

**Estudo da diversidade genética por 93 marcadores  
moleculares das raças de bovinos autóctones:  
Mirandesa, Barrosã e Maronesa**

**Armandina dos Santos Almeida**

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança  
para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologias da Ciência  
Animal

Orientado por

**Professor Doutor Vasco Augusto Pilão Cadavez**

**Bragança**  
2014

“O cientista não estuda a natureza porque isso é útil; ele a estuda porque se deleita com isso, e se deleita porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena conhecê-la, e se a natureza não merecesse ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

# Agradecimentos

Ao professor Doutor Vasco Cadavez, em primeiro lugar agradeço por aceitar ser meu orientador. A ele gostaria de demonstrar a minha sincera gratidão por todo o apoio, amizade, paciência, colaboração, disponibilidade e auxílio na concretização de todas as tarefas que este trabalho envolveu, bem como por todo o conhecimento científico partilhado não só na elaboração desta dissertação, mas ao longo de todo o meu percurso académico.

A todos os Docentes da Escola Superior Agrária de Bragança, que de uma forma ou de outra, pelos seus ensinamentos contribuíram para o meu progresso académico.

Às Associações de Criadores de Bovinos que colaboraram e disponibilizaram as amostras necessárias para a realização deste trabalho, designadamente:

- Associação de Criadores do Maronês (A.C.M);
- Associação de Criadores de Bovinos da Raça Barrosã (AMIBA);
- Associação dos Criadores de Bovinos da Raça Mirandesa (ACBRM);

À professora Cristina Cadavez, por toda amizade e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis.

À minha amiga Eng<sup>a</sup> Ana Pinto, outrora colega de Licenciatura, pela amizade, apoio, palavras de motivação e por todos os bons momentos que passamos juntas.

Aos meus pais, que através do amor e carinho, de todos os seus ensinamentos e conselhos possibilitaram o meu desenvolvimento pessoal e profissional. A eles um especial obrigado, por nunca me terem deixado faltar nada e porque tornam possível a realização das várias etapas que me conduziram até aqui.

Por fim, ao meu marido Cristóvão Liberal, por me ter ajudado a superar todos os obstáculos ao longo do meu percurso académico, por ter estado sempre disponível para me ajudar em tudo o que precisei, pelo constante encorajamento a fim de atingir os objectivos que tracei, por toda a paciência e compreensão. A todos os outros que me ajudaram, de alguma maneira, a chegar ao fim desta etapa, manifesto o meu agradecimento.

## Resumo

Este trabalho teve como objectivos: 1) caracterizar geneticamente e avaliar a diversidade genética das raças de bovinos autóctones: Mirandesa (MIR), Maronesa (MAR) e Barrossã (BAR); 2) compara os parâmetros de diversidade genética das raças portuguesas com um grupo de 19 raças originárias de várias regiões europeias, nomeadamente: Anatólia, Balcãs, Alpes, Noroeste Europeu. Para tal, foram colhidas amostras de sangue ou de pêlo de 50 indivíduos, de cada uma das três raças portuguesas, escolhidos com base na informação do pedigree para evitar, se possível, a escolha de animais aparentados. Os dados referentes às raças europeias incluídas neste estudo foram gentilmente cedidos pelo investigador, da Universidade de Medicina Veterinária, Ivica Medugorac. As amostras biológicas foram analisadas para 93 microssatélites previamente identificados no trabalho de Ramjalak et al. (2011). Os softwares fstat v.2.9.3. e a package adegenet do software R foram utilizados para calcular, para cada um dos marcadores, os parâmetros de variabilidade genética: heterozigotia esperada ( $H_e$ ), heterozigotia observada ( $H_o$ ) e riqueza alélica. No total das 21 raças, incluídas neste trabalho, o número médio de alelos por locus foi de 6,72. Para os loci estudados, a  $H_o$  média foi de 0,64, a  $H_e$  média foi de 0,6 e a RA média foi de 58,5 alelos. Nas raças Portuguesas, o número de alelos raros foi de 30, 52 e 33, para a BAR, MAR, MIR, respectivamente; e o número de alelos privados foi de 5 na MIR e BAR e 2 na MAR. No geral, as raças portuguesas, quando comparadas com as raças autóctones de outras regiões europeias, apresentaram uma menor variabilidade genética. Entre as raças Portuguesas, a MIR apresentou maior distância genética relativamente às raças MAR e BAR, pelo que se apresenta como um grupo genético distinto.

Palavras chave: Bovinos, Conservação, Diversidade genética, Microssatélites.

## Summary

The objectives of this work were: 1) to characterize geneically and to study the genetic variability of three Portuguese cattle breeds: Mirandesa (MIR), Maronesa (MAR) and Barrosã (BAR); and 2) to compare the genetic diversity parameters of portuguese cattle breeds with a set of 19 european cattle breeds that have been genotyped for the same markers and covering several european geographical regions: Anatolia, Balkans and Alpine, and north-west of Europe. Blood or hair biological samples were collected from 50 individuals of each breed, selected based on the pedigree information in order to avoid the use of related animals. Data concerning the set of european cattle breeds were courtesy of the researcher Ivica Medugorac from the University of Munchen. The biological samples were analysed for ninety-three microsatellites, previously identified by Ramjalak et al. (2011), to get thorough information about genetic diversity and population structure. Estimates of genetic variability, observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ), allelic richness (AR) for each locus were determined using the fstat v.2.9.3. software and the library adgenet from the R software. For the 21 breeds, included in this work, the mean number of alleles per locus was 6.72. For all loci studied, the average  $H_o$  was 0.64, the average  $H_e$  was 0.68, and the AR was 58.5. For the portuguese breeds, the number of rare alleles found was 52 in MAR, 33 in MIR, and 30 in BAR; and the number of private alleles found was 5 in MIR and BAR, and 2 in MAR. The overall results of his work recognize Portuguese breeds as harbouring a lower genetic diversity than other traditional unselected cattle breeds. When compared with the other european cattle breeds, the portuguese cattle showed lower genetic variability. Among the portuguese cattle breeds, the MIR breed showed greater genetic distance relatively to the MAR and BAR breeds, therefore constitutes a distinct genetic group.

Key-words: Cattle, Conservation, Genetic diversity, Microsatellites.

# Índice

<b>1</b>	<b>Revisão bibliográfica</b>	<b>1</b>
1.1	Introdução . . . . .	1
1.2	Origem e domesticação dos bovinos . . . . .	2
1.2.1	Raças bovinas autóctones incluídas neste trabalho . . . . .	3
1.2.1.1	A Raça Barrosã . . . . .	4
1.2.1.2	A Raça Maronesa . . . . .	5
1.2.1.3	A Raça Mirandesa . . . . .	6
1.3	Recursos genéticos do sector pecuário . . . . .	6
1.3.0.4	Recursos genéticos animais em Portugal . . . . .	8
1.4	Preservação das espécies pecuárias . . . . .	10
1.4.1	Caracterização da diversidade genética . . . . .	11
1.4.1.1	Métodos de estudo da variabilidade genética . . . . .	12
1.4.1.2	Parâmetros de diversidade genética . . . . .	17
1.4.2	Métodos para conservar os recursos genéticos animais . . . . .	19
1.4.3	Conservação <i>in-situ</i> . . . . .	21
1.4.4	Conservação <i>ex-situ</i> . . . . .	21
	<b>Bibliografia</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Study of genetic diversity of three Portuguese cattle breeds by 93 microsatellite markers</b>	<b>28</b>
2.1	Introduction . . . . .	29
2.2	Material e methods . . . . .	30
2.2.1	Samples and microsatellite markers . . . . .	30
2.2.2	DNA extraction and microsatellite analyses . . . . .	30
2.2.3	Statistical analysis . . . . .	30
2.3	Results and discussion . . . . .	31
2.3.1	Overall genetic variability . . . . .	31
2.3.2	Genetic diversity within breeds . . . . .	33

2.3.3 Breeds interrelationships . . . . .	37
2.4 Conclusions . . . . .	38
<b>Bibliografia</b>	<b>38</b>
<b>3 Comparação da diversidade genética de três raças bovinas Portuguesas com outras raças europeias</b>	<b>45</b>
3.1 Introdução . . . . .	46
3.2 Material e métodos . . . . .	47
3.2.1 Raças estudadas . . . . .	47
3.2.2 Amostras biológicas . . . . .	47
3.2.3 Análise de microssatélites . . . . .	47
3.2.4 Variabilidade genética . . . . .	49
3.2.5 Distâncias genéticas . . . . .	49
3.3 Resultados e discussão . . . . .	50
3.3.1 Variabilidade genética . . . . .	50
3.3.2 Distâncias genéticas . . . . .	52
3.3.3 Relações entre as raças . . . . .	52
3.4 Conclusões . . . . .	54
<b>Bibliografia</b>	<b>55</b>

# Índice de tabelas

2.1	Genetic variability at the 93 microsatellites loci for the three breeds studied. . . . .	33
2.2	Pairwise estimates of $F_{ST}$ below the diagonal, and Nei's genetic distance ( $DA$ ) above the diagonal . . . . .	37
3.1	Nome das raças, código atribuído, aptidão, local de origem e número de final das amostras . . . . .	48
3.2	Número médio de alelos ( $mA$ ), número total de alelos ( $tA$ ), número de alelos privados ( $pA$ ), número de alelos raros ( $rA$ ), heterozigotia esperada ( $H_e$ ) e heterozigotia observada ( $H_o$ ) nas 21 raças incluídas no estudo, os valores mínimos e máximos encontram-se a negrito . . .	51
3.3	Valores de $F_{ST}$ acima da diagonal e distância de Nei ( $d$ ) abaixo da diagonal . . . . .	53



# Índice de figuras

2.1	Alleles number per locus at the 93 microsatellite loci . . . . .	32
2.2	Observed versus expected heterozygosity for the 93 microsatellite loci	32
2.3	Expected versus observed heterozygosity for the three breeds studied	34
2.4	Frequency distributions of the individual inbreeding coefficient and heterozygosity for three cattle breeds . . . . .	36
2.5	Principal components analysis of the Nei's genetic distance for the three cattle breeds . . . . .	38
3.1	Rede filogenética construída com base na distância genética de Nei (1987) e desenhada com o software SPLITSTREE4 (Huson and Bryant, 2006) . . . . .	54

# Capítulo 1

## Revisão bibliográfica

### 1.1 Introdução

As raças autóctones de animais zootécnicos são importantes reservatórios de genes, estas representam fontes de diversidade genética para a produção animal futura. Estas raças estão, também, amplamente relacionadas com a cultura e com as tradições das populações que as exploram, pelo que contribuem para a identidade cultural das regiões tal como referido por Ramljak et al. (2011) quando se referia às raças de bovinos autóctones Croatas. De facto, estas raças, em geral não são sujeitas a programas de selecção artificial rigorosa, representam importantes reservatórios de diversidade genética. Estes preciosos recursos genéticos têm estado ameaçados em resultado das elevadas exigências económicas das explorações agro-pecuárias modernas.

Nos últimos anos, a preocupação com estas raças ameaçadas cresceu, pelo que actualmente existe uma conjuntura política e económica claramente favorável à sua conservação. De facto, esta preocupação conduziu a União Europeia a desenvolver um conjunto de instrumentos (ajudas comunitárias na forma de medidas agro-ambientais), para incentivar a utilização destas raças. Os produtos de qualidade (Denominação de Origem Protegida, etc.) associados às raças autóctones têm contribuído, de forma decisiva, para a preservação desta enorme fonte de diversidade genética. Actualmente, observa-se um interesse acrescido para o desenvolvimento de planos de melhoramento genético destas raças, que quando mal delineados conduzem, sem dúvida alguma, a perdas de diversidade genética (Leal, 1998).

Em Portugal, existe um número considerável de raças bovinas autóctones associadas a produtos de qualidade, que muito têm contribuído para a preservação destas raças e também, para a manutenção da população rural. Estas raças tem sido caracterizadas através de estudos de características fenotípicas, mas estes ne-

cessitam de ser complementados com investigação relativa à estrutura genética das várias populações de bovinos nacionais, passando a contribuir para clarificar o grau de proximidade, a sua origem e evolução recente (Leal, 1998).

A realização deste trabalho teve como objectivo geral estudar a diversidade genética das três raças de bovinos Mirandesa, Maronesa e Barrosã utilizando 93 marcadores moleculares. Como objectivos específicos temos:

1. A análise da diversidade genética intra e entre as raças de bovinos autóctones Mirandesa, Barrosã e Maronesa;
2. Obter informação quantitativa útil para a hierarquização de prioridades de conservação, em eventuais programas de conservação;
3. Estudar as relações filogenéticas das raças Mirandesa, Maronesa e Barrosã;
4. Comparar a diversidade genética das três raças de bovinos portuguesas com outras raças de bovinos europeias.

## 1.2 Origem e domesticação dos bovinos

A domesticação animal foi um processo gradual, extremamente complexo e não está, ainda, completamente esclarecido (Ginja, 2009). A origem das raças e as suas relações étnicas e filogenéticas têm sido revistas com a utilização de técnicas de análise molecular, estas conduziram a novas hipóteses (Achilli et al., 2008; Sousa and Sánchez, 2009). Todavia, Sousa and Sánchez (2009) referem que estas técnicas não produziram hipóteses muito divergentes daquelas até agora aceites, confirmando até algumas teorias baseadas em dados históricos e estudos de fósseis.

O Auroque (*Bos taurus primigenius*), considerado a forma ancestral única de todas as raças bovinas actuais (Alves, 2004; Sousa and Sánchez, 2009; Ginja, 2009), povoou uma vasta área do globo, que abrangia as ilhas britânicas, uma grande parte do território Europeu, o norte de África, o Médio Oriente, a Ásia Central e a Índia. Assim, é comumente aceite que o Auroque deu origem à maioria das populações de bovinos domésticos existentes na Europa Continental (Ginja, 2009). O último exemplar do Auroque desapareceu em 1627 na Finlândia (Sousa and Sánchez, 2009).

As evidências arqueológicas disponíveis indicam que os bovinos foram domesticados na região Oriental do Mediterrâneo e do Médio Oriente há cerca de 10 000 anos atrás (Sousa and Sánchez, 2009). Carvalho (2000) teorizou sobre o processo de dispersão dos bovinos, considerando que este se iniciou a partir do Sudoeste Asiático,

expandindo-se até ao Norte de África através do vale do rio Nilo onde, diversos achados arqueológicos e paleontológicos (4000 anos A.C.) mostram um bovino totalmente domesticado, de cornos longos, ligeiramente mais pequeno que o Auroque. A partir desta altura, a expansão do gado bovino para a Europa e para o Norte de África está bem documentada evidências arqueozoológicas.

Nas margens do Mediterrâneo foram, também, descobertos registos de bovinos de cornos longos, revelando duas rotas migratórias: 1) da Palestina através do Egipto até ao Noroeste Africano, e 2) da Ásia Menor através dos Balcãs para a Península Ibérica, estendendo-se para Leste, Norte e Sul Ginja et al. (2010b). Este autor refere que os bovinos da região do Mediterrâneo e da Península Ibérica têm origem em animais oriundos do Médio Oriente, através de uma via Continental, mas também em animais introduzidos por mar, nomeadamente a partir do Norte de África. As populações bovinas domesticadas foram recebendo genes da espécie selvagem, o Auroque, à medida que acompanhavam as populações humanas nas suas migrações. Não se conhece a intensidade do fluxo génico entre os bovinos domesticados e o seu ancestral selvagem, nem qual a sua contribuição na formação das populações bovinas europeias (Carvalho, 2000).

Ao longo dos tempos, os animais domésticos foram sendo moldados pelas mais diversas civilizações humanas, que os seleccionaram em função das suas conveniências, que juntamente com a deriva genética e a adaptação a ambientes específicos originaram as inúmeras populações (raças) de bovinos que hoje conhecemos (Ginja, 2009). Várias raças de bovinos evoluíram, tendo-se adaptado ao clima e às doenças específicas de cada local. Adicionalmente, foram seleccionadas para diferentes objectivos, pelo que as raças actuais possuem, provavelmente, uma combinação única de genes (Carvalho, 2000).

### **1.2.1 Raças bovinas autóctones incluídas neste trabalho**

Em Portugal, existem quinze raças bovinas autóctones, pelo que a sua conservação é importante pelo lugar que estas ocupam nos sistemas de produção natural (Correia, 2004). Estas raças são responsáveis pelo aproveitamento de zonas marginais, defendem e potenciam a biodiversidade, enriquecem, com produtos de qualidade, o património histórico, cultural e social português, pelo que contribuem para a preservação do mundo rural do nosso país. As três raças estudadas neste trabalho são, seguidamente, descritas de uma forma sucinta.

### 1.2.1.1 A Raça Barrosã

Actualmente, o centro de produção da raça Barrosã situa-se na zona do planalto da Serra do Barroso, abrangendo os actuais concelhos de Montalegre, Boticas, Vieira do Minho (freguesias de Campos e Ruivães) e Cabeceiras de Basto (freguesia de Gondiaães). As condições agro-climatéricas desta região conduzem a população para à criação de gado (Leal, 1998).

Durante muito tempo, a raça Barrosã foi explorada na dupla função de trabalho e carne. Nos últimos anos, é nesta última utilização que esta raça tem evoluído, culminando com a criação, por despacho 18/94 de 31 de Janeiro do Diário da República II série, da Denominação de Origem Protegida (DOP): “Carne Barrosã”. No final do século XIX e início do século XX, existia um grande incentivo à criação desta raça, resultante da procura de carne para o mercado inglês, onde era muito apreciada (Leal, 1998).

O Bovino Barrosão é um animal de estatura mediana, com 121-130 cm de altura à cernelha, com pelagem de cor castanha, variando entre a cor palha o a cereja. A cabeça é curta e larga, encimada por uma cornadura em forma de lira alta. Os cornos são muito compridos e espessos, de cor branca suja, com pontas escuras. O conjunto ocular é saliente, os membros são curtos e poucos ossudos, o pescoço é curto, bem ligado à cabeça e com garrote largo (Carvalho, 2000). Esta raça apresenta um dimorfismo sexual muito evidente. Os touros são sempre mais escuros, particularmente no terço anterior, possuem uma maior corpulência, um tronco mais robusto, barbela mais desenvolvida, cabeça mais curta e mais larga, cornos mais grossos mas mais curtos (Carvalho, 2000).

A criação do livro genealógico da raça Barrosã, em 1981, constituiu um passo importante para a preservação desta raça. A recente política de protecção às raças autóctones, implementada pela União Europeia (UE), permitiu uma ligeira recuperação dos efectivos desta raça que, segundo dados do Ministério da Agricultura, em 1998 existiam 7300 animais inscritos no livro genealógico (Carvalho, 2000).

A origem desta raça permanece, ainda, por esclarecer. Há opiniões são controversas, resultantes das suas características particulares (acentuado perfil côncavo e cornadura em forma de lira) que a tornam difícil de enquadrar no seio das restantes raças bovinas europeias. Admite-se uma proveniência da raça Barrosã do planalto superior castelhano, incluída no tronco mauritânico, tronco este derivado de um ancestral do tipo côncavo brevilineo denominado *B. p. mauritanicus* (ou *B. p. opisthonomus*) encontrado no Norte de África e que terá chegado à Península Ibérica através de várias rotas migratórias dos povos norte-africanos (Carvalho, 2000). No

entanto, estas hipóteses baseiam-se apenas em algumas características morfológicas e, portanto, pouco fundamentadas. A utilização de variantes proteicas também não permitiu esclarecer esta questão, pelo que é necessária mais investigação, nomeadamente a nível molecular, para esclarecer a origem da raça Barrosã (Carvalho, 2000).

#### 1.2.1.2 A Raça Maronesa

O bovino Maronês tem como área de criação as serras do Alvão, do Marão e da Padrela (Carvalho, 2000) e o nome oficial da raça responde à toponímia da Serra do Marão. É uma raça de extraordinária rusticidade e de um poder de adaptação a terrenos mais ásperos e acidentados, onde a mecanização é difícil de implementar. É um excelente produtor de carne de qualidade e, além disso, no primeiro mês de criação, produz leite que excede, quase sempre, as necessidades da cria (Carvalho, 2000). O Maronês apresenta pequena corpulência, regular conformação, linha dorso-lombar recta, possui pelagem de cor castanha escura. A cabeça é pequena, seca e bem expressiva, o perfil é côncavo, sendo este mais evidenciado devido à saliência das protuberâncias orbitárias, os cornos apresentam inserção média, são delgados, lisos, de cor branco-sujo e de pontas escuras. O touro apresenta acentuado dimorfismo sexual, com cabeça mais compacta e menos recortada, de pelagem mais escura do que a das fêmeas (Carvalho, 2000).

A origem e a evolução da raça Maronesa, só agora, com os recentes avanços técnico-científicos na área da genética molecular, começam a ser decifradas. Por razões de posicionamento geográfico e, eventualmente, por algumas semelhanças morfológicas atribuiu-se a origem do Maronês ao cruzamento das raças: Mirandesa e Barrosã. Os resultados obtidos, em vários trabalhos de investigação, colocam a Maroese em espaços filogenéticos suficientemente afastados das demais raças portuguesas, confirmando a sua filiação no tronco étnico Negro Ortoide. Consequentemente, a Maronesa terá uma origem directa do *Bos primigenius*, que povoou a Península Ibérica aquando do primeiro movimento dos bovinos em estado selvagem. Até à mecanização da agricultura e dos transportes, o Maronês teve na aptidão trabalho a sua principal valorização económica. Actualmente, a raça distingue-se na produção de carne, principalmente na carne de vitela, aptidão pela qual passou ser conhecida pelos consumidores mais exigentes. Assim, a “Carne Maronesa” está protegida por um selo de Denominação de Origem Protegida (DOP) por despacho 14/94; DR II Série de 26/01/94, Reg. (CE) nº 1263 de 02/07.

### 1.2.1.3 A Raça Mirandesa

Até à década de setenta, os bovinos de raça Mirandesa foram explorados e dominantes em quase todas as províncias do território português, excepto o Algarve e o Minho, tendo chegado a ser recenseados mais de 200 mil animais (ACBRM, 2012). De facto, no início do Século XX, a raça Mirandesa apresentava, entre as raças portuguesas, a maior área de expansão, distribuindo-se desde o planalto Mirandês (região considerada como o seu solar) até ao norte do Alentejo, estendendo-se a algumas regiões do litoral centro (ACBRM, 2012). O berço ou centro de irradiação coincide com a área etnográfica em que se fala a língua mirandesa, correspondendo pouco mais ou menos ao actual concelho de Miranda do Douro. Daí irradiou para os vizinhos concelhos de Vimioso, Mogadouro, Bragança, Vinhais e Macedo de Cavaleiros, que passaram a integrar o solar da raça.

A mecanização da agricultura e a importação de raças exóticas mais produtivas levaram ao declínio desta raça que subsiste, actualmente, na região norte, explorada na produção de carne (Carvalho, 2000). Os animais desta raça caracterizam-se por animais de grande corpulência, compridos, largos, bem musculados, de linha dorso-lombar quase horizontal, terço posterior bem desenvolvido e membros de comprimento mediano. A pelagem é castanha, escurecendo nas extremidades e os machos são mais escuros do que as fêmeas. As fêmeas possuem uma boa capacidade maternal (Carvalho, 2000). O bovino Mirandês é, geralmente, enquadrado no tronco ibérico (*Bos taurus ibericus*) sendo classificado como uma raça eumétrica de perfil rectilíneo (Carvalho, 2000).

A carne dos bovinos Mirandeses está, também, protegida pelo selo de qualidade, reconhecido pela Comissão Europeia através da atribuição de uma Denominação de Origem Protegida (DOP) para a “Carne Mirandesa” (ACBRM, 2012).

## 1.3 Recursos genéticos do sector pecuário

A acção conjunta da selecção natural e da selecção artificial resultou em centenas de raças, cuidadosamente moldadas por diferentes culturas, por variadas condições ambientais e para várias funções (produção de leite, carne, peles, lazer e desporto, etc). Esta grande variabilidade genética e fenotípica resultou da acção conjunta de mutações, da deriva genética de pressões impostas pelas condições edafoclimáticas, doenças e pelos critérios mais ou menos hedónicos de selecção impostos pelo homem (Correia, 2004).

Actualmente, a pecuária mundial está a passar por grandes mudanças, conse-

quência da expansão da produção em larga escala como resposta ao rápido aumento do consumo de produtos de origem animal (FAO, 2007). Desta forma, a gestão racional da biodiversidade agropecuária do mundo é um desafio cada vez mais presente. Algumas raças têm sido submetidas a programas de melhoramento genético, para tornar os animais mais produtivos. Estes programas de selecção estão, geralmente, associados à utilização de um reduzido número de reprodutores, pelo que conduzem ao aumento do coeficiente de consanguinidade e a uma redução do tamanho efectivo das populações, conduzindo a uma diminuição da variabilidade genética (Carneiro et al., 2007). A redução da variabilidade genética pode comprometer a capacidade de adaptação dos animais a alterações das condições ambientais, bem como pode conduzir ao seu declínio em resultado do aumento da taxa de consanguinidade (Lopes et al., 2007).

Por outro lado, existe um elevado número de raças sobre as quais não existe qualquer informação, pelo que também estas apresentam elevados risco de erosão genética. Desta forma, o estudo e a caracterização das raças autóctones de animais zootécnicos é essencial para avaliar o seu potencial de produção, bem como para proteger estes recursos genéticos, que poderão ser importantes para a agricultura do futuro (FAO, 2007).

Os programas de conservação têm custos, pelo que preservação destas raças deverá estar relacionada com a diversidade genética que as mesmas representam. A gestão eficaz da diversidade genética animal é essencial para a segurança alimentar, para o desenvolvimento sustentável e para preservar o modo de vida de centenas de milhões de pessoas no mundo (FAO, 2007). De facto, as raças autóctones permitem ao homem sobreviver em ambientes marginais, como os desertos e as terras não cultiváveis (FAO, 2007), pelo que os pastores e os pequenos produtores, que sobrevivem em ambientes pobres e marginais, têm sido os guardiões de grande parte da diversidade genética animal (FAO, 2007).

Nos últimos anos, a conservação das raças autóctones têm ganho grande interesse, mesmo nos países desenvolvidos, resultado da percepção da importância do reservatório de genes que estas representam. Em zonas com condições ambientais difíceis, a produção animal baseada nas raças autóctones, bem adaptadas e resistentes, é certamente a opção mais acertada. Estas raças, bem adaptadas ao meio, se detentoras de diversidade genética, podem ser melhoradas para aumentar a sua produtividade (FAO, 1998). Assim a biodiversidade contida nestas raças de animais zootécnicos, criada em grande parte pela intervenção humana, precisa planos adequados à sua conservação e/ou melhoramento genético, que contribuirá para a sua conservação a



longo prazo (FAO, 2007).

Assim, as raças autóctones de animais zootécnicos revestem-se de enorme importância, pelas suas produções, pela sua capacidade para resistir às doenças endémicas do território que povoam, pelas boas qualidades maternas, pela grande longevidade e por satisfazerem várias motivações culturais e/ou religiosas tal como observado por Correia (2004). Desta forma, é necessário garantir que a biodiversidade das raças autóctones de animais zootécnicos seja preservada, para que os genes únicos transportados pelas mesmas continuem disponíveis para a agricultura do futuro (FAO, 2007).

#### **1.3.0.4 Recursos genéticos animais em Portugal**

Portugal, apesar da sua reduzida dimensão, apresenta uma enorme variabilidade na orografia, nos solos, no clima, na estrutura fundiária das explorações agrícolas, nas tradições sociais e culturais da qual resultou uma grande diversidade biológica. Esta grande diversidade está, com certeza, associada à posição estratégica de Portugal. De facto, Portugal, ao longo dos tempos, foi ponto de passagem para muitos povos, pelo que os animais domésticos, que sofreram várias influências genéticas, foram sendo criados e seleccionados em nichos ecológicos específicos, em que a adaptação a condições ambientais particulares foi o aspecto fundamental (DGV et al., 2006).

As raças autóctones portuguesas fazem parte integrante do património histórico e cultural do País e, actualmente, ainda fazem parte do meio rural, onde desempenham um importante papel na fixação das populações, no equilíbrio ecológico, e nas diferentes manifestações de carácter gastronómico, social e cultural. As raças autóctones apresentam, ainda, níveis produtivos mais baixos que algumas raças exóticas ou seus cruzamentos. Todavia, estas têm a capacidade única de tirar partido de condições ambientais, muitas vezes adversas e restritivas, nas quais outros génotipos, mais exigentes, não conseguem produzir, ou mesmo sobreviver.

A intensificação da produção agrícola, conduziu a uma redução dos efectivos das raças autóctones portuguesas, pelo que muitas estão seriamente ameaçadas. A redução dos efectivos das raças autóctones resultará, necessariamente, no abandono destas regiões e, conseqüentemente, num agravamento da desertificação rural, bem como no seu desordenamento. As raças autóctones estão na base de produtos diferenciados de elevada qualidade, característicos de uma determinada raça e do sistema de produção, na maioria dos casos com Designação de Origem Protegida reconhecida e protegida a nível da União Europeia (DGV et al., 2006).

Nos últimos anos tem sido feito um esforço notável no sentido de salvaguardar

estes recursos únicos (DGV et al., 2006). Presentemente, em Portugal, estão oficialmente reconhecidas 14 raças autóctones de bovinos e de acordo com os critérios utilizados EU (Reg. CE N<sup>o</sup> 445/2002), que as classifica quanto ao estatuto de risco, estas raças encontram-se em “risco de abandono” (DGV et al., 2006). A classificação das raças quanto ao risco de extinção, é feito de acordo com o tamanho efectivo da população e com a dinâmica da sua evolução, da seguinte forma:

**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 1000 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 1000 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 1000 e a 20 ou cujo número de fêmeas reprodutoras seja ligeiramente inferior a 1000, mas que apresentem uma tendência de aumento e uma percentagem de fêmeas efectivamente de raça pura próxima dos 100%.

## 1.4 Preservação das espécies pecuárias

As necessidades crescentes e a pressão do mercado conduziu à criação intensiva e direccionada de um produto específico, de algumas raças de animais domésticos em detrimento de outras, estas consideradas eventualmente menos adequadas e por isso nunca seleccionadas para tais fins, ou sujeitas à realização de cruzamentos indiscriminados com raças exóticas, acabando assim por sujeita-las a um desaparecimento já verificado ou iminente, o que por sua vez se pode traduzir numa ameaça real à amplitude da variabilidade biológica. Em suma, existe um risco real de empobrecimento da base biológica (Correia, 2004; Rangel et al., 2007).

A erosão da diversidade genética de muitas raças autóctones, como consequência da deriva genética aleatória, tornou-se uma das principais preocupações (Cañón et al., 2011). Muitas raças têm características ou combinações de características singulares, tais como resistência a doenças, tolerância a condições climáticas extremas ou a possibilidade de fornecer produtos especializados, contribuindo assim para superar desafios futuros (Carvalho, 2000). Segundo a FAO (2007), é essencial tomar medidas de conservação bem direccionadas, para lidar com as ameaças que pairam sobre determinadas raças, sendo necessários esforços para priorizar e proteger os recursos genéticos animais FAO (2007). Na conservação de recursos genéticos, o principal objectivo consiste em preservar a variabilidade das populações, sob a hipótese de correlação entre a variação genética e viabilidade populacional (Méndez et al., 2002).

Uma causa importante que pode explicar a razão de uma raça autóctone de determinada área, passar a ser considerada como estando perigo de extinção é o facto de esta, deixar de desempenhar a sua função nessa área ou em outro lugar. A questão que se coloca nesta situação é se tal uma raça deve ser preservada. O argumento em favor da preservação é que não sabemos que tipo de animais serão necessários no futuro, e devemos portanto, preservar a variação genética entre raças disponíveis (biodiversidade), como um seguro contra um futuro desconhecido. Por outro lado, argumenta-se que as pessoas que obtêm o sustento criando animais, não se podem dar ao luxo de não preservar populações de algumas raças de animais ou descurar a preservação de raças autóctones, devido ao custo relativamente alto, só porque eles provavelmente nunca vão utilizar essa raça durante as suas vidas (Dekkers et al., 2004).

Raças que hoje são raras e que, aparentemente, não têm qualquer interesse podem possuir características que, no futuro, se tornarão de elevado interesse (Correia, 2004). Assim, vários trabalhos, nacionais e internacionais, têm sido desenvolvidos

para recolher dados relevantes sobre as raças ameaçadas de extinção, para desta forma as salvar (Dekkers et al., 2004). De facto, numerosos estudos têm posto em evidência o valor de acções para a sua preservação, demonstrando o quanto urgente é implementar tais medidas (Rangel et al., 2007).

A tentativa de conservação de raças em risco de extinção tem sido, frequentemente, considerada como sinónimo de conservação destes recursos (Gama and Carolino, 2002). Das várias ameaças à diversidade genética, a mais significativa é a marginalização não apenas dos sistemas tradicionais de produção, como também das raças locais a eles associadas. Este facto tem sido motivado, sobretudo pela rápida expansão da produção pecuária intensiva, muitas vezes feita a grande escala e com a utilização de um número reduzido de raças que apresentam um alto rendimento e, conseqüentemente, maiores lucros, quando utilizadas em sistemas de produção industrial (FAO, 2007). A tomada de decisões no âmbito da gestão de recursos genéticos animais é frequentemente caracterizada pela falta de atenção às múltiplas funções dos animais. Nestas circunstâncias, é provável que se subestime o valor das raças locais de uso múltiplo, levando-se em consideração apenas alguns elementos da contribuição dos animais para o bem-estar humano (FAO, 2007).

Neste contexto é fundamental que se disponha de um profundo conhecimento das raças, para identificar aquelas que apresentam características que as tornam prioritárias para a conservação. Tendo em conta as tendências dos mercados e as mudanças nos sistemas de produção, a perspectiva de futuros desafios, como por exemplo a adaptação a mudanças climáticas globais, enfatiza a importância de se conservar uma ampla gama de raças animais (FAO, 2007).

### **1.4.1 Caracterização da diversidade genética**

No meio científico, é unânime a necessidade de caracterizar os recursos genéticos de animais domésticos. Esta caracterização é essencial para poder implementar as medidas de conservação adequadas, bem como identificar as raças prioritárias a preservar. Na implementação de programas de conservação é fundamental analisar os parâmetros demográficos, tais como: o tamanho efectivo da população, a contribuição genética de animais fundadores e a evolução da consanguinidade (Ginja, 2009). Conseqüentemente, a primeira etapa de um programa de conservação é avaliar a diversidade genética e a sua distribuição na população (Méndez et al., 2002). Através da caracterização genética é possível estimar a variabilidade, as características que diferenciam as diversas populações, bem como analisar as relações filogenéticas entre as mesmas (Oliveira et al., 2005).

As técnicas moleculares constituem um instrumento essencial para a caracterização da diversidade genética de raças de animais zootécnicos e para auxiliar na definição de medidas de conservação. O desafio que se coloca, em termos de preservação dos recursos genéticos de animais (AnGr), é enorme pois implica considerar vários factores, como sejam as peculiaridades de cada raça, a sua contribuição para a diversidade genética global, o seu valor cultural e económico, estando no entanto condicionada pela disponibilidade de recursos financeiros e implicando o envolvimento de autoridades internacionais e locais (Ginja, 2009).

A caracterização genética, por técnicas moleculares, é importante para os programas de conservação de recursos genéticos animais (Ginja, 2009), pois permite avaliar a distância entre as populações e pode auxiliar na escolha dos animais a utilizar na conservação *ex situ* e *in situ*, mediante a estimativa de índices de similaridade dos indivíduos analisados. As técnicas moleculares possibilitam, também, a definição de acasalamentos ou cruzamentos que favorecem a manutenção da máxima variabilidade genética (Spritze et al., 2003; Egito, 2007). Além da informação molecular, a caracterização deve incluir a identificação, a descrição das raças e dos habitats e sistemas de produção onde estas se desenvolveram. É, também, importante avaliar o desempenho das raças, para assim orientar a tomada de decisões de conservação e/ou de melhoramento genético.

O elevado número de raças em situação de risco e os limitados recursos financeiros disponíveis para a conservação obrigam a que se faça uma análise económica do valor dos recursos genéticos e das possíveis intervenções de manejo para orientar a tomada de decisões. Entre as tarefas mais importantes estão (FAO, 2007):

1. Definir a contribuição económica que determinados recursos genéticos animais dão aos vários sectores da sociedade;
2. Identificar os custos efectivos das actividades de conservação;
3. Criar incentivos económicos e convénios políticos/institucionais para promover a conservação por criadores individuais ou por comunidades.

#### **1.4.1.1 Métodos de estudo da variabilidade genética**

Por marcador molecular entende-se uma região do genoma que apresenta variação entre indivíduos (Satar, 2009). Estes marcadores abriram um novo capítulo na avaliação e na conservação dos recursos genéticos, fornecendo mais informação sobre a variabilidade e para discriminar indivíduos numa população. Para além destas aplicações, podem ainda ser utilizados no controlo de parentesco, na procura de

regiões implicadas em determinados caracteres produtivos “Quantitative Trait Loci” (QTLs) e, ainda, pode ser utilizada em esquemas de cobertura utilizando a selecção assistida por marcadores (Correia, 2004). A reforçar esta ideia, Alcochete (2005) refere que o uso de marcadores representa um grande avanço pela possibilidade de identificar genótipos dos indivíduos que se pretendem estudar. Nenhum sistema de marcadores preenche todos os requisitos e existem diversos marcadores, cada um com as suas aplicações e limitações, muitas vezes dependentes da tecnologia disponível (Avise, 1994).

**Marcadores Morfológicos** Durante muitos anos, os marcadores utilizados eram unicamente caracteres responsáveis por modificações morfológicas, facilmente detectáveis. Hoje, sabemos que só parte da variabilidade genética se expressa em termos de fenótipo (Correia, 2004). A variação que existe a nível da sequência de DNA não é visível ao nível do fenótipo, uma vez que a maior parte das mutações que resulta na alteração da ordem dos nucleótidos são apenas mantidas durante a evolução se forem neutros (Lopes, 1999). 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 (Correia, 2004).

**Marcadores Bioquímicos** Com o evoluir dos tempos surgiram os marcadores moleculares bioquímicos e assim, as isoenzimas tornam-se no primeiro tipo de estudo molecular amplamente difundido. O estudo das isoenzimas baseava-se numa separação electroforética, em gel de amido ou mais recentemente em géis de poli-acrilamida, 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. 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. O problema 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 (Correia, 2004; Almeida, 2007; Satar,

2009).

**Polimorfismos de DNA** No finais dos anos 70, ocorreu uma grande mudança na utilização de marcadores genéticos, começaram-se a usar os de DNA e deixaram-se os proteicos, isto aliado à descoberta de uma série de métodos, que punham em evidência os polimorfismos de DNA. Esta mudança foi justificada pelo facto dos marcadores de DNA possuírem um maior potencial de “navegação” no genoma. Assim sendo, os polimorfismos de DNA permitem localizar genes em estudos de mapeamento de genomas ou serem simplesmente usados como marcadores de identificação (Correia, 2004). Contudo, o êxito e o corrente uso de marcadores de DNA deve-se ao aparecimento de enzimas de restrição e, mais tarde, à descoberta da Polimerase Chain Reaction (PCR) (Satar, 2009). Com o surgimento da PCR foram desenvolvidos vários métodos moleculares de diagnóstico baseados nesta tecnologia, tais como os Polimorfismos de DNA amplificado aleatoriamente (RAPDs), os Polimorfismos do comprimento do fragmento amplificado (AFLPs), as Repetições de sequências simples (SSR), entre muitos outros. Estes métodos permitem uma detecção eficiente dos fragmentos de DNA utilizando pequenas quantidades do mesmo. Estes marcadores moleculares possibilitaram a automatização, o que não era possível com a aplicação de RFLPs, conduzindo ao desenvolvimento de maiores investimentos nos campos da engenharia ao nível da biotecnologia, computação e áreas electrónicas. Até aos nossos dias, ocorreu um aumento exponencial de sistemas de marcadores, resultantes de pequenas variações dos anteriores, que podem ser utilizados nas análises genéticas (Lopes, 1999).

**Polimorfismos do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLPs)** A técnica de RFLPs baseia-se em detectar sequências específicas de DNA, fragmentadas por meio de enzimas de restrição e que podem ser separada por electroforese, permitindo obter padrões específicos para cada locus. Constitui um marcador codominante que pode ser aplicado no mapeamento do genoma, na análise de variabilidade de genótipos e no diagnóstico de doenças hereditárias. A sua maior limitação é o facto de ser uma técnica morosa e dispendiosa (Satar, 2009).

**Polimorfismos de DNA amplicados ao acaso (RADPs)** O marcadores moleculares RAPDs são baseados na amplificação aleatória por PCR de fragmentos de DNA, não requerendo qualquer conhecimento específico da sequência de DNA em estudo. É uma tecnologia bastante acessível, no entanto a principal limitação dos marcadores RAPDs é o baixo conteúdo de informação genética por locus e o facto

de ser um método que depende de todos os factores inerentes à técnica de PCR, não sendo reproduzível de forma consistente (Satar, 2009).

**Polimorfismos do fragmentos amplificados (AFLP)** A técnica de AFLPs é uma tecnologia recente que tem a capacidade de detectar polimorfismos, em diferentes regiões do genoma. A técnica de AFLP é baseada na amplificação de sequências de DNA previamente fragmentadas por enzimas de restrição. O AFLP é um marcador altamente sensível e tem sido aplicado na identificação de variabilidade genética, em testes de paternidade, em mapeamento genético e em genética populacional (Satar, 2009).

**Microssatélites** Microssatélites são sequências de DNA curtas (5-20 vezes) repetidas em tandem, tendo a unidade de repetição entre 1-6 pares de bases. São marcadores abundantes que cobrem uma vasta extensão no genoma encontrando-se em regiões codificantes e não codificantes do genoma, no entanto é na região não codificante que existem com mais frequência (Satar, 2009). Os microssatélites, também, designados por Short Tandem Repeats (STRs) ou por Simple Sequence Repeats (SSRs), são marcadores moleculares mais polimórficos, decorrentes das altas taxas de mutação, que variam entre  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  por geração.

O principal mecanismo de mutação dos microssatélites envolve o deslizamento (slippage) da DNA polimerase. De acordo com o modelo de slippage, após o início da replicação ocorre a dissociação das cadeias. Quando a nova cadeia tenta o emparelhamento à cadeia molde, há muitas cópias idênticas à unidade de repetição, o que poderá levar ao emparelhamento incorrecto à cadeia molde com a eliminação ou inserção de unidades de repetição. Este tipo de mutação faz com que os microssatélites exibam um alto grau de polimorfismo. Há dois principais modelos de mutação que são utilizados como base de explicação da relação entre os alelos: modelo stepwise, em que cada mutação adiciona ou elimina uma única unidade repetitiva e o modelo infinite allele, em que cada mutação origina um novo alelo.

Para além da adição/deleção de unidades repetitivas, podem também ocorrer substituições, conduzindo a microssatélites imperfeitos. São microssatélites complexos quando a sequência repetitiva é interrompida por uma sequência de bases repetidas mas diferentes às que compõem a unidade de repetição. Os microssatélites apresentam-se flanqueados por sequências, pelo que podem ser amplificados individualmente através da técnica de PCR. As técnicas de multiplexing permitem amplificar e genotipar vários loci ao mesmo tempo, reduzindo tempo e os custos. Os diferentes alelos são detectados pela diferença de tamanhos durante a electroforese



e as tecnologias de análise de fragmentos baseadas em detecção de fluorescência automática permitem também um processamento eficaz e rápido das amostras (Satar, 2009).

Os microssatélites quando comparados com outros marcadores apresentam inúmeras vantagens:

1. São abundantes no genoma de eucariotas, permitindo uma representatividade elevada quando muitos loci são utilizados, pelo que são os marcadores de eleição no mapeamento genético e em estudos de associação com o fenótipo;
2. Sendo altamente polimórficos, permitem obter informação sobre pedigrees e sobre genética populacional;
3. São reproduzíveis, apesar de poder haver erros de genotipagem associados e que têm de ser tidos em conta;
4. São co-dominantes, o que permite avaliar os níveis de heterozigotia;
5. São em geral marcadores neutrais;
6. São de herança mendeliana simples;
7. São de grande precisão, para estimar o grau de variabilidade intra e inter-populacional;
8. Sendo baseados em amplificação por PCR com pequena quantidade de tecido consegue-se amplificar o DNA necessário para ser aplicado na técnica;
9. As zonas flanqueantes dos microssatélites são muitas vezes conservadas entre espécies próximas, pelo que os primers desenvolvidos para uma espécie podem ser aplicados noutras.

No entanto, apresentam como desvantagens:

1. O trabalho, o tempo e os custos necessários para o desenvolvimento deste tipo de marcador;
2. A sua análise vai ser influenciada pelo número de loci estudados;
3. Ocorrência de homoplasia (alelos com idêntico tamanho mas com origem histórica diferente) conduzirá à subestimação de divergências genéticas entre populações afastadas;

4. A presença de alelos nulos (alelos que não amplificam por mutação na zona de ligação do primer usado na PCR) pode complicar a interpretação da frequência cacical dos micros satélites.

#### 1.4.1.2 Parâmetros de diversidade genética

O conhecimento da variabilidade genética apresenta grande importância para estabelecer programas de conservação, esta pode, actualmente, ser quantificada através de várias técnicas moleculares. A informação obtida é tratada de forma a obter alguns parâmetros que caracterizam a diversidade genética, nomeadamente:

1. A percentagem de loci polimórficos;
2. A riqueza cacical ou número de alelos (RA) presentes e sua frequência;
3. A heterozigotia observada (HO);
4. A diversidade génica ou heterozigotia esperada (He).

Estes parâmetros são, normalmente utilizados para estudar a diversidade dentro das raças, bem como para comparar a diversidade entre raças. Destas, destacamos o número médio de alelos por locus, ou seja a riqueza alélica (RA), pelo sua importância para a diversidade genética e pelo facto de ser um critério a utilizar para definir a prioridade de conservação. No entanto, a existência de genes únicos deve ser considerada para a definição das prioridades de conservação.

**Frequência alélica** A frequência de um alelo numa população, designa-se por frequência génica ou alélica. Este parâmetro é essencial para o estudo das populações, pelo que é essencial estimar as frequências alélicas das populações em estudo. Esta estimativa é obtida através da observação das frequências alélicas numa amostra representativa da população em estudo. Assim, quando existe informação sobre as frequências génicas de um grande número de loci, esta pode ser utilizada para calcular alguns indicadores de diversidade genética, nomeadamente:

- 1) proporção de loci polimórficos;
- 2) heterozigotia média do locus.

**Heterozigotia** A frequência de génotipos heterozigóticos é um importante indicador de diversidade genética. A heterozigotia pode ser expressa de duas formas: 1) heterozigotia individual, que descreve a proporção de loci heterozigóticos num indivíduo; e 2) heterozigotia média ou diversidade genética, que reflecte a proporção

de indivíduos heterozigóticos por locus. A heterozigotia média pode ser expressa de duas formas: 1) Heterozigotia observada ( $H_o$ ), é a proporção de loci heterozigóticos numa amostra da população; 2) Heterozigotia esperada ( $H_e$ ), definida como a probabilidade de dois alelos, escolhidos de forma aleatória numa população, serem diferentes. A  $H_o$  é definida matematicamente por:

$$H_o = \frac{\sum_{i=1}^n (1 \text{ se } a_{i1} \neq a_{i2})}{n}$$

com  $n$  é o número de indivíduos da população,  $a_{i1}$  e  $a_{i2}$  são os alelos do indivíduo  $i$  para o locus em estudo. A  $H_e$  é definida matematicamente por:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^m (f_i)^2$$

com  $m$  é o número de indivíduos da população e  $f_i$  é a frequência alélica  $i^{th}$  alelo para o locus em estudo.

**Conteúdo de informação polimórfica** O conteúdo de informação do polimórfica (PIC) é indicador da qualidade dos marcadores em estudos genéticos. Este indicador é calculado da seguinte forma (Botstein et al., 1980):

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

com:  $K$  é o número alelos,  $X_i$  é a frequência relativa do alelo  $i$  na amostra,  $X_j$  é a frequência relativa do alelo  $j$  na amostra.

PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,5 mediantemente informativos e inferiores a 0,25 são pouco informativos (McManus et al., 2011).

**Distância Genética** A distância genética é usada para medir, de uma forma geral, as diferenças genéticas entre populações. Este parâmetro é uma extensão de diferença génica (alélica) entre populações, sendo quantificada numericamente. Existem vários algoritmos para o cálculo de distâncias genéticas, que atendem ao tipo de informação disponível. Uma forma de cálculo da distancia genética é (Nei, 1987):

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

com:  $I$  igual ao índice de identidade genética, calculado por

$$I = \sum_{i=1}^m (P_{ix}P_{iy}) / [\sum_{i=1}^m P_{ix}^2 \sum P_{iy}^2] \times 0,5,$$

$P_{ix}$  é a frequência do alelo  $i$  na população  $X$ ,  $P_{iy}$  é a frequência do alelo  $i$  na população  $Y$  e  $m$  é o número de alelos por locus. A identidade genética ( $I$ ) varia de 0 a 1, pelo que  $d$  varia de 0 a  $\infty$ .

### 1.4.2 Métodos para conservar os recursos genéticos animais

Segundo os critérios definidos pelo Regulamento n.º 445/2002 da Comissão Europeia, a maioria das raças autóctones encontra-se em “risco de abandono”. Refira-se, contudo, que a situação de risco de extinção de muitas raças seria certamente muito mais grave se não existisse o conjunto de apoios integrados nas “medidas Agro-Ambientais”, que tem constituído um estímulo fundamental à sua manutenção e em alguns casos, ao crescimento dos seus efectivos. Outro factor que muito tem contribuído para a manutenção dos efectivos de raças autóctones tem sido a progressiva afirmação comercial de muitas delas, tirando partido da qualidade dos seus produtos com Denominação de Origem Protegida (Anónimo, 2004).

Quase todas as raças autóctones portuguesas possuem um Livro Genealógico e informação respeitante ao seu desempenho. No entanto, a sistematização da informação visando a caracterização produtiva, demográfica, genética, entre outras, difere bastante para as várias espécies e raças. Segundo Anónimo (1998) a caracterização produtiva foi já realizada em praticamente todas as raças autóctones, embora com informação dispersa e nem sempre muito uniforme.

As estratégias de conservação baseiam-se na identificação e no estabelecimento de prioridades a alcançar em relação aos recursos genéticos animais. A primeira etapa decisiva é identificar a “unidade” de conservação mais apropriada, tendo em conta que o objectivo principal é a manutenção da diversidade genética para uso futuro. Dado o estado actual do conhecimento, considera-se que, o que melhor representa a diversidade nas espécies de animais domésticos é a diversidade a nível de raças, ou seja, das distintas populações que se desenvolveram nos diferentes ambientes. Além disso, os argumentos culturais a favor da conservação estão relacionados com as raças, e não com os genes. Portanto, é razoável que as decisões relativas à conservação sejam tomadas em termos de raça. É preciso no entanto, reconhecer que a diversidade de raças não constitui o panorama completo da diversidade genética. No âmbito molecular, a diversidade genética é representada pela diversidade de alelos ou seja, diferenças nas sequências de DNA entre genes que afectam o desenvolvimento e o desempenho (FAO, 2007).

Para avaliar a importância de uma raça, sob a óptica de conservação, é preciso

resumir as informações de várias fontes, incluindo:

1. Estudos de diversidade de características, isto é, diversidade das combinações;
2. Estudos de genética molecular, que fornecem medidas objectivas da diversidade entre raças e dentro delas, ou evidências de atributos genéticos únicos;
3. Evidências de isolamento genético no passado;
4. Evidências de importância cultural ou histórica.

A situação relativa ao risco de extinção é outra consideração importante para o futuro. Numa perspectiva ultra-simplista de tentar classificar uma raça como estando ou não em risco, os decisores utilizam frequentemente o número de fêmeas registadas como critério decisório de classificação. Este indicador, por si só, pode ser manifestamente insuficiente e eventualmente enganador, uma vez que a variabilidade genética total de uma população animal pode ser considerada como o resultado de dois componentes: as diferenças entre raças (variabilidade entre raças) e as diferenças entre animais da mesma raça (variabilidade intra-racial). Segundo Gama and Carolino (2002), estudos recentes indicam que, numa determinada zona geográfica, a variabilidade intra-racial é muito mais importante que a variabilidade inter-racial. Assim sendo, numa perspectiva de manutenção da variabilidade genética a longo prazo, mais importante que conservar as raças a todo o custo, é a necessidade de evitar a erosão da variabilidade dentro de cada raça.

A consanguinidade é o factor que mais contribui para a redução da variabilidade genética dentro de uma população fechada, e o estudo da evolução da consanguinidade numa população permite, de forma retrospectiva, quantificar como a sua variabilidade genética tem evoluído. Na perspectiva de manutenção da variabilidade genética intra-racial, a FAO recomenda que a taxa de consanguinidade não exceda 1% por geração, o que corresponde a uma população com um tamanho efectivo mínimo de 50 (Gama and Carolino, 2002).

O papel da conservação é assegurar que recursos genéticos únicos, estejam à disposição dos produtores e que estes possam ser usados de uma forma sustentada (FAO, 1999). A optimização das estratégias de conservação requer também, que se pondere sobre a forma como os recursos financeiros disponíveis devem ser divididos entre raças consideradas e que se decida qual é a estratégia de conservação mais eficiente entre as opções existentes (FAO, 1999).

### 1.4.3 Conservação *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 evolução e a 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 Protegida com base em raças autóctones, como sucedeu relativamente à carne Mirandesa, ao queijo Terrincho, ao queijo da Serra da Estrela, entre outros. Quando este tipo de preservação não é economicamente viável, observa-se uma tendência 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 à perda de variabilidade genética, à diminuição das aptidões produtivas dos animais e conseqüentemente, ao aumento do risco de extinção. Correia (2004) salienta também, o perigo de desaparecimento de toda uma população se, por exemplo, surgir uma dada enfermidade.

### 1.4.4 Conservação *ex-situ*

A conservação *ex-situ* consiste na conservação de material genético fora do seu habitat natural (Correia, 2004), este método inclui a criopreservação de gâmetas ou embriões e deverá funcionar sempre como um método complementar ao *in situ* (Correia, 2004). 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.

Outra alternativa é o 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 recriar um animal, determinando previamente as características desejadas (Correia, 2004).

# Bibliografia

ACBRM. Mirandesa: A raça e a carne, 2012. URL <http://www.mirandesa.pt>.

Alessandro Achilli, Anna Olivieri, Marco Pellecchia, Cristina Ubaldi, Licia Colli, Nadia Al-Zahery, Matteo Accetturo, Maria Pala, Baharak Hooshier Kashani, Ugo A. Perego, Vincenza Battaglia, Simona Fornarino, Javad Kalamati, Massoud Houshmand, Riccardo Negrini, Ornella Semino, Martin Richards, Vincent Macaulay, Luca Ferretti, and Hans-Jurgen Bandelt. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Current Biology*, 18(4):157–158, 2008.

Antônio Alberto Neves de Alcochete. *Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termosensível (TGMS) do genoma de arroz (Oryza sativa L.)*. PhD thesis, Universidade de Brasília, 2005.

Paulo António Russo Almeida. *Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA - microssatélites: perspectiva de conservação*. PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2007.

Virgílio Alves. Evolução Filogenética dos Bovinos Autóctones Portugueses. In *II Jornadas Técnicas de Raças Bovinas Autóctones*, page 13, 2004.

Anónimo. Primeiro Relatório de Portugal a submeter à Conferência das Partes da Convenção sobre a Diversidade Biológica. Technical report, Ministério do Ambiente, Lisboa, Portugal, 1998. Coordenação técnica: Instituto da Conservação da Natureza.

Anónimo. REGULAMENTO (CE) N.º 870/2004 DO CONSELHO de 24 de Abril de 2004 que estabelece um programa comunitário de conservação, caracterização, recolha e utilização dos recursos genéticos na agricultura e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1467/04. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 162:18–28, 2004.

Jonh C. Avise. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, 1994.

- R. Baumung and J. Sölkner. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. *Genetic Selection and Evolution*, 35:369–383, 2003.
- P. J. Boettcher, M. Tixier-Boichard, M. A. Toro, H. Simianer, H. Eding, and Consortium Globaldiv. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41(1):64–77, 2010. ISSN 0268-9146. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02050.x.
- D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32(3):314–331, May 1980.
- AM Bowcock, A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, JR Kidd, and L.L. Cavalli-Sforza. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368(6470):455–457, 1994.
- J. Cañón, D. García, J. V. Delgado, S. Dunner, L. Telo da Gama, V. Landi, I. Martín-Burriel, A. Martínez, C. Penedo, C. Rodellar, P. Zaragoza, and C. Ginja. Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle. *Animal*, 5(9):1323–1334, 2011.
- T. X. Carneiro, E. C. Gonçalves, M. P. C. Schneider, and A. Silva. Diversidade Genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:1257–1262, 2007.
- I. M. B. S. M. Carvalho. Caracterização Genética de Raças Bovinas Autóctones Portuguesas. Master’s thesis, Universidade do Porto, 2000.
- Teresa M. Correia. *Estudo da variabilidade e relações genéticas em raças caprinas autóctones mediante microssatélites*. PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2004.
- A. C. Costa, O. Uffo, A. Sanz, R. Ronda, R. Osta, C. Rodellar, I. Martin-Burriel, and P. Zaragoza. Genetic diversity and differentiation of five cuban cattle breeds using 30 microsattelite loci. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, pages 1–8, 2012.
- Jack C. M. Dekkers, John P Gibson, Piter Bijma, and Johan A.M.van Arendonk. Design and optimisation of animal breeding programmes. In *Lecture notes*, 2004.
- DGV, DRABI, INIA/EZN, and ACRIGUARDA. Caracaterização Morfológica da População Bovina Jarmelista, 2006.



- Andréa Alves Egito. *Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: Subsídios para a conservação*. PhD thesis, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- FAO. Biodiversity for food and agriculture: farm animal genetic resources. Technical report, FAO, 1998. URL <http://www.fao.org/sd/epidirect/epre0042.htm>.
- FAO. *The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999.
- FAO. *Situação Mundial dos Recursos Genéticos Animais Para Agricultura e Alimentação*. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 2007.
- L. T. Gama and N. Carolino. Demographic analysis of the Alentejana breed of cattle. In *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, 19-23 August 2002.
- Catarina Ginja, Luís Telo Da Gama, and Maria Cecilia T Penedo. Analysis of STR markers reveals high genetic structure in Portuguese native cattle. *J Hered*, 101(2):201–210, 2010a. doi: 10.1093/jhered/esp104. URL <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esp104>.
- Catarina Ginja, Maria Ct Penedo, Maria F Sobral, José Matos, Carla Borges, Dina Neves, Teresa Rangel-Figueiredo, and Alfredo Cravador. Molecular genetic analysis of a cattle population to reconstitute the extinct Algarvia breed. *Genet Sel Evol*, 42:18, 2010b. doi: 10.1186/1297-9686-42-18. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9686-42-18>.
- Catarina Jorge Ginja. *Influência das raças bovinas Ibéricas na estrutura genética das populações de bovinos Crioulos da América Latina*. PhD thesis, Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, 2009.
- J. Goudet. hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1):184–186, 2005.
- D.H. Huson and D. Bryant. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2):254–267, 2006.
- T. Jombart and I. Ahmed. adegenet 1.3-5: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/btr521.

- J. Jordana, P. Alexandrino, A. Beja-Pereira, I. Bessa, J. Canon, Y. Carretero, S. Dunner, D. Laloe, K. Moazami-Goudarzi, A. Sanchez, and N. Ferrand. Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120:73–87, 2003. doi: 10.1046/j.1439-0388.2003.00384.x.
- G. Laval, N. Iannuccelli, C. Legault, D. Milan, M. A. Groenen, E. Giuffra, L. Andersson, P. H. Nissen, C. B. Jørgensen, P. Beeckmann, H. Geldermann, J. L. Foulley, C. Chevalet, and L. Ollivier. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet Sel Evol*, 32(2):187–203, 2000. doi: 10.1051/gse:2000113. URL <http://dx.doi.org/10.1051/gse:2000113>.
- Carla Sofia Rodrigues Leal. Caracterização Genética da Raça Bovina Barrosã. Master’s thesis, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1998.
- Paula Lopes. *Estudos moleculares da genética da tolerância ao alumínio em trigos*. PhD thesis, Universidade do Minho e Trás-os-Montes, 1999.
- S. Lopes, N. Ferrand, and R. Godinho. Estudo da diversidade e estruturação genética das populações de lobo (*Canis lupus*) em Portugal. Technical report, CIBIO/UP, 2007.
- MADRP. Portaria nº 618/2008 de 14 de Julho, Julho 2008.
- J. C. Mateus, H. Eding, M. C T Penedo, and M. T. Rangel-Figueiredo. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Anim Genet*, 35(4):305–313, Aug 2004a. doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x>.
- J. C. Mateus, H. Eding, M. C. T. Penedo, and M. T. Rangel-Figueiredo. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Animal Genetics*, 35(4):305–313, 2004b. ISSN 1365-2052. doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x>.
- JC Mateus, MCT Penedo, VC Alves, M. Ramos, and T. Rangel-Figueiredo. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*, 35(2):106–113, 2004c.

- C. Maudet, G. Luikart, and P. Taberlet. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J Anim Sci*, 80(4):942–950, Apr 2002.
- C. McManus, S. Paiva, P. S. Corrêa, I. Seixas, and C. B. de Melo. Estatísticas para descrever a genética de populações. on-line, Janeiro 2011. URL [http://animal.unb.br/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=87&Itemid=68](http://animal.unb.br/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=87&Itemid=68).
- I. Medurogac, Ana Medurogac, I. Russ, C.E. Veit-Kensch, P. Taberlet, B. Luntz, H.M. Mix, and M. Forrester. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular ecology*, 18(16):3394–3410, 2009.
- José Aranguren Méndez, Jordi Jordana, Rosa Avellanet, and Miguel Torrens. Estudio de la variabilidad genética en la raza mallorquina para propósito de conservación. *Revista científica, FCV-LUZ*, 12(5):358–366, 2002.
- M. Nei. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- M. Nei, F. Tajima, and Y. Tatenno. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19(2):153–170, 1983.
- C. Oliveira, B. Gutiérrez-Gil, S. Pedrosa, E. Barbosa, R. Dantas, J. V. Leite, N. V. Brito, J. J. Arranz, and Y. Bayón. Caracterização genética das raças ovinas Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela: DNA nuclear e mitocondrial. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100:175–180, 2005.
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- J. Ramljak, A. Ivanković, CE Veit-Kensch, M. Förster, and I. Medugorac. Analysis of genetic and cultural conservation value of three indigenous Croatian cattle breeds in a local and global context. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128:73–84, 2011.
- M. T. Rangel, P. Russo, J. C. Carlos, V. Alves, J. Matos, and A. Martins. Biologia molecular e ciência animal: uma combinação prometedora. In *I JORNADAS*

*CIENTÍFICAS CENTRO DE CIÊNCIA ANIMAL E VETERINÁRIA*, Vila Real, Portugal, Março 2007. CECAV.

Inês Madeira Satar. CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM ESPÉCIES DE AMBIENTES HUMANIZADOS. Master's thesis, UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2009.

Fernando Ruivo Sousa and Luciano García Sánchez. *Mirandesa*. Associação dos Criadores de Bovinos de Raça Mirandesa, 2009.

Álvaro Spritze, Andréa Alves de Egito, Arthur da Silva Mariante, and Concepta McManus. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(10):1157–1164, 2003.

BS Weir and C.C. Cockerham. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, pages 1358–1370, 1984.

S. Wright. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, pages 395–420, 1965.

## Capítulo 2

# Study of genetic diversity of three Portuguese cattle breeds by 93 microsatellite markers

### Abstract

Portuguese cattle breeds using 93 microsatellites markers. Blood samples were collected from 50 individuals of each breed, and ninety-three microsatellites were analysed to get thorough information about genetic diversity and interrelationships among three Portuguese cattle breeds: Mirandesa (MIR), Maronesa (MAR), and Barrosã (BAR). Estimates of genetic variability, observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ), allelic richness for each locus were determined. The alleles were classified in three classes according to their frequency: common alleles (observed in the three sub-populations), private alleles (alleles observed in one sub-population) and rare alleles (non-private alleles with a frequency  $<0.01$  over the whole population). The number of rare alleles found was 52 in MAR, 33 in MIR, and 30 in BAR. The number of private alleles found was 5 in MIR and BAR, and 2 in MAR. The MIR showed the lowest genetic diversity, and the highest genetic distance to the other two breeds. The three breeds could be considered as genetically distinct populations. This study shows that measures should be taken in order to preserve the genetic diversity of MIR, MAR, and BAR cattle breeds.

**Key-words:** Cattle, Conservation, Genetic diversity, Microsatellites.

## 2.1 Introduction

Considering the animal and plant species used, extensive livestock production systems are highly heterogeneous and contributes to maintain the ecological balance. The European Union (EU), in general, and Portugal, in particular, has interest in the preservation of these production systems since they contributes to reduce environmental pollution, to maintain or increase the biodiversity and to preserve the typical landscape across EU regions. In Portugal, several autochthonous cattle breeds are classified as endangered by the MADRP (2008). In general, they present a good adaptation to adverse environmental conditions, making these breeds particularly suited for the extensive productions systems.

EU consumers are, also, sensitive to the management practices that improves the welfare of livestock animals, and are willing to pay more for these certified animal products. Thus, these high quality products may contribute to the preservation of the rural world and its diversity as well as to increase the profitability of the extensive production systems, which can contribute to the conservation of autochthonous breeds endangered.

Traits, genotypes and alleles with possible economic interest are at risk of being lost (Mateus et al., 2004b). But, genetic diversity is the basis for the sustained ability of a breed to respond to selection programs, for adaptation to environmental changes, like: climate, diseases, management and husbandry practices (Boettcher et al., 2010). Livestock breeds with small population size are prone to a rapid increase of the inbreeding coefficient, and to losses of genetic diversity, which at long term is the primary key to the survival of animal populations. The reduction of fitness of the populations due to the inbreeding depression effects is well known, and a severe reduction of the populations size (genetic bottleneck) increases the risk genes loses. Thus, the conservation of endangered livestock breeds relies on the conservation of their genetic diversity, and at the initial stage of conservation plan the rate of inbreeding should be minimised (Baumung and Sölkner, 2003) to avoid the losses of genetic variability gained during the breeds differentiation process (Cañón et al., 2011). According to FAO (2007) those livestock breeds classified as endangered should be included in conservation programs, in order to preserve their adaptation characteristics, value for food and agriculture, and because of their cultural and historical value (Ramljak et al., 2011).

Several studies (Jordana et al., 2003; Mateus et al., 2004a;c) have been conducted to study the genetic diversity of Portuguese cattle breeds, however those studies were based in 16 to 30 microsatellite markers. Thus, the objectives of this work were to

assess the genetic diversity of within and between three autochthonous Portuguese cattle breeds using 93 microsatellites markers.

## **2.2 Material e methods**

### **2.2.1 Samples and microsatellite markers**

Blood samples from 131 adult animals were collected, and the animals were selected using the pedigree information in order to ensure that animals were not closely related. This study was conducted with three Portuguese cattle breeds: Mirandesa (MIR, <http://www.mirandesa.pt/>), Barrosã (BAR, <http://www.carnebarrosa.com/>) and Maronesa (MAR, <http://www.marones.pt/>); bred at north of Portugal. These breeds where selected because of their geographical proximity, and because of their importance for high quality meat production which is protected by Protection Designation of Origin (PDO).

A total of 93 microsatellite markers previously described by Ramljak et al. (2011) (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0388.2010.00905.x/>) were analysed to estimate several parameters of genetic diversity. These loci were recommended by the International Society of Animal Genetics (ISAG)-FAO for the analysis of genetic diversity in cattle breeds (FAO- ISAG 2004).

### **2.2.2 DNA extraction and microsatellite analyses**

The genomic DNA was extracted using the QIAamp Blood-Kits (Qiagen) protocols. The summary information concerning the 93 microsatellites markers can be checked at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0388.2010.00905.x/supinfo>. The PCR products were analysed on ABI377 and ABI310 DNA Sequencers (Applied Biosystems) at the Animal Genetics and Husbandry laboratory of the Ludwig-Maximilians-University Munich. Genotypes were assigned using GENESCAN ANALYSIS 3.7 NT (Applied Bio-systems) and GENOTYPER 3.7 (Applied Biosystems). To ensure the accuracy of genotyping, all animals, including international control samples (as declared by the European Cattle Genetic Diversity Consortium), were genotyped twice in two independent courses.

### **2.2.3 Statistical analysis**

The adegenet package (Jombart and Ahmed, 2012) from the R software (R Development Core Team, 2011) was used to calculate the allele frequencies, the mean

number of alleles per locus and breed, the Nei's genetic distance (Nei, 1987, DA), the observed ( $H_o$ ) and expected ( $H_e$ ) heterozygosities. The Fisher's exact test, with standard Bonferroni corrections, was used check for the deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ( $HWE$ ) .

The Wright F-statistics ( $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ , and  $F_{IS}$ ; Weir and Cockerham, 1984), were calculated for each locus and across breeds using hierfstat package (Goudet, 2005) and the population pairwise  $F_{ST}$  was computed using adegenet package (Jombart and Ahmed, 2012) from the the R software (R Development Core Team, 2011)

The alleles were classified in three categories according to their frequency: common alleles ( $cA$ ), observed in all 3 sub-populations; private alleles ( $pA$ ) alleles observed in one sub-population; and rare alleles ( $rA$ ) non-private alleles with a frequency  $<0.01$  over the whole population.

## 2.3 Results and discussion

### 2.3.1 Overall genetic variability

Across the 93 microsatellite loci, a total of 554 alleles were detected for BAR, 465 for MIR, and 578 for MAR breed. The number of alleles at the 93 microsatellite loci are shown in Figure 2.1, and ranged from 3 (L01) to 18 (L75). The mean number of alleles per locus was 6.22 for MAR, 5.96 for BAR, 5.00 for MIR, and the number of private alleles occurred at very low frequencies ( $<0.011$ ) for the three breeds. These results are in accordance with those presented by Medurogac et al. (2009) and Ramljak et al. (2011) in studies with Central European cattle breeds and by Costa et al. (2012) in a study with Cuban cattle breeds.

Across breeds, the expected heterozygosity varied from 0.122 (L01) to 0.882 (L75), and the observed heterozygosity ranged from 0.113 (L01) to 0.781 (L57). The mean observed heterozygosity was lower ( $P<0.001$ ) than the mean expected heterozygosity as can be observed from the Figure 2.2.



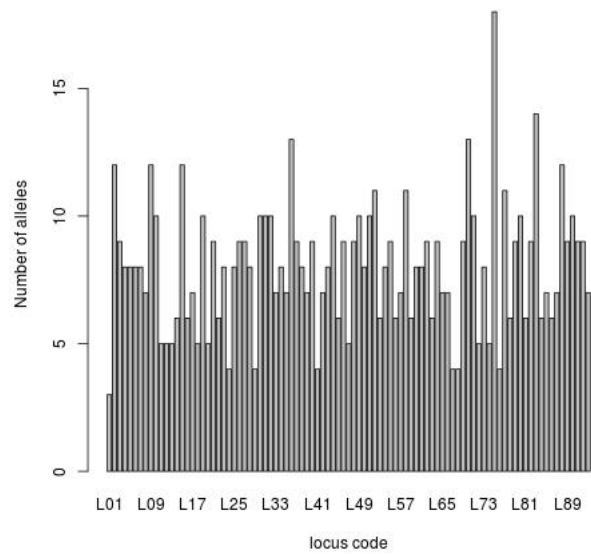


Figure 2.1: Alleles number per locus at the 93 microsatellite loci

The overall loci estimates of inbreeding, evaluated by the  $F_{IS}$  statistic, showed that the three cattle breeds presents a reduced heterozygosity due to within population inbreeding ( $F_{IS} = 0.0724$ ). The breed differentiation, evaluated by the  $F_{ST}$  statistic (0.0988), indicates that only 9.88% of the total genetic variation can be attributed to differences among the cattle populations. Thus, 90,12% of the genetic variability can be attributed to the individuals within the populations.

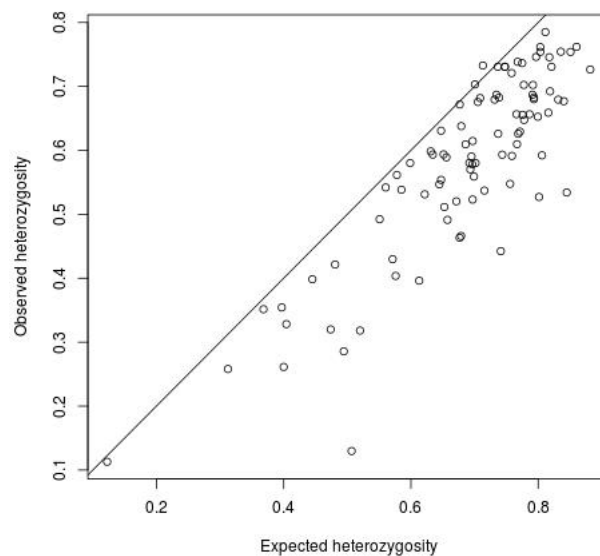


Figure 2.2: Observed versus expected heterozigosity for the 93 microsatellite loci

### 2.3.2 Genetic diversity within breeds

The within-breed genetic variability measures are presented in Table 2.1. The mean number of alleles per locus was 6.22 for MIR, 5.96 for BAR, and 5.00 for MIR, which is lower than the mean of the three breeds. The MAR breed presented the higher number of total (578) and rare (52) alleles, and the number of private alleles were low for all three breeds (5 for MAR and MIR, and 2 for MAR). These allele richness indicators are lower than those reported by Ginja et al. (2010a) in a study with 13 Portuguese cattle breeds with 39 microsatellite markers. However, our results are in line with those presented by Medurogac et al. (2009) and Ramljak et al. (2011) for Central Europe cattle breeds and by Costa et al. (2012) for Cuban cattle breeds.

Table 2.1: Genetic variability at the 93 microsatellites loci for the three breeds studied.

breed	$mA$	$tA$	$rA$	$pA$	$He$	$Ho$
BAR	5.96	554	30	5	0.64	0.60
MAR	6.22	578	52	2	0.64	0.54
MIR	5.00	465	33	5	0.56	0.49
Mean	5.72	532.3	38.3	4	0.62	0.54

$mA$  = mean number of alleles;  $tA$  = total number of alleles;  $rA$  = number of rare alleles;  $pA$  = number of private alleles;  $He$  = mean expected heterozygosity (unbiased estimate Nei, 1987);  $Ho$  = mean observed heterozygosity.

The MAR presented the highest ( $Ho = 0.60$  and  $He = 0.64$ ) genetic diversity, and the MIR breed presented the lowest ( $Ho = 0.49$  and  $He = 0.56$ ) genetic diversity. These results corroborates those attained by Mateus et al. (2004c) and Ginja et al. (2010a), where the MIR also presented the lowest heterozygosity among all Portuguese cattle breeds. The three breeds presented  $Ho$  lower ( $P < 0.001$ ) than the  $He$  (Figure 2.3), and the exact test for  $HWE$  within breed showed a deviation ( $P < 0.001$ ) from the equilibrium. This observation is common in domestic animal populations (Costa et al., 2012), and the reduction in the heterozygosity can have several causes: selection against heterozygous animals (Wahlund effect) and inbreeding effects (Maudet et al., 2002).

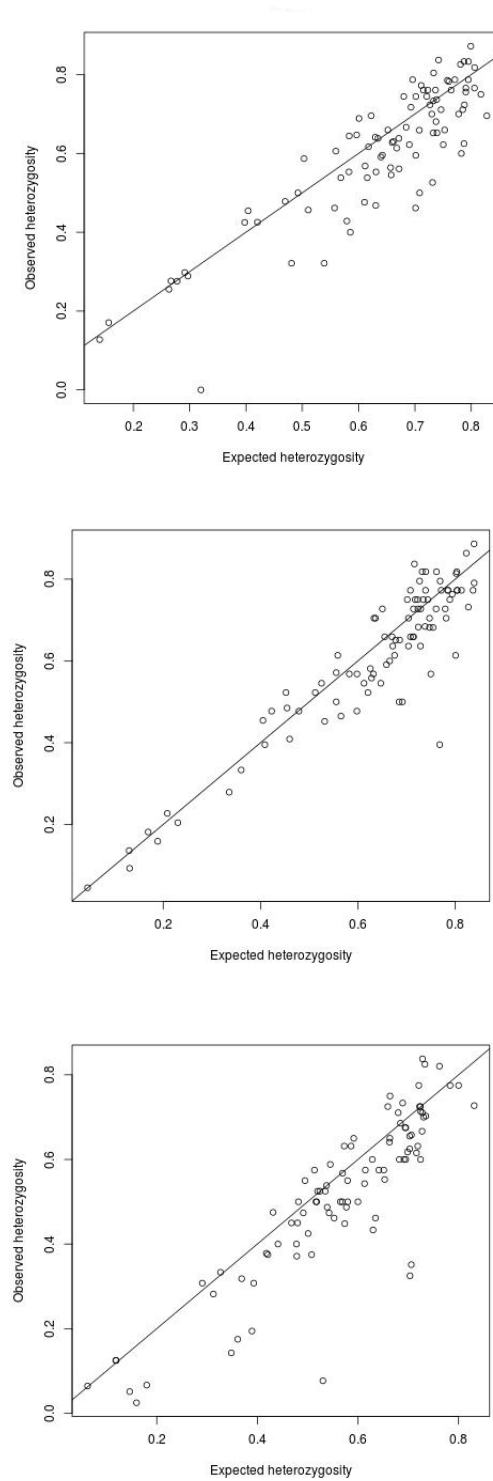


Figure 2.3: Expected versus observed heterozygosity for the three breeds studied

Figure 2.4 shows the frequency distributions of the inbreeding coefficient for three cattle breeds. The mean and median individual inbreeding coefficient for the analysed samples was 12.2 and 10.4% for MIR, 10.1 and 8.1% for MAR, and 10.7 and 6.96 for BAR. These results are in line with the results for heterozygosity. The

inbreeding, produced by mating between relatives, is one of the causes for the losses of heterozygosity (Nei, 1987).

Populations under random mating, the genes are equally related within and between individuals, and the  $F_{ST} = F_{IT} = 0$ . Estimates of  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$  that differ significantly indicate departures from random mating. In our study, both,  $F_{ST}$  and  $F_{IT}$  are positive ( $F_{ST} = 0.131$  and  $F_{IT} = 0.219$ ), thus we can assume that differences in the allele frequencies may be attributed to the effects of random genetic drift. Thus, the genetic differentiation (9.88%) can be attributed to an increase in the mean inbreeding coefficient.

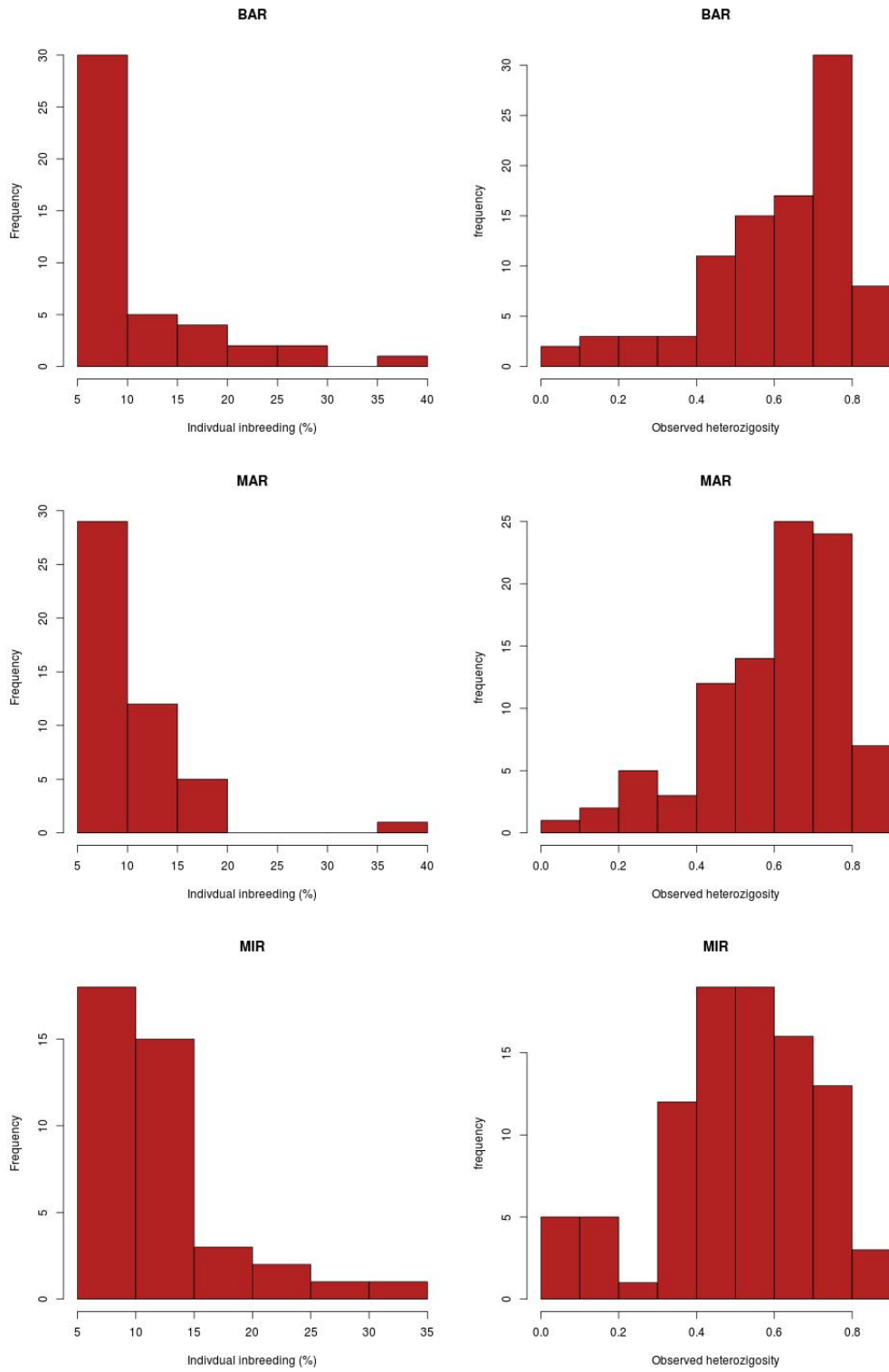


Figure 2.4: Frequency distributions of the individual inbreeding coefficient and heterozygosity for three cattle breeds

### 2.3.3 Breeds interrelationships

Pairwise estimates of genetic differentiation ( $F_{ST}$ ) and Nei's genetic distance ( $DA$ ) among the three cattle breeds are shown in Table 2.2. The estimates of pairwise  $F_{ST}$  were all significant ( $p < 0.01$ ), thus indicates that the three breeds can be considered genetically independent (Figure 2.5). The Nei's genetic distance presented the highest values among MIR and BAR (0.477) and MIR and MAR (0.466).

Table 2.2: Pairwise estimates of  $F_{ST}$  below the diagonal, and Nei's genetic distance ( $DA$ ) above the diagonal

Breed	BAR	MIR	MAR
BAR		0.477	0.345
MIR	0,175		0.466
MAR	0,09	0,157	

A principal components analysis, based on Nei's genetic distances, corroborates these results, showing that all three breeds are genetically independent (Figure 2.5). Thus, Both MAR and BAR are genetically well differentiated from MIR ( $F_{ST} = 0.157$  and  $0.175$ , respectively), and this clear genetic differentiation of MIR can be attributed to the occurrence of a strong genetic bottleneck. This evidence of a strong genetic subdivision (see  $F_{ST}$  values) between MIR and both MAR and BAR corroborates the results attained by Ginja et al. (2010a), that showed that MIR presented the higher genetic differentiation among all Portuguese cattle breeds. This results for MIR can be attributed to the increase of the inbreeding coefficient, in a short period of time, as stated by Laval et al. (2000). It is well known that populations subjected to genetic bottleneck lead to an increase of the genetic distance, distorting the topology of the evolution trees (Nei et al., 1983; Nei, 1987).

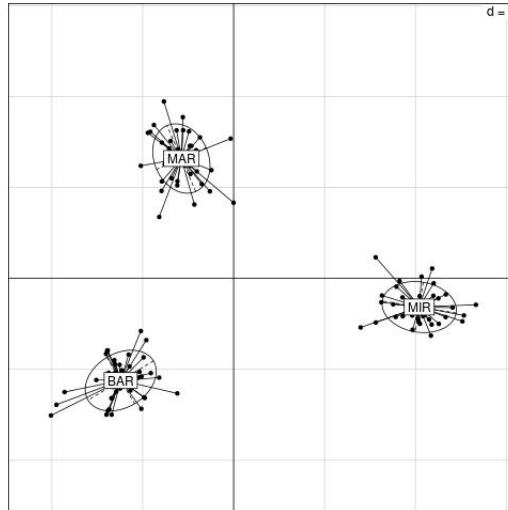


Figure 2.5: Principal components analysis of the Nei's genetic distance for the three cattle breeds

## 2.4 Conclusions

The present study showed that a significant amount of genetic variation is maintained in the three cattle populations. The three breeds could be considered as distinct genetic populations, however the MIR is the more genetically distance from both MAR and BAR. The MIR maintains an important genetic isolation from MAR and BAR. Populations with small effective size, needs breeding programs properly managed to avoid the losses of genetic diversity. Thus, accurate pedigree records are essential to define matings among individuals in order to minimize the increase of the inbreeding coefficient. Finally, it is clear that conservation measures should be developed to minimize the inbreeding in these three cattle breeds.

# Bibliografia

ACBRM. Mirandesa: A raça e a carne, 2012. URL <http://www.mirandesa.pt>.

Alessandro Achilli, Anna Olivieri, Marco Pellecchia, Cristina Ubaldi, Licia Colli, Nadia Al-Zahery, Matteo Accetturo, Maria Pala, Baharak Hooshier Kashani, Ugo A. Perego, Vincenza Battaglia, Simona Fornarino, Javad Kalamati, Massoud Houshmand, Riccardo Negrini, Ornella Semino, Martin Richards, Vincent Macaulay, Luca Ferretti, and Hans-Jurgen Bandelt. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Current Biology*, 18(4):157–158, 2008.

Antônio Alberto Neves de Alcochete. *Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termosensível (TGMS) do genoma de arroz (Oryza sativa L.)*. PhD thesis, Universidade de Brasília, 2005.

Paulo António Russo Almeida. *Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA - microssatélites: perspectiva de conservação*. PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2007.

Virgílio Alves. Evolução Filogenética dos Bovinos Autóctones Portugueses. In *II Jornadas Técnicas de Raças Bovinas Autóctones*, page 13, 2004.

Anónimo. Primeiro Relatório de Portugal a submeter à Conferência das Partes da Convenção sobre a Diversidade Biológica. Technical report, Ministério do Ambiente, Lisboa, Portugal, 1998. Coordenação técnica: Instituto da Conservação da Natureza.

Anónimo. REGULAMENTO (CE) N.º 870/2004 DO CONSELHO de 24 de Abril de 2004 que estabelece um programa comunitário de conservação, caracterização, recolha e utilização dos recursos genéticos na agricultura e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1467/04. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 162:18–28, 2004.

Jonh C. Avise. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, 1994.



- R. Baumung and J. Sölkner. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. *Genetic Selection and Evolution*, 35:369–383, 2003.
- P. J. Boettcher, M. Tixier-Boichard, M. A. Toro, H. Simianer, H. Eding, and Consortium Globaldiv. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41(1):64–77, 2010. ISSN 0268-9146. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02050.x.
- D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32(3):314–331, May 1980.
- AM Bowcock, A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, JR Kidd, and L.L. Cavalli-Sforza. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368(6470):455–457, 1994.
- J. Cañón, D. García, J. V. Delgado, S. Dunner, L. Telo da Gama, V. Landi, I. Martín-Burriel, A. Martínez, C. Penedo, C. Rodellar, P. Zaragoza, and C. Ginja. Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle. *Animal*, 5(9):1323–1334, 2011.
- T. X. Carneiro, E. C. Gonçalves, M. P. C. Schneider, and A. Silva. Diversidade Genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:1257–1262, 2007.
- I. M. B. S. M. Carvalho. Caracterização Genética de Raças Bovinas Autóctones Portuguesas. Master’s thesis, Universidade do Porto, 2000.
- Teresa M. Correia. *Estudo da variabilidade e relações genéticas em raças caprinas autóctones mediante microssatélites*. PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2004.
- A. C. Costa, O. Uffo, A. Sanz, R. Ronda, R. Osta, C. Rodellar, I. Martin-Burriel, and P. Zaragoza. Genetic diversity and differentiation of five cuban cattle breeds using 30 microsattelite loci. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, pages 1–8, 2012.
- Jack C. M. Dekkers, John P Gibson, Piter Bijma, and Johan A.M.van Arendonk. Design and optimisation of animal breeding programmes. In *Lecture notes*, 2004.
- DGV, DRABI, INIA/EZN, and ACRIGUARDA. Caracaterização Morfológica da População Bovina Jarmelista, 2006.

- Andréa Alves Egito. *Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: Subsídios para a conservação*. PhD thesis, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- FAO. Biodiversity for food and agriculture: farm animal genetic resources. Technical report, FAO, 1998. URL <http://www.fao.org/sd/epidirect/epre0042.htm>.
- FAO. *The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999.
- FAO. *Situação Mundial dos Recursos Genéticos Animais Para Agricultura e Alimentação*. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 2007.
- L. T. Gama and N. Carolino. Demographic analysis of the Alentejana breed of cattle. In *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, 19-23 August 2002.
- Catarina Ginja, Luís Telo Da Gama, and Maria Cecilia T Penedo. Analysis of STR markers reveals high genetic structure in Portuguese native cattle. *J Hered*, 101(2):201–210, 2010a. doi: 10.1093/jhered/esp104. URL <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esp104>.
- Catarina Ginja, Maria Ct Penedo, Maria F Sobral, José Matos, Carla Borges, Dina Neves, Teresa Rangel-Figueiredo, and Alfredo Cravador. Molecular genetic analysis of a cattle population to reconstitute the extinct Algarvia breed. *Genet Sel Evol*, 42:18, 2010b. doi: 10.1186/1297-9686-42-18. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9686-42-18>.
- Catarina Jorge Ginja. *Influência das raças bovinas Ibéricas na estrutura genética das populações de bovinos Crioulos da América Latina*. PhD thesis, Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, 2009.
- J. Goudet. hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1):184–186, 2005.
- D.H. Huson and D. Bryant. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2):254–267, 2006.
- T. Jombart and I. Ahmed. adegenet 1.3-5: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/btr521.

- J. Jordana, P. Alexandrino, A. Beja-Pereira, I. Bessa, J. Canon, Y. Carretero, S. Dunner, D. Laloe, K. Moazami-Goudarzi, A. Sanchez, and N. Ferrand. Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120:73–87, 2003. doi: 10.1046/j.1439-0388.2003.00384.x.
- G. Laval, N. Iannuccelli, C. Legault, D. Milan, M. A. Groenen, E. Giuffra, L. Andersson, P. H. Nissen, C. B. Jørgensen, P. Beeckmann, H. Geldermann, J. L. Foulley, C. Chevalet, and L. Ollivier. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet Sel Evol*, 32(2):187–203, 2000. doi: 10.1051/gse:2000113. URL <http://dx.doi.org/10.1051/gse:2000113>.
- Carla Sofia Rodrigues Leal. Caracterização Genética da Raça Bovina Barrosã. Master’s thesis, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1998.
- Paula Lopes. *Estudos moleculares da genética da tolerância ao alumínio em trigos*. PhD thesis, Universidade do Minho e Trás-os-Montes, 1999.
- S. Lopes, N. Ferrand, and R. Godinho. Estudo da diversidade e estruturação genética das populações de lobo (*Canis lupus*) em Portugal. Technical report, CIBIO/UP, 2007.
- MADRP. Portaria nº 618/2008 de 14 de Julho, Julho 2008.
- J. C. Mateus, H. Eding, M. C T Penedo, and M. T. Rangel-Figueiredo. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Anim Genet*, 35(4):305–313, Aug 2004a. doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x>.
- J. C. Mateus, H. Eding, M. C. T. Penedo, and M. T. Rangel-Figueiredo. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Animal Genetics*, 35(4):305–313, 2004b. ISSN 1365-2052. doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x>.
- JC Mateus, MCT Penedo, VC Alves, M. Ramos, and T. Rangel-Figueiredo. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*, 35(2):106–113, 2004c.

- C. Maudet, G. Luikart, and P. Taberlet. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J Anim Sci*, 80(4):942–950, Apr 2002.
- C. McManus, S. Paiva, P. S. Corrêa, I. Seixas, and C. B. de Melo. Estatísticas para descrever a genética de populações. on-line, Janeiro 2011. URL [http://animal.unb.br/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=87&Itemid=68](http://animal.unb.br/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=87&Itemid=68).
- I. Medurogac, Ana Medurogac, I. Russ, C.E. Veit-Kensch, P. Taberlet, B. Luntz, H.M. Mix, and M. Forrester. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular ecology*, 18(16):3394–3410, 2009.
- José Aranguren Méndez, Jordi Jordana, Rosa Avellanet, and Miguel Torrens. Estudio de la variabilidad genética en la raza mallorquina para propósito de conservación. *Revista científica, FCV-LUZ*, 12(5):358–366, 2002.
- M. Nei. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- M. Nei, F. Tajima, and Y. Tatenno. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19(2):153–170, 1983.
- C. Oliveira, B. Gutiérrez-Gil, S. Pedrosa, E. Barbosa, R. Dantas, J. V. Leite, N. V. Brito, J. J. Arranz, and Y. Bayón. Caracterização genética das raças ovinas Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela: DNA nuclear e mitocondrial. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100:175–180, 2005.
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- J. Ramljak, A. Ivanković, CE Veit-Kensch, M. Förster, and I. Medugorac. Analysis of genetic and cultural conservation value of three indigenous Croatian cattle breeds in a local and global context. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128:73–84, 2011.
- M. T. Rangel, P. Russo, J. C. Carlos, V. Alves, J. Matos, and A. Martins. Biologia molecular e ciência animal: uma combinação prometedora. In *I JORNADAS*

*CIENTÍFICAS CENTRO DE CIÊNCIA ANIMAL E VETERINÁRIA*, Vila Real, Portugal, Março 2007. CECAV.

Inês Madeira Satar. CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM ESPÉCIES DE AMBIENTES HUMANIZADOS. Master's thesis, UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2009.

Fernando Ruivo Sousa and Luciano García Sánchez. *Mirandesa*. Associação dos Criadores de Bovinos de Raça Mirandesa, 2009.

Álvaro Spritze, Andréa Alves de Egito, Arthur da Silva Mariante, and Concepta McManus. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(10):1157–1164, 2003.

BS Weir and C.C. Cockerham. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, pages 1358–1370, 1984.

S. Wright. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, pages 395–420, 1965.

## Capítulo 3

# Comparação da diversidade genética de três raças bovinas Portuguesas com outras raças europeias

### Resumo

O objectivo deste trabalho foi estudar a variabilidade genética de três raças de bovinos Portuguesas: Mirandesa, Maronesa e Barrosã. Durante o ano de 2010, foram colhidas amostras de sangue de 50 indivíduos de cada uma das três raças. Estas amostras foram analisadas para 93 microssatélites para obter informação relativa à diversidade genética e à estrutura da populações. Neste estudo foram, também, incluídos dados referentes a 19 raças, genotipadas para os mesmos marcadores, provenientes de várias regiões europeias, nomeadamente: Anatólia, Balkans, Alpes e noroeste europeu. O software fstat v.2.9.3. foi utilizado para calcular, para cada um dos locus estudados, os parâmetros de variabilidade genética: heterozigotia esperada ( $H_e$ ), heterozigotia observada ( $H_o$ ) e riqueza alélica. Os alelos foram classificados, de acordo com a sua frequência, em três categorias: alelos comuns (observados nas 21 sub-populações), alelos privados (observados apenas numa sub-população, alelos raros (alelos não privados com frequência inferior a  $<0,01$  na população total). O número médio de alelos por locus foi de 6,72. Para todos os loci, a  $H_o$  média foi de 0,64, a  $H_e$  média foi de 0,6 e a RA média foi de 58,5 alelos. Nas raças Portuguesas, o número de alelos raros foi de 30, 52 e 33, para a Barrosã, Maronesa, Mirandesa, respectivamente; e o número de alelos privados foi de 5 na Mirandesa e Barrosã e 2 na Maronesa. No geral, a raças portuguesas, quando comparadas com as raças autóctones de outras regiões europeias, apresentam uma menor variabili-

dade genética. Das raças Portuguesas, a raça Mirandesa apresentou maior distância genética relativamente às raças Maronesa e Barrosã, pelo que constitui um grupo genético distinto.

**Palavras chave:** Bovinos, Conservação, Diversidade genética, Microsatélites.

### 3.1 Introdução

O desenvolvimento da produção animal intensiva, baseada num reduzido número de raças especializadas e melhoradas, conduziu um elevado número de outras raças, consideradas adaptadas ou menos produtivas, ao risco de desaparecimento, pelo que se pode traduzir numa ameaça à variabilidade genética (Correia, 2004; Rangel et al., 2007). Assim, a preservação dos recursos genéticos animais baseia-se na conservação da variabilidade genética das populações, pois esta é fundamental para garantir a sua viabilidade (Méndez et al., 2002).

Raças que hoje são raras e aparentemente sem interesse para os produtores, devido à sua baixa produtividade dentro dos sistemas de produção actuais, podem possuir características únicas que no futuro, se poderão revelar de elevado interesse Correia (2004). Desta forma, nos últimos anos vários esforços tanto a nível nacional como internacional, têm sido levados a cabo para caracterizar as raças autóctones ameaçadas de extinção (Dekkers et al., 2004). De facto, as raças autóctones constituem um património genético único e insubstituível, pelo que devem ser preservadas pois de acordo com Gama and Carolino (2002) são vectores prioritários do desenvolvimento rural integrado.

A redução dos efectivos tem como consequências da deriva genética, a perda de variabilidade genética acumulada durante o processo da diferenciação das raças (Cañón et al., 2011). Desta forma, é essencial tomar medidas de conservação, bem direccionadas, para lidar com as ameaças que pairam sobre as raças autóctones minoritárias, de forma priorizar e proteger estes recursos genéticos FAO (2007). As raças identificadas como estando em situação de risco são candidatas à inclusão em programas de conservação. As decisões podem ser tomadas com base nas distâncias genéticas, nas características de adaptação, no valor relativo para a alimentação e para agricultura, ou ainda com base no seu valor histórico e/ou cultural (FAO, 2007).

Este trabalho teve como objectivo estudar e comparar a diversidade genética, com base em micro-satélites, de três raças de bovinos portuguesas: Mirandesa (MIR), Barrosã (BAR) e Maronesa (MAR). A disponibilidade de informação rel-

ativa a 19 raças de bovinos europeias permitiu também, comparar as três raças portuguesas com bovinos oriundos das regiões: Anatólia, Balkans, Alpes e Noroeste Europeu.

## **3.2 Material e métodos**

### **3.2.1 Raças estudadas**

Neste trabalho foram estudadas três (3) raças de bovinos autóctones portuguesas: a Mirandesa (MIR ), a Barrosã (BAR ) e a Maronesa (MAR ), conjuntamente com dezasseis (16) raças europeias estudadas por Medurogac et al. (2009) e três (3) raças croatas estudadas por Ramljak et al. (2011). Na Tabela 3.1 apresentam-se o nome das raças, o código atribuído, a aptidão, o local de origem e o número final de amostras.

### **3.2.2 Amostras biológicas**

Durante o ano de 2008, recolheram-se amostras de sangue de 50 animais, de cada uma das três raças de bovinos autóctones portuguesas, não aparentados e registados nos respectivos livros genealógicos das respectivas raças. Previamente à colheita de sangue, os animais foram escolhidos, com base na análise do pedigree de cada um dos animais, de forma a garantir (com base na informação disponível) que a amostra era exclusivamente constituída por animais não aparentados. Este procedimento visou maximizar a representatividade das amostras dentro de cada uma das três raças estudadas.

### **3.2.3 Análise de microssatélites**

O DNA genómico foi extraído por protocolos padrão baseados na precipitação por etanol, tal como descrito por Medurogac et al. (2009). As regiões de 93 microssatélites descritos por Ramljak et al. (2011), podem ser consultados em <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0388.2010.00905.x/supinfo>, foram amplificadas por reacção em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciados com sequenciadores ABI377 e ABI310 (Applied Biosystems). Destes, 30 microssatélites são recomendados pela International Society for Animal Genetics (ISAG ; <http://www.isag.us/index.asp?autotry=true&ULnotkn=true>) e pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO ; <http://dad.fao.org/>) para estudos de diversidade genética de bovinos.



Table 3.1: Nome das raças, código atribuído, aptidão, local de origem e número de final das amostras

Raça	Código	Aptidão	Origem das amostras	N
Anatolian Black	ABB	leite-carne(-trabalho)	Turquia (Anatolia)	49
Macedonian Buša	MBU	leite-carne(-trabalho)	Macedónia	31
Illyrian Mountain Buša	IMB	leite-carne(-trabalho)	Albania	45
Illyrian Lowland Buša	ILB	leite-carne(-trabalho)	Albania	29
Red Metohian Buša	RMB	leite-carne(-trabalho)	Kosovo	44
Gray Gacko Buša	GGB	leite-carne(-trabalho)	Bósnia-Herzegovina	41
Croatian Buša	HRB	leite-carne(-trabalho)	Croácia	51
Slavonian Syrmian Podolian	HRP	trabalho-carne	Croácia	51
Istrian Cattle	HRI	trabalho-carne(-leite)	Croácia	51
Tyrolean Grauvieh	TGV	leite-carne	Áustria	48
Original Braunvieh	OBV	leite-carne	Alemanha	46
Murnau-Werdenfelser	MWF	leite-carne	Alemanha	53
Austrian Murbodner	AMB	leite-carne	Áustria	47
Franken Gelbvieh	FGV	leite-carne	Alemanha	48
Fleckvieh	FV	leite-carne	Alemanha	55
Tarentaise	TAR	leite-carne	França	39
Red Hostein	RH	leite	Alemanha	50
Blanc-Bleu Belge	BBB	carne	Bélgica	47
Galloway	GLW	carne	Alemanha(Escócia)	47
Barrosã	BAR	carne(-trabalho)	Portugal	44
Maronesa	MAR	carne(-trabalho)	Portugal	47
Mirandesa	MIR	carne(-trabalho)	Portugal	40

A genotipagem foi efectuada utilizando o software GENESCAN ANALYSIS 3.7 NT e o GENOTYPER 3.7 (ambos Applied Biosystems). Para garantir uma genotipagem precisa, todas as amostras foram genotipadas duas vezes em duas corridas independentes tal como descrito por Medurogac et al. (2009). Após uma análise prévia aos dados, os valores extremos foram excluídos da análise através do procedimento descrito por Medurogac et al. (2009).

Os dados previamente publicados por Medurogac et al. (2009), para 16 raças de bovinos europeias, e por Ramljak et al. (2011) para 3 raças de bovinos Croatas, foram também utilizados neste trabalho, pelo que foi possível integrar as três raças autóctones portuguesas num contexto genético europeu.

### 3.2.4 Variabilidade genética

A variabilidade genética foi estudada utilizando a informação dos 93 microssatélites tal como descrito por (Ramljak et al., 2011). Assim, foram calculadas a heterozigotia observada ( $H_o$ ) e a heterozigotia esperada ( $H_e$ ) tal como proposto por Nei (1987). A riqueza alélica (RA) foi calculada de acordo com o proposto por Weir and Cockerham (1984). De acordo com a frequência observada, os alelos foram classificados em três categorias:

- 1) alelos comuns (cA): observados nas 22 sub-populações;
- 2) alelos privados (pA): observados apenas numa sub-população;
- 3) alelos raros (rA): alelos não privados cuja frequência na sub-população é inferior a 0,01.

### 3.2.5 Distâncias genéticas

Para estudar as inter-relações entre as raças e entre os indivíduos dentro das raças, foi utilizada a distância genética ( $d$ ) proposta por Nei (1987), utilizando a informação relativa à proporção de alelos partilhados entre indivíduos dentro das raças e entre raças (Bowcock et al., 1994). Existem vários algoritmos para o cálculo de distâncias genéticas, neste trabalho utilizou-se a distância genética de (Nei, 1987):

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

, com  $I$  igual ao índice de identidade genética, calculado da seguinte forma

$$I = \sum_{i=1}^m (P_{ix}P_{iy}) / [\sum_{i=1}^m P_{ix}^2 \sum P_{iy}^2] \times 0,5$$

onde  $P_{ix}$  é a frequência do alelo  $i$  na população  $X$ ,  $P_{iy}$  é a frequência do alelo  $i$  na população  $Y$  e  $m$  é o número de alelos por locus. O parâmetro  $d$  é uma medida

da diferenciação genética inter-populacional. Se duas populações têm frequências alélicas similares ( $P_{ix} = P_{iy}$ ), então:  $I \approx 1$  e  $d = 0$ . Por outro lado, se duas populações não têm alelos comuns então:  $I \approx 0$  e  $d = 1$ . A representação gráfica das relações genéticas entre as raças foi efectuada com o software SplitsTree4, com o qual foi desenhada uma rede filogenética (Huson and Bryant, 2006).

Foi também calculada a estatística  $FST$ , definida por Wright (1965) como: a probabilidade de alelos idênticos por descendência (de uma população ancestral) serem combinados num zigoto. Desta forma, o  $FST$  é uma medida indirecta do fluxo de genes entre populações.

### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Variabilidade genética

Na Tabela 3.2 apresentamos o número médio de alelos ( $mA$ ), o número total de alelos ( $tA$ ), o número de alelos privados ( $pA$ ), o número de alelos raros ( $rA$ ), a heterozigotia esperada ( $H_e$ ) e a heterozigotia observada ( $H_o$ ). O número médio de alelos ( $mA$ ) por locus, foi de 6,72, com um valor mínimo de 4,85 na raça HRP e um valor máximo 9,74 na raça ABB. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Medurogac et al. (2009) e Ramljak et al. (2011) em raças de bovinos europeias e por Costa et al. (2012) num estudo com raças Cubanas.

Das três raças portuguesas, a Maronesa apresentou um número médio de alelos mais elevado (6,22), seguida pela Barrosã (5,96) e a Mirandesa apresentou o valor mais baixo (5,00), estes resultados ligeiramente inferiores aos encontrados por Ginja et al. (2010a) para estas três raças, num estudo que envolveu todas as raças de bovinos portuguesas. É importante referir que nas raças portuguesas, o número médio de alelos foi inferior à média (6,72 alelos por locus) das 21 raças estudadas. Este padrão foi também, observado para o número total de alelos, o número de alelos raros, o número de alelos privados e para a heterozigotia esperada e observada. De facto, as três raças portuguesas apresentaram heterozigotia esperada inferior à observada, sendo de salientar que a diferença entre estes dois parâmetros foi superior à diferença observada em todas as outras raças incluídas neste estudo.

As três raças portuguesas apresentaram alelos privados (5 na Barrosã, 2 na Maronesa e 5 na Mirandesa), sendo os valores da Barrosã e da Mirandesa muito próximos da média observada na população total. No que diz respeito ao número de alelos raros, o valor médio encontrado, nas raças três raças, foi superior na Maronesa (52); inferior e muito próximo nas raças Mirandesa (33) e Barrosã (30). Estes resul-

tados são similares aos obtidos por Medurogac et al. (2009) , Ramljak et al. (2011) e por Costa et al. (2012).

Table 3.2: Número médio de alelos ( $mA$ ), número total de alelos ( $tA$ ), número de alelos privados ( $pA$ ), número de alelos raros ( $rA$ ), heterozigotia esperada ( $H_e$ ) e heterozigotia observada ( $H_o$ ) nas 21 raças incluídas no estudo, os valores mínimos e máximos encontram-se a negrito

Raça	$mA$	$tA$	$pA$	$rA$	$H_e$	$H_o$
ABB	9,74	906	32	197	0,78	0,71
MBU	7,69	715	8	88	0,74	0,69
IMB	8,17	760	7	92	0,73	0,69
ILB	7,57	704	5	70	0,73	0,67
RMB	8,76	815	14	129	0,75	0,72
GGB	7,61	708	3	70	0,72	0,67
HRB	8,52	792	8	114	0,73	0,65
HRP	4,85	451	2	14	0,58	0,59
HRI	6,82	634	3	47	0,68	0,64
TGV	5,96	554	3	33	0,66	0,65
OBV	6,51	605	2	47	0,68	0,66
MWF	5,69	529	4	30	0,66	0,66
AMB	6,17	574	2	37	0,67	0,66
FGV	6,04	562	3	32	0,64	0,63
FV	6,76	629	3	48	0,67	0,66
TAR	5,85	544	0	21	0,65	0,63
RH	6,20	577	4	38	0,66	0,64
BBB	6,28	584	2	40	0,66	0,62
GLW	5,49	511	2	25	0,62	0,57
BAR	5,96	554	5	30	0,65	0,60
MAR	6,22	578	2	52	0,65	0,54
MIR	5,00	465	5	33	0,57	0,49
Média	6,72	625	5,91	58,50	0,68	0,64

Das 21 raças estudadas, apenas a raça HRP apresentou  $H_e$  menor do que a  $H_o$ , pelo que todas as outras raças apresentaram um *déficit* de heterozigotia. Salientamos, no entanto, as raças portuguesas pois apresentaram menor variabilidade genética entre indivíduos, com um mínimo de 0,49 na heterozigotia observada na raça Mirandesa, o que confirma os resultados obtidos por Ginja et al. (2010a) e por Mateus et al. (2004c), no qual a raça Mirandesa apresentou a menor heterozigotia entre todas as raças de bovinos portuguesas. Nas raças de animais zootécnicos, a observação de  $H_o$  inferior à  $H_e$  é frequente (Costa et al., 2012), pelo que os resultados que obtivemos confirmam esta observação para as raças de animais zootécnicos. Todavia, a redução da heterozigotia pode ter diversas causas, nomeadamente: selecção contra os heterozigóticos (efeito de Wahlund) e consanguinidade (Maudet et al., 2002).

### 3.3.2 Distâncias genéticas

Na Tabela 3.3 apresentam-se a estatística  $F_{ST}$  (acima da diagonal) e as distâncias genéticas Nei (1987) (abaixo da diagonal) para as raças utilizadas neste trabalho. A diferenciação genética média, avaliada pela estatística  $F_{ST}$ , entre as raças portuguesas foi mais baixa (0,09) entre as raças Barrosã e Maronesa, sendo maior entre as raças Mirandesa e a Barrosã (0,175), apresentando um valor intermédio (0,157) entre as raças Mirandesa e Maronesa.

Como seria de esperar, as raças portuguesas apresentam uma grande diferenciação genética relativamente às raças do noroeste europeu, todavia a raça Mirandesa caracteriza-se, também, por uma grande diferenciação genética relativamente às raças Maronesa e Barrosã. Estes resultados corroboram os obtidos por Ginja et al. (2010a), o quais observaram que a raça Mirandesa apresentou uma maior diferenciação genética. A maior diferenciação genética da raça Mirandesa pode ser atribuída ao aumento do coeficiente de consanguinidade num curto período de tempo tal como referido por Laval et al. (2000).

As raças portuguesas apresentaram a maior distância de Nei (Tabela 3.3) relativamente a todas as outras raças de bovinos incluídas neste estudo, com valores de  $d$  superiores a 0,139. Mais uma vez devemos salientar os resultados obtidos para a raça Mirandesa, pois foi a raça com maior distância genética relativamente às outras raças, com valores entre 0,232 para a raça Maronesa e 0,338 para a raça Slovenian Syrmian Podolian (HRP). Estes resultados estão de acordo com os reportados por (Ginja et al., 2010a)

### 3.3.3 Relações entre as raças

Na Figura 3.1 apresenta-se a rede filogenética das raças de bovinos estudadas neste trabalho, desenhada com base na distância genética de Nei (1987). Podemos observar que as três raças portuguesas se agrupam no mesmo cluster e que se separam de todas as outras raças envolvidas neste estudo. Destas, a raça Mirandesa é aquela que se encontra no braço mais longo do cluster de raças portuguesas da rede filogenética. Considerando os efeitos da migração como negligenciáveis e assumindo que as mutações têm uma baixa contribuição para a diversidade genética entre as raças, as diferenças nas frequências alélicas podem ser interpretadas como resultantes fundamentalmente, da deriva genética provocada pela ocorrência de *bottlenecks*. De facto, sempre que uma população é sujeita ao efeito de um *bottleneck*, as distâncias genéticas aumentam rapidamente, o que distorce a topologia das árvores evolutivas

Table 3.3: Valores de  $FST$  acima da diagonal e distância de Nei ( $d$ ) abaixo da diagonal

Raças	ABB	MBU	IMB	ILB	RMB	GGB	HRB	HRP	HRI	TGV	OBV	MWF	AMB	FGV	FV	TAR	RH	BBB	GLW	BAR	MAR	MIR
ABB	0,000	0,014	0,026	0,017	0,012	0,030	0,020	0,109	0,055	0,068	0,053	0,068	0,060	0,071	0,063	0,074	0,063	0,066	0,091	0,072	0,091	0,143
MBU	0,082	0,000	0,021	0,011	0,008	0,015	0,011	0,109	0,052	0,054	0,038	0,053	0,049	0,059	0,051	0,058	0,062	0,057	0,083	0,063	0,080	0,140
IMB	0,089	0,078	0,000	0,013	0,016	0,028	0,018	0,120	0,058	0,066	0,047	0,064	0,056	0,069	0,060	0,068	0,066	0,061	0,084	0,076	0,097	0,149
ILB	0,090	0,080	0,067	0,000	0,010	0,016	0,010	0,112	0,055	0,054	0,038	0,052	0,040	0,055	0,050	0,062	0,060	0,057	0,077	0,066	0,089	0,142
RMB	0,068	0,070	0,066	0,068	0,000	0,020	0,010	0,102	0,043	0,058	0,040	0,054	0,052	0,061	0,052	0,060	0,052	0,054	0,077	0,065	0,082	0,137
GGB	0,104	0,077	0,085	0,073	0,076	0,000	0,010	0,126	0,060	0,036	0,028	0,046	0,048	0,054	0,044	0,057	0,057	0,058	0,078	0,065	0,083	0,141
HRB	0,083	0,069	0,067	0,065	0,058	0,056	0,000	0,109	0,048	0,045	0,029	0,044	0,041	0,049	0,038	0,052	0,052	0,050	0,075	0,057	0,080	0,131
HRP	0,222	0,203	0,207	0,194	0,192	0,215	0,190	0,000	0,132	0,162	0,156	0,163	0,152	0,167	0,156	0,160	0,153	0,156	0,168	0,163	0,180	0,241
HRI	0,138	0,125	0,122	0,122	0,107	0,121	0,103	0,213	0,000	0,094	0,085	0,094	0,089	0,099	0,093	0,095	0,086	0,098	0,111	0,106	0,127	0,171
TGV	0,177	0,142	0,147	0,129	0,140	0,089	0,106	0,256	0,168	0,000	0,054	0,077	0,070	0,073	0,069	0,087	0,097	0,096	0,112	0,105	0,116	0,177
OBV	0,144	0,112	0,111	0,104	0,107	0,079	0,082	0,237	0,144	0,109	0,000	0,051	0,055	0,061	0,049	0,063	0,073	0,074	0,099	0,080	0,097	0,158
MWF	0,172	0,136	0,139	0,127	0,133	0,110	0,110	0,249	0,167	0,145	0,106	0,000	0,073	0,075	0,070	0,078	0,082	0,086	0,127	0,090	0,112	0,169
AMB	0,168	0,138	0,130	0,123	0,133	0,119	0,108	0,250	0,168	0,155	0,127	0,142	0,000	0,034	0,049	0,070	0,088	0,086	0,110	0,091	0,108	0,155
FGV	0,167	0,135	0,136	0,125	0,133	0,112	0,108	0,251	0,168	0,147	0,116	0,136	0,080	0,000	0,051	0,081	0,093	0,093	0,115	0,103	0,111	0,165
FV	0,149	0,120	0,122	0,116	0,114	0,095	0,090	0,238	0,158	0,138	0,101	0,121	0,101	0,100	0,000	0,059	0,087	0,083	0,109	0,091	0,113	0,165
TAR	0,175	0,145	0,142	0,137	0,132	0,120	0,119	0,240	0,161	0,163	0,122	0,142	0,134	0,131	0,107	0,000	0,111	0,095	0,126	0,098	0,128	0,171
RH	0,156	0,148	0,138	0,132	0,122	0,121	0,117	0,240	0,159	0,170	0,140	0,157	0,161	0,151	0,141	0,178	0,000	0,061	0,109	0,109	0,118	0,175
BBB	0,162	0,143	0,128	0,126	0,127	0,125	0,118	0,234	0,176	0,173	0,145	0,162	0,164	0,160	0,146	0,166	0,116	0,000	0,112	0,106	0,123	0,175
GLW	0,191	0,169	0,161	0,146	0,151	0,144	0,143	0,251	0,179	0,183	0,162	0,192	0,177	0,172	0,155	0,180	0,159	0,167	0,000	0,135	0,145	0,195
BAR	0,181	0,155	0,162	0,149	0,151	0,148	0,139	0,254	0,184	0,193	0,154	0,172	0,180	0,177	0,161	0,171	0,192	0,192	0,211	0,000	0,090	0,175
MAR	0,212	0,183	0,187	0,179	0,182	0,173	0,163	0,286	0,227	0,210	0,176	0,205	0,199	0,187	0,189	0,214	0,211	0,215	0,230	0,151	0,000	0,157
MIR	0,274	0,247	0,248	0,240	0,240	0,232	0,226	0,338	0,260	0,273	0,247	0,264	0,257	0,247	0,251	0,254	0,268	0,267	0,280	0,248	0,232	0,000

(Nei et al., 1983; Nei, 1987). Desta forma, os dendogramas mostram as relações genéticas actuais entre as raças, pelo que não mostram a história evolucionária das populações se estas não estiverem completamente isoladas (Nei 1987).

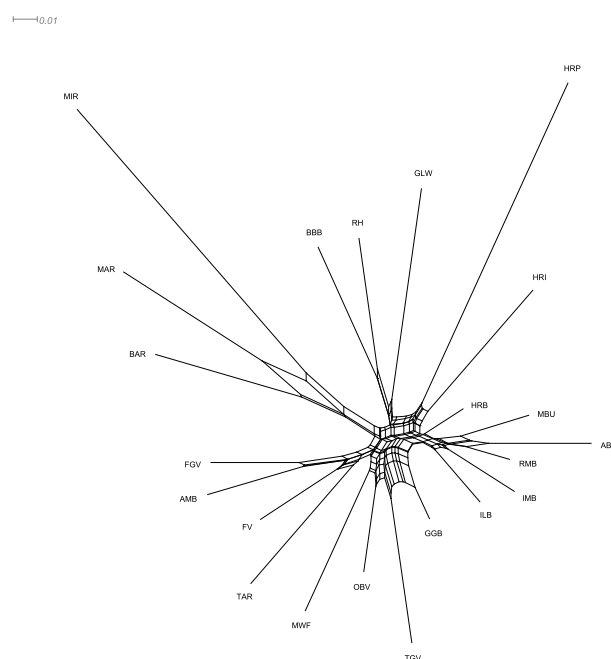


Figure 3.1: Rede filogenética construída com base na distância genética de Nei (1987) e desenhada com o software SPLITSTREE4 (Huson and Bryant, 2006)

### 3.4 Conclusões

Os resultados deste trabalho mostram que as três raças Mirandesa, Maronesa e Barrosã formam um tronco comum, mas são populações geneticamente independentes. A raça Mirandesa apresentou maior distância genética relativamente às raças Maronesa e Barrosã, pelo que constitui um grupo genético distinto. Quando comparadas com as outras raças autóctones de bovinos de outras regiões da Europa, as raças portuguesas apresentaram menor variabilidade genética.

A conservação destas raças de bovinos Portuguesas reveste-se de enorme importância para garantir a preservação da diversidade genética, mas também por razões culturais. De facto, a criação destes animais está na base de produtos de grande qualidade, com uma ligação estreita à cultura e às tradições locais. Este último aspecto é, também, importante para a tomada de decisões relativamente à conservação das raças autóctones.

Finalmente, sugerimos que seja atribuída especial atenção aos programas de con-

servação/selecção destas três raças, evitando a redução da variabilidade genética. A informação de pedigree deverá ser utilizada para definir acasalamentos que minimizem (ou, se possível, evite) o aumento de consanguinidade nestas raças.



# Bibliografia

ACBRM. Mirandesa: A raça e a carne, 2012. URL <http://www.mirandesa.pt>.

Alessandro Achilli, Anna Olivieri, Marco Pellecchia, Cristina Uboldi, Licia Colli, Nadia Al-Zahery, Matteo Accetturo, Maria Pala, Baharak Hooshier Kashani, Ugo A. Perego, Vincenza Battaglia, Simona Fornarino, Javad Kalamati, Massoud Houshmand, Riccardo Negrini, Ornella Semino, Martin Richards, Vincent Macaulay, Luca Ferretti, and Hans-Jurgen Bandelt. Mitochondrial genomes of extinct aurochs survive in domestic cattle. *Current Biology*, 18(4):157–158, 2008.

Antônio Alberto Neves de Alcochete. *Diversidade genética e mapeamento de QTLs do sistema gênico de macho-esterilidade termosensível (TGMS) do genoma de arroz (Oryza sativa L.)*. PhD thesis, Universidade de Brasília, 2005.

Paulo António Russo Almeida. *Diversidade genética e diferenciação das raças portuguesas de ovinos com base em marcadores de DNA - microssatélites: perspectiva de conservação*. PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2007.

Virgílio Alves. Evolução Filogenética dos Bovinos Autóctones Portugueses. In *II Jornadas Técnicas de Raças Bovinas Autóctones*, page 13, 2004.

Anónimo. Primeiro Relatório de Portugal a submeter à Conferência das Partes da Convenção sobre a Diversidade Biológica. Technical report, Ministério do Ambiente, Lisboa, Portugal, 1998. Coordenação técnica: Instituto da Conservação da Natureza.

Anónimo. REGULAMENTO (CE) N.º 870/2004 DO CONSELHO de 24 de Abril de 2004 que estabelece um programa comunitário de conservação, caracterização, recolha e utilização dos recursos genéticos na agricultura e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1467/04. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 162:18–28, 2004.

Jonh C. Avise. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, 1994.

- R. Baumung and J. Sölkner. Pedigree and marker information requirements to monitor genetic variability. *Genetic Selection and Evolution*, 35:369–383, 2003.
- P. J. Boettcher, M. Tixier-Boichard, M. A. Toro, H. Simianer, H. Eding, and Consortium Globaldiv. Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41(1):64–77, 2010. ISSN 0268-9146. doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02050.x.
- D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32(3):314–331, May 1980.
- AM Bowcock, A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, JR Kidd, and L.L. Cavalli-Sforza. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, 368(6470):455–457, 1994.
- J. Cañón, D. García, J. V. Delgado, S. Dunner, L. Telo da Gama, V. Landi, I. Martín-Burriel, A. Martínez, C. Penedo, C. Rodellar, P. Zaragoza, and C. Ginja. Relative breed contributions to neutral genetic diversity of a comprehensive representation of Iberian native cattle. *Animal*, 5(9):1323–1334, 2011.
- T. X. Carneiro, E. C. Gonçalves, M. P. C. Schneider, and A. Silva. Diversidade Genética e eficiência de DNA microssatélites para o controle genealógico da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 59:1257–1262, 2007.
- I. M. B. S. M. Carvalho. Caracterização Genética de Raças Bovinas Autóctones Portuguesas. Master’s thesis, Universidade do Porto, 2000.
- Teresa M. Correia. *Estudo da variabilidade e relações genéticas em raças caprinas autóctones mediante microssatélites*. PhD thesis, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2004.
- A. C. Costa, O. Uffo, A. Sanz, R. Ronda, R. Osta, C. Rodellar, I. Martin-Burriel, and P. Zaragoza. Genetic diversity and differentiation of five cuban cattle breeds using 30 microsattelite loci. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, pages 1–8, 2012.
- Jack C. M. Dekkers, John P Gibson, Piter Bijma, and Johan A.M.van Arendonk. Design and optimisation of animal breeding programmes. In *Lecture notes*, 2004.
- DGV, DRABI, INIA/EZN, and ACRIGUARDA. Caracaterização Morfológica da População Bovina Jarmelista, 2006.

- Andréa Alves Egito. *Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: Subsídios para a conservação*. PhD thesis, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.
- FAO. Biodiversity for food and agriculture: farm animal genetic resources. Technical report, FAO, 1998. URL <http://www.fao.org/sd/epidirect/epre0042.htm>.
- FAO. *The Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1999.
- FAO. *Situação Mundial dos Recursos Genéticos Animais Para Agricultura e Alimentação*. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), 2007.
- L. T. Gama and N. Carolino. Demographic analysis of the Alentejana breed of cattle. In *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Montpellier, France, 19-23 August 2002.
- Catarina Ginja, Luís Telo Da Gama, and Maria Cecilia T Penedo. Analysis of STR markers reveals high genetic structure in Portuguese native cattle. *J Hered*, 101(2):201–210, 2010a. doi: 10.1093/jhered/esp104. URL <http://dx.doi.org/10.1093/jhered/esp104>.
- Catarina Ginja, Maria Ct Penedo, Maria F Sobral, José Matos, Carla Borges, Dina Neves, Teresa Rangel-Figueiredo, and Alfredo Cravador. Molecular genetic analysis of a cattle population to reconstitute the extinct Algarvia breed. *Genet Sel Evol*, 42:18, 2010b. doi: 10.1186/1297-9686-42-18. URL <http://dx.doi.org/10.1186/1297-9686-42-18>.
- Catarina Jorge Ginja. *Influência das raças bovinas Ibéricas na estrutura genética das populações de bovinos Crioulos da América Latina*. PhD thesis, Universidade Técnica de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia, 2009.
- J. Goudet. hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1):184–186, 2005.
- D.H. Huson and D. Bryant. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular biology and evolution*, 23(2):254–267, 2006.
- T. Jombart and I. Ahmed. adegenet 1.3-5: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*, 2012. doi: 10.1093/bioinformatics/btr521.

- J. Jordana, P. Alexandrino, A. Beja-Pereira, I. Bessa, J. Canon, Y. Carretero, S. Dunner, D. Laloe, K. Moazami-Goudarzi, A. Sanchez, and N. Ferrand. Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120:73–87, 2003. doi: 10.1046/j.1439-0388.2003.00384.x.
- G. Laval, N. Iannuccelli, C. Legault, D. Milan, M. A. Groenen, E. Giuffra, L. Andersson, P. H. Nissen, C. B. Jørgensen, P. Beeckmann, H. Geldermann, J. L. Foulley, C. Chevalet, and L. Ollivier. Genetic diversity of eleven European pig breeds. *Genet Sel Evol*, 32(2):187–203, 2000. doi: 10.1051/gse:2000113. URL <http://dx.doi.org/10.1051/gse:2000113>.
- Carla Sofia Rodrigues Leal. Caracterização Genética da Raça Bovina Barrosã. Master's thesis, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 1998.
- Paula Lopes. *Estudos moleculares da genética da tolerância ao alumínio em trigos*. PhD thesis, Universidade do Minho e Trás-os-Montes, 1999.
- S. Lopes, N. Ferrand, and R. Godinho. Estudo da diversidade e estruturação genética das populações de lobo (*Canis lupus*) em Portugal. Technical report, CIBIO/UP, 2007.
- MADRP. Portaria nº 618/2008 de 14 de Julho, Julho 2008.
- J. C. Mateus, H. Eding, M. C T Penedo, and M. T. Rangel-Figueiredo. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Anim Genet*, 35(4):305–313, Aug 2004a. doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x>.
- J. C. Mateus, H. Eding, M. C. T. Penedo, and M. T. Rangel-Figueiredo. Contributions of Portuguese cattle breeds to genetic diversity using marker-estimated kinships. *Animal Genetics*, 35(4):305–313, 2004b. ISSN 1365-2052. doi: 10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x. URL <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01168.x>.
- JC Mateus, MCT Penedo, VC Alves, M. Ramos, and T. Rangel-Figueiredo. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. *Animal Genetics*, 35(2):106–113, 2004c.

- C. Maudet, G. Luikart, and P. Taberlet. Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. *J Anim Sci*, 80(4):942–950, Apr 2002.
- C. McManus, S. Paiva, P. S. Corrêa, I. Seixas, and C. B. de Melo. Estatísticas para descrever a genética de populações. on-line, Janeiro 2011. URL [http://animal.unb.br/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=87&Itemid=68](http://animal.unb.br/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=87&Itemid=68).
- I. Medurogac, Ana Medurogac, I. Russ, C.E. Veit-Kensch, P. Taberlet, B. Luntz, H.M. Mix, and M. Forrester. Genetic diversity of European cattle breeds highlights the conservation value of traditional unselected breeds with high effective population size. *Molecular ecology*, 18(16):3394–3410, 2009.
- José Aranguren Méndez, Jordi Jordana, Rosa Avellanet, and Miguel Torrens. Estudio de la variabilidad genética en la raza mallorquina para propósito de conservación. *Revista científica, FCV-LUZ*, 12(5):358–366, 2002.
- M. Nei. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 1987.
- M. Nei, F. Tajima, and Y. Tatenno. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19(2):153–170, 1983.
- C. Oliveira, B. Gutiérrez-Gil, S. Pedrosa, E. Barbosa, R. Dantas, J. V. Leite, N. V. Brito, J. J. Arranz, and Y. Bayón. Caracterização genética das raças ovinas Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela: DNA nuclear e mitocondrial. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 100:175–180, 2005.
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. URL <http://www.R-project.org>. ISBN 3-900051-07-0.
- J. Ramljak, A. Ivanković, CE Veit-Kensch, M. Förster, and I. Medugorac. Analysis of genetic and cultural conservation value of three indigenous Croatian cattle breeds in a local and global context. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128:73–84, 2011.
- M. T. Rangel, P. Russo, J. C. Carlos, V. Alves, J. Matos, and A. Martins. Biologia molecular e ciência animal: uma combinação prometedora. In *I JORNADAS*

*CIENTÍFICAS CENTRO DE CIÊNCIA ANIMAL E VETERINÁRIA*, Vila Real, Portugal, Março 2007. CECAV.

Inês Madeira Satar. CARACTERIZAÇÃO DE MICROSSATÉLITES EM ESPÉCIES DE AMBIENTES HUMANIZADOS. Master's thesis, UNIVERSIDADE DE LISBOA, 2009.

Fernando Ruivo Sousa and Luciano García Sánchez. *Mirandesa*. Associação dos Criadores de Bovinos de Raça Mirandesa, 2009.

Álvaro Spritze, Andréa Alves de Egito, Arthur da Silva Mariante, and Concepta McManus. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(10):1157–1164, 2003.

BS Weir and C.C. Cockerham. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, pages 1358–1370, 1984.

S. Wright. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, pages 395–420, 1965.

# Trabalhos publicados

**Almeida** A., J. P. Araújo, I. Medugorac e V. A. P. Cadavez, 2012. Study of genetic variability of three indigenous Portuguese cattle breeds by microsatellites analysis. Livro de Resumos do VIII Congresso Ibérico Sobre Recursos Genéticos Animais, p37.

**Almeida**, A., Araújo, J., Medugorac, I., and Cadavez, V.A.P., (2013). Study of genetic diversity of three Portuguese cattle breeds by 93 microsatellite markers. Animal Science (Series D), LVI: 41-47.