *J Mol Evol*, **18**: 387-404.
- TAKEZAKI, N. e NEI, M., 1996. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**: 385-399.
- TAKEZAKI, N., 1997. njbfd. <http://www.cib.nig.ac.jp/dda/ntakezak.html>
- TEIXEIRA, A.J.C., 1991. Contributo para a classificação etnológica dos ovinos churros portugueses mediante distâncias morfométricas do esqueleto cefálico e do osso metacarpo. Tese de doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal.
- TIERNO, J., 1933. Ecologia das raças pecuárias portuguesas. Boletim Pecuário, nº 3, Ano I, Lisboa, Portugal, 125-140.
- TILMAN, D., 1999. Global environmental impacts of agriculture expansion: The need for sustainable and efficient practices. *Natl Acad Sci USA*, **29** (1): 5995-6000.
- TIMCHENKO, L.T., TIMCHENKO, N.A., CASKEY, C.T. e ROBERTS, R., 1996. Novel proteins with binding specificity, for DNA, CTG repeats and RNA, CUG repeats: implications for myotonic dystrophy. *Hum Mol Genet*, **5**: 115-121.
- TORO, M., SILIÓ, L. e RODRÍGUEZ, J. 1977. The use of molecular markers in conservation programs of live animals. In: 48<sup>th</sup> Annual Meeting of EAA, Commission on Animal Genetics, Session II: Breeding strategies for small populations, Viena, Áustria, 25-28.
- TRASK, B.J., 1991. Fluorescence *in situ* hybridisation: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, **7**: 149-154.
- TUCKER, E.M. e CLARKE, S.W., 1980. Comparative aspects of biochemical polymorphism in the blood of Caprinae species and their hybrids. *Anim Blood Groups Biochem Genet*, **11**: 163-183.

- TUÑÓN, M.J., GONZALEZ, P. e VALLEJO, M., 1989. Genetic relationships between 14 native Spanish breeds of goat. *Anim Genet*, **20**: 205-212.
- TUÑÓN, M.J.G., 1986. Estructura e interrelaciones genéticas de 14 agrupaciones caprinas (*C. hircus*) autóctonas españolas, estimadas mediante 14 sistemas genéticos sanguíneos. Tese de doutoramento, Universidade de León, Leão, Espanha.
- TURMBULL, P.F. e REED, C.A., 1974. The fauna from terminal Pleistocene of Palegawra cave, a Zarziam occupation site in Northeastern Iraq. *Fieldiana Antropology*, **3**: 81-146.
- UPHOLT, W.B. e DAWID, I.B., 1977. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D loop region. *Cell*, **11**: 571-585.
- UVM, 2002. Historical perspectives of animal domestication. Department of Animal Science. A course On Line, Disponível em 29/11/2002, em < URL <http://asci.uvm.edu/course/asci001/domestic.html>
- VAIMAN, D., SCHIBLER, L., BOURGEOIS, F., OUSTRY, A., AMIGUES, Y. e CRIBIU, E.P., 1996. A genetic linkage map of the male goat genome. *Genetics*, **144**: 276-305.
- VALDEZ, R., NALDER, C.F. e BUNCH, T.D., 1978. Evolution of wild sheep in Iran. *Evolution*, **32**: 56-72.
- VANKAN, D.M. e BELL, K., 1992. Caprine blood groups. The B system. *Biochemical genetics*, **31** (1/2): 7-17.
- VIDA, G., 1994. Global issues of genetic diversity. *Conservations genetics*. V.LESCHCKE, J. IONIUK e S.K. BIRKHAUSER (Eds). Verlag Basel, Suíça, 9-19.
- WAGNER, W.C., 1999. Sustainable agriculture: how to sustain a production system in a changing environment. *Int J Parasitol.*, **29** (1): 1-5.
- WALKER, J.M. e GINGOLD, E.B., 1993. *Molecular biology and biotechnology*. 3<sup>a</sup> Edição, Royal Society of Chemistral, Cambridge, Reino Unido, 417 pp..
- WEBER, J.L., 1990. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT)<sub>n</sub> polymorphisms. *Genomics*, **7**: 523-530.

- WEIMAN, C., HIENDLEDER, S., VAIMAN, D. e ERHARDT, G., 2000. Rapid communication: genetic linkage mapping of caprine microsatellite derived from a genomic clone containing the INHA gene. *J Anim Sci*, **78**: 2481-2482.
- WEIR, B.S., 1996. Genetic data analysis II. Sinauer Associates Inc, Massachusetts, EUA, 445 pp..
- WILLIAMS, J., 1999. Organization and study of genome. Advanced course on molecular Techniques in breeding. Mediterranean Agronomic Institute of Zaragoza. Universidad de León, León, Espanha, 1-16 pp..
- WIMMERS, K., PONSUKSILI, S., HARDAGE, T., VALLE-ZARATE, A., MARTHUR, P.K. e HORST, P., 2000. Genetic distinctness of African Asian and South American local chickens. *Anim Genet*, **31**: 159-165.
- WRIGHT, S., 1951. The genetical structure of populations *Ann. Eugen.*, **15**: 323-354.
- WRIGHT, S., 1965. The interpretation of population structure by f-statistic with special regard to systems of mating. *Evolution*, **19**: 395-420.
- WURTER, D.H. e BENIRSCHKE, K., 1968. Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma*, **25**: 152-171.
- YANG, L., ZHAO, S.H., LI, K., PENG, Z.Z. e MONTGOMERY, G.W., 1999. Determination of genetic relationships among five indigenous Chinese goat breeds with six microsatellites markers. *Anim Genet*, **30**: 452-455.
- ZAJC, I., MELLERSH, C.C. e SAMPSON, J., 1997. Variability of canine microsatellites within and between different dog breeds. *Mamm Genome*, **8** (3): 182-185.
- ZEDER, M.A. e HESS, 2000. the initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10,000 years ago. *Science*, **287** (5461): 2254-2257.
- ZHARKIKH, A., 1994. Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *J Mol Evol*, **39**: 315-329.