**Isabel Maria de Bessa Soares Monteiro de Carvalho**

# CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE RAÇAS BOVINAS AUTÓCTONES PORTUGUESAS

Estudo de polimorfismos proteicos e microssatélites

Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto, 2000

A maior parte do presente trabalho foi realizado no Instituto de Ciências e Tecnologias Agrárias e Agro-Alimentares (ICETA) da Universidade do Porto, com uma bolsa de estudo concedida pelo projecto europeu FAIR1 (CT95-0702).

# AGRADECIMENTOS

A investigação desenvolvida só foi possível devido à colaboração de muitas pessoas, a quem quero expressar o meu reconhecimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Alexandrino, agradeço a oportunidade, o apoio e a confiança que demonstrou durante a realização deste trabalho. As indicações que forneceu na estruturação, bem como as diversas críticas, contribuíram significativamente para a finalização desta tese.

Ao Prof. Dr. Nuno Ferrand quero agradecer o apoio e incentivos demonstrados ao longo deste trabalho, assim como a revisão atenta deste manuscrito.

À comissão do Mestrado, na figura do Prof. Dr. Aires e ao respectivo corpo docente, agradeço os importantes conhecimentos transmitidos durante o ano curricular deste mestrado.

Às Associações de Criadores de Bovinos da raça Barrosã, Maronesa, Mirandesa, Mertolenga e Alentejana, quero agradecer pela disponibilidade e cedência de amostras sem as quais este trabalho não tinha sido possível. Ao Eng. Cláudino quero agradecer pela ajuda na recolha das amostras das raças Mertolenga e Alentejana.

Ao meu colega Albano Pereira quero exprimir o meu agradecimento pela ajuda prestada na recolha de amostras e pela cedência de algumas fotografias apresentadas neste trabalho.

Ao meu colega João Alexandrino agradeço todos os ensinamentos prestados na análise estatística, bem como a sua disponibilidade no esclarecimento de alguma dúvida.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço a amizade, incentivo e bom humor que contribuíram para um bom ambiente de trabalho.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e incentivaram ao longo da minha vida, o meu muito obrigado.

Ao Carlos agradeço por todo o apoio, dedicação, compreensão, paciência e pelas críticas valiosas na revisão desta tese.

Quero ainda agradecer a todas aquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que a concretização deste trabalho fosse possível.

# ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO GERAL ..... 1

1.1 Classificação dos bovinos ..... 4

1.2 Dados sobre a domesticação e evolução do gado bovino ..... 5

1.3 Origem das raças ibéricas ..... 7

1.4 Raças Autóctones Portuguesas ..... 9

2. ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA AO NÍVEL PROTEICO ..... 21

2.1 Introdução ..... 23

2.2 Material e Métodos ..... 28

2.2.1 Colheita de amostras ..... 28

2.2.2 Conservação das amostras ..... 28

2.2.3 Tratamento das amostras ..... 29

2.2.4 Métodos de separação ..... 30

2.2.5 Métodos de detecção ..... 35

2.2.6 Análise estatística ..... 36

2.3 Resultados e Discussão ..... 38

2.3.1 Análise dos métodos de separação ..... 38

2.3.2 Análise populacional *locus* a *locus* ..... 42

2.3.3 Análise populacional conjunta ..... 54

2.3.3.1 Variabilidade genética ..... 54

2.3.3.4 Variações temporais na variabilidade genética ..... 57

3. ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA AO NÍVEL DO DNA ..... 61

3.1 Introdução ..... 63

3.2 Material e Métodos ..... 65

3.2.1 Colheita de amostras ..... 65

3.2.2 Extracção de DNA ..... 65

3.2.3 Amplificação de DNA ..... 68
3.2.4 Separação dos fragmentos de DNA amplificados ..... 71
3.2.5 Detecção por Nitrato de Prata ..... 73
3.2.6 Análise estatística ..... 73
3.3 Resultados e Discussão ..... 74
3.3.1 Análise dos métodos de separação ..... 74
3.3.2 Análise populacional *locus* a *locus* ..... 82
3.3.3 Análise populacional conjunta ..... 93
3.3.3.1 Variabilidade genética ..... 93

4. ESTRUTURA E DIFERENCIAÇÃO POPULACIONAL ..... 97
4.1 Introdução ..... 99
4.2 Análise estatística ..... 100
4.3 Estrutura das populações ..... 101
4.4 Análise factorial de correspondência ..... 111
4.5 Análise filogenética de indivíduos ..... 113
4.6 Comparação das populações da Península Ibérica ..... 116

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS ..... 119
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 125
ANEXOS

## RESUMO

A variabilidade genética de cinco das mais importantes raças bovinas autóctones portuguesas, Barrosã, Maronesa, Mirandesa, Mertolenga e Alentejana, foi estimada de modo a caracterizar a estrutura genética e a relação entre estas raças. Neste sentido, foram analisados 396 animais através de cinco proteínas sanguíneas polimórficas, dos quais 50 de cada raça foram também estudados através de sete microssatélites. Os parâmetros genéticos e as árvores representativas das relações genéticas das raças foram obtidos separadamente para cada um dos diferentes grupos de marcadores e os resultados foram comparados.

Os microssatélites demonstraram um maior grau de polimorfismo quando comparados com os *loci* proteicos. O número médio de alelos encontrado variou entre 5,71 e 7,29 para os microssatélites e entre 2,00 e 2,30 para os *loci* proteicos. A heterozigotia média variou entre 0,63 e 0,74 para os microssatélites, aproximadamente o dobro da estimativa encontrada para os *loci* proteicos (0,18-0,40). No conjunto das raças analisadas, a raça Mirandesa apresentou a mais baixa variabilidade genética para ambos os tipos de marcadores. Algumas diferenças significativas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontradas, incluindo deficiências significativas na heterozigotia na raça Mertolenga para ambos os *loci* proteicos e microssatélites. As estimativas da subdivisão genética, calculadas com base na medida $F_{ST}$, mostraram que a proporção média da variação genética entre as raças foi de 0,082 nos microssatélites e de 0,109 nos *loci* proteicos.

Diferenças temporais na variabilidade genética de oito populações ibéricas foram avaliadas através de marcadores proteicos. A comparação de dois períodos de amostragem revelou algumas diferenças significativas nas frequências alélicas. Em algumas populações, alelos de baixa frequência encontrados nos dados antigos não foram observados nos dados recentes. A heterozigotia manteve-se relativamente estável na maioria das raças.

A análise da diferenciação genética permitiu verificar a existência de três grupos, Barrosã/Maronesa, Alentejana/Mertolenga e Mirandesa, apresentando-se esta última geneticamente mais distinta. No entanto, a distância genética de alelos partilhados usada para construir um dendrograma da relação dos indivíduos e a análise factorial de correspondência, realizada com microssatélites, não revelaram agrupamentos bem definidos dos indivíduos nas respectivas raças, sugerindo uma diferenciação recente destas populações. As distâncias genéticas obtidas entre as populações analisadas neste trabalho foram similares às encontradas entre outras raças europeias.

Os resultados apresentados realçam a importância do uso de diferentes tipos de marcadores na análise das relações genéticas entre raças relativamente próximas e indicam a utilidade deste tipo de estudos em programas de conservação dos recursos genéticos que estão ou que possam vir a ser implementados.



**Palavras chave**: diversidade genética, microssatélites, polimorfismos proteicos, raças bovinas autóctones Portuguesas.

# ABSTRACT

Genetic variability was estimated among five of the most important Portuguese autochthonous cattle breeds (Barrosã, Maronesa, Mirandesa, Mertolenga and Alentejana) in order to characterise their genetic structure and to study their relationship. 396 animals were scored for five polymorphic blood proteins. Fifty individuals from each breed were typed for seven microsatellite loci. Genetic diversity parameters and relationship trees were obtained for each marker group and the results were compared.

A higher level of polymorphism was exhibited by microsatellites than by proteins. The average number of alleles ranged from 5,71 to 7,29 for microsatellites and from 2,00 to 2,30 for proteins. The mean heterozygosity ranged from 0,63 to 0,74 for microsatellite loci which is approximately twice the value estimated from protein loci (0,18-0,40). The Mirandesa breed showed the lowest genetic variability for both types of markers. Some significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were detected including a significant deficit of heterozygotes in the Mertolenga breed for both proteins and microsatellites. Estimates of genetic subdivision using $F_{ST}$ measures showed that the average proportion of genetic variation among breeds was 0,082 in microsatellites and 0,109 in proteins.

Temporal changes in genetic variation within and between eight Iberian populations were evaluated using protein markers. Comparison of old and new data indicated a significant change in allele frequencies at some loci. Several low-frequency alleles present in the old data were absent in the new samples in some populations. No such observations were made for heterozygosity.

Genetic differentiation analysis indicated the existence of three groups, Barrosã/Maronesa, Alentejana/Mertolenga and Mirandesa, the latter being the most genetically distinct. The simple allele-sharing genetic distance used to construct the dendrogram to show relationships among individuals did not reveal a clear clustering by breed. Factorial correspondence analysis using microsatellites confirmed this pattern, suggesting diversification in the recent past. Genetic distances obtained between populations were similar to those reported for other European cattle breeds.

These results emphasize the importance of the use of different types of markers in the analyse of genetic relationships among closed related breeds and indicate that these types of data are and will be useful in genetic conservation programmes both today and in the future.



**Key words:** genetic diversity, microsatellites, Portuguese cattle breeds, protein polymorphism.

# 1

# Introdução Geral

A evolução das raças bovinas tem sido moldada pelo Homem ao longo de várias gerações. As rotas migratórias das populações humanas terão inicialmente promovido a expansão do bovino doméstico e o seu estabelecimento nas mais diversas regiões. Várias raças evoluíram, tendo-se adaptado ao clima, às doenças e condições nutricionais locais existentes. Adicionalmente, foram seleccionadas para diferentes objectivos, dependentes das características consideradas mais importantes para a comunidade humana local (BLOTT *et al.*, 1998b). Neste momento, cada raça possui, provavelmente, uma combinação única de genes.

A variabilidade entre as raças pode ser mantida por isolamento genético o qual, em populações razoavelmente numerosas não afecta a variação individual dentro da população. Em contrapartida, a redução do número de elementos da população conduz, por efeitos de deriva genética e aumento de endogamia, a uma redução desta variação que, no limite, leva à uniformidade genética nas linhas consanguíneas por fixação aleatória de vários *loci*. O cruzamento entre raças aumenta a variação genética na população cruzada, mas se o procedimento for mantido de forma indiscriminada pode conduzir ao desaparecimento das raças, por uso repetido da raça preferida ou por miscigenação.

Desta forma, a preservação da variabilidade genética, nomeadamente das raças bovinas autóctones, é um investimento que pode ser determinante para a sua conservação e para garantir o seu potencial uso no futuro. As raças locais têm a capacidade de sobreviverem e de se reproduzirem em condições difíceis e possuem uma grande aptidão para aumentar a produção, sem perder adaptações locais mediante a realização de apropriados programas de selecção (HALL e BRADLEY, 1995). Pelo contrário, as raças altamente seleccionadas só atingem uma elevada "performance" em condições óptimas de boa nutrição e adequada assistência técnica.

A viabilidade económica das raças autóctones irá depender da implementação de sistemas alternativos de produção sustentável, em que as qualidades e adaptabilidade poderão ser integradas em esquemas de sucesso. O desenvolvimento e avaliação destes sistemas requer informação fiável sobre a variabilidade genética. O seu estudo é essencial

para que possam ser tomadas decisões apropriadas relativamente à utilização económica das variedades locais.

Adicionalmente, os resultados obtidos pelo estudo de dados genéticos constituem uma peça fundamental para o conhecimento da história evolutiva das raças domésticas. Muitas dúvidas persistem ainda sobre as suas origens e expansão, principalmente no que se refere às populações portuguesas. Neste domínio, a análise de polimorfismos bioquímicos e de microssatélites parece constituir uma metodologia bastante útil no estudo da história da diversificação das raças bovinas.

## 1.1 Classificação dos bovinos

Os bovinos domésticos pertencem à Família *Bovidae* da Ordem *Artiodactyla* que inclui também os géneros *Ovis*, *Capra* e *Antilope*. O primeiro bovídeo apareceu no Mioceno (há cerca de 20 milhões de anos) e teve uma rápida radiação (IGLESIAS, 1989). Segundo dados paleontológicos, terão existido diferentes espécies de bovídeos, actualmente extintas. Destas o auroque, *Bos primigenius*, terá sido o ancestral selvagem do bovino doméstico (EPSTEIN e MASON, 1984). O auroque teve como local de origem a Ásia de onde se expandiu para a Europa e para o Norte de África, encontrando-se vestígios fósseis desde a Península Ibérica até à China (EPSTEIN e MASON, 1984). A sua grande ocupação geográfica terá levado à diferenciação de três subespécies: *B. p. primigenius* europeu, *B. p. opisthonomous* africano e *B. p. namadicus* asiático (EPSTEIN e MASON, 1984).

Existem duas formas reconhecidas de bovino doméstico, o bovino taurino, sem bossa, da Europa, Oeste africano e Norte asiático (*Bos taurus*) e o bovino zebu com bossa do Sul da Ásia e África (*Bos indicus*). A nomenclatura clássica de LINNEU considera estas duas formas como espécies distintas e é sustentada por dados aloenzimáticos (MANWELL e BAKER, 1980, *in* LOFTUS *et al.*, 1994b). Contudo, certos aspectos, como a pouca informação obtida por marcadores proteicos e a completa interfertilidade entre *B. indicus* e *B. taurus* tem levado a que muitos autores as considerem como subespécies (EPSTEIN e MASON, 1984).

Segundo EPSTEIN (1971), o bovino sem bossa é, ainda, subdividido em bovino de cornos longos e bovino de cornos curtos, considerando este último descendente do primeiro, por via selectiva.

## 1.2 Dados sobre a domesticação e evolução do gado bovino

Ao longo do último século arqueólogos e historiadores têm tentado reconstruir a história evolutiva do gado bovino. A grande variabilidade de raças existente tem suscitado opiniões controversas relativamente às suas origens. Consequentemente, várias teorias têm sido propostas oferecendo modelos alternativos sobre a origem e a dispersão do gado bovino.

EPSTEIN (1971) considera que o primeiro passo para a domesticação terá ocorrido no Crescente Fértil, a partir de populações selvagens da subespécie asiática do auroque (*B. p. namadicus*), há cerca de 8 000 a 10 000 anos atrás, dando origem a *Bos taurus*. Esta interpretação é suportada por achados neolíticos provenientes da Anatólia (8 000 a 5 500 anos a.C.). Do Sudoeste Asiático expandiu-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 e de cornos longos, sensivelmente mais pequeno que o auroque (EPSTEIN e MASON, 1984). A partir desta altura, a expansão do gado bovino para a Europa e Norte de África é bem salientada pelas descobertas arqueozoológicas. De facto, diversos objectos de arte da Idade do Cobre e do Bronze representando bovinos foram encontrados no Norte da Europa e pinturas e esculturas datadas de há cerca de 2000 e 3000 anos a.C. apareceram no Norte de África, revelando a importância do gado bovino na alimentação, nos trabalhos agrícolas, na guerra e na religião (EPSTEIN, 1971). Foram descobertos, também, registos de bovinos de cornos longos nas duas margens do Mediterrâneo, revelando duas rotas migratórias: da Palestina através do Egipto até ao Noroeste Africano, e da Ásia Menor através dos Balcãs para a Península Ibérica, estendendo-se para Leste, Norte e Sul (EPSTEIN e MASON, 1984). As populações bovinas, à medida que acompanhavam as populações humanas nas suas migrações, foram recebendo sucessivamente genes da espécie selvagem, o auroque, existentes nos locais por onde passavam (EPSTEIN e MASON, 1984; MEDJURAC *et al.*, 1994).

Evidências em gravuras nas cavernas comprovam a existência do auroque na Europa nessa época. Contudo, à medida que as populações humanas se expandiam o número de grandes mamíferos, incluindo o auroque, sofreu um decréscimo acentuado, tendo desaparecido o último bovino selvagem na Polónia em 1627 (EPSTEIN e MASON, 1984). Não se sabe ao certo qual foi a intensidade do fluxo génico entre o bovino doméstico introduzido e o bovino selvagem existente e qual a sua contribuição na formação das populações bovinas europeias. Um estudo realizado com polimorfismos de grupos sanguíneos e aloenzimas em 14 raças bovinas europeias sugere que a expansão dos bovinos domésticos, do ponto de vista genético, é análoga à ocorrida com a população humana (MEDJURAC *et al.*, 1994). Com efeito, estes autores verificaram uma expansão do Sudoeste Asiático até ao Ocidente penetrando na Europa através dos Balcãs. Ao longo desta expansão as raças domésticas cruzaram-se entre si e com o auroque existente nesses locais.

A expansão de *B. taurus* para o Oriente encontra-se também bem documentada, através de numerosos achados arqueozoológicos. Segundo alguns autores, este terá dado origem ao bovino com bossa (*B. indicus*), através de um processo de selecção, em resultado da adaptação às condições hostis e altas temperaturas existentes nestas zonas (EPSTEIN e MASON 1984). A apoiar esta teoria, existem evidências arqueológicas como a cerâmica artística das civilizações Harappan encontrada em Harappa e Mohenjo-Daro no Vale Indú, datadas de há cerca de 4500 a.C., com representações de ambos os bovinos.

Uma explicação alternativa sugere que o *Bos indicus*, ou gado zebu, originou-se a partir de um ancestral diferente, sendo esta opinião apoiada por arqueólogos e geneticistas (MACHUGH, 1996).

Recentemente, estudos realizados ao nível do DNA comprovaram que estes dois grandes grupos terão divergido muito antes do início do processo de domesticação (LOFTUS *et al.*, 1994a, b; BRADLEY *et al.*; 1996; MACHUGH *et al.*, 1997; QUEVAL *et al.*, 1998). LOFTUS e seus colaboradores (1994b) demonstraram, através da análise da variação da sequência de DNA mitocondrial, a presença de duas linhagens distintas, uma que incluía o bovino zebu e a outra o bovino taurino. A aplicação do relógio molecular sugere que os dois grupos terão divergido há pelo menos 210 000 anos atrás. Esta divergência fornece fortes evidências para a ocorrência de duas domesticações independentes, presumivelmente de duas subespécies diferentes de auroque (LOFTUS *et al.*, 1994a). *B. p.*

*namadicus* que terá originado o bovino zebu, na Ásia, provavelmente, no actual Paquistão e o *B. p. primigenius* que terá dado origem ao bovino taurino.

MACHUGH *et al.* (1997) através do estudo de microssatélites e BRADLEY *et al.* (1994) através da análise do cromossoma Y comprovam esta divergência e sugerem, ainda, uma terceira domesticação independente, ocorrida em África. A análise do polimorfismo do mtDNA indica, igualmente, uma separação entre os ancestrais do gado europeu e africano anterior à domesticação e que provavelmente terá ocorrido há 22 000–26 000 anos atrás (BRADLEY *et al.*, 1996). Este terceiro processo de domesticação ter-se-ia, assim, efectuado a partir da subespécie africana do auroque (*B. p. opisthonomus*).

## 1.3 Origem das raças ibéricas

A introdução de bovinos domésticos na Península Ibérica terá ocorrido em consequência das migrações humanas durante o Neolítico (EPSTEIN e MASON, 1984; VILLENA *et al.*,1999). Por um lado, através das migrações ocorridas do Sudoeste Asiático pela Península dos Balcãs até à Península Ibérica e, por outro, pelo Estreito de Gibraltar em consequência da entrada de povos vindos do Norte de África (Hamites) trazendo consigo, provavelmente, descendentes de *B. p. opisthonomus* (VILLENA *et al.*,1999). Diversos achados arqueológicos no rio Guadalquivir (Sevilha) mostram bovinos domesticados acompanhando os povos africanos, há cerca de 5000 anos atrás.

Mais tarde, estes movimentos foram acompanhados por invasões de povos vindos de Este, como os Fenícios (1000 a.C.), os Gregos (700 a.C.) e os Romanos (300 a.C.), que dominaram a Península Ibérica durante sete séculos contribuindo, assim, para a diversificação das raças. Segundo MIRANDA DO VALE (1949) esta expansão originou os troncos Aquitânico (*Bos taurus aquitanus*) e Ibérico (*Bos taurus ibericus*).

Além disso, verificaram-se invasões através do Estreito de Gibraltar pelos povos Cartagineses (500 a.C.) e Mouros (711 d.C.) que terão também contribuído para formação das raças bovinas ibéricas (EPSTEIN e MASON, 1984). Esta via de entrada, segundo MIRANDA DO VALE (1949), terá dado origem ao tronco Mauritânico (*B. taurus mauritanicus*).

Durante séculos, as populações bovinas ibéricas estabeleceram-se em diferentes áreas geográficas adquirindo diferentes características em consequência da alternância de migrações com períodos de estabilidade durante os quais foi possível a selecção de colorações específicas e de produtividade, juntamente com a selecção natural imposta pelas diferentes condições ambientais. No início os bovinos eram utilizados, quase exclusivamente, como fonte de trabalho, contudo, no século XIX começou-se a dar uma maior ênfase à produção de carne e de leite (EPSTEIN e MASON, 1984). Este procedimento levou à selecção de raças com aptidões para este duplo objectivo, conduzindo ao declínio de muitas outras raças. Este processo acelerou-se com a Revolução Industrial pela necessidade de abastecer as grandes cidades. Adicionalmente, a introdução de novas técnicas reprodutivas, especialmente a inseminação artificial e o incremento de cruzamentos de raças intensificou esta diminuição, levando muitas raças autóctones à extinção (MOAZAMI-GOUDARZI *et al.*, 1997). Só em 1980 começaram a surgir esforços no sentido da conservação e preservação da diversidade genética das raças bovinas, dando especial atenção às raças autóctones (FAO, 1994).

## 1.4 Raças Autóctones Portuguesas

As mudanças económicas, sociais e ambientais verificadas ao longo das últimas décadas levaram à selecção de raças bovinas altamente produtivas usadas em sistemas de regime de produção intensivo. Esta selecção conduziu ao decréscimo das raças autóctones com menor rendimento, ameaçando a sua existência (OLDENBROEK, 1999). No entanto, nos últimos anos, tem havido um crescente interesse na preservação destas raças devido à importância que elas representam. Neste contexto, OLDENBROEK (1999) salienta seis razões para a sua conservação:

i) oportunidade de fazer frente a futuros requisitos de mercado, em que se verifica uma tendência geral para o aumento da procura de produtos de origem animal de qualidade obtidos em condições menos intensivas;

ii) garantia contra alterações no sistema de produção, sendo necessária a conservação da variabilidade genética para fazer face a essas mudanças ou ao aparecimento de novas doenças;

iii) interesse sócio-económico, que resulta numa forma de evitar a desertificação dos meios rurais, dando meios de subsistência às populações locais;

iv) oportunidade de investigação, na procura de genes que influenciam a produção, a qualidade dos produtos e a saúde;

v) razões históricas e culturais, uma vez que estas raças são o reflexo de uma longa história de simbiose entre animais domésticos e o Homem;

vi) valor ecológico, evidenciado pela interacção destes animais com a natureza e a paisagem.

Desta forma, a conservação das raças autóctones surge como um objectivo prioritário a ter em conta, e cuja realização só será possível mediante o estudo da estrutura genética destas raças.

Em Portugal existe um número considerável de raças bovinas autóctones, algumas das quais com efectivo reduzido, e que se encontram, ainda, pouco estudadas. Com efeito, a maior parte dos trabalhos realizados envolve análises morfológicas, estando por investigar a estrutura genética das suas populações, o seu grau de proximidade, a sua origem e evolução recente.

Face ao exposto, pretende-se com este trabalho estudar a estrutura genética de cinco das doze raças bovinas existentes em Portugal: Barrosã, Maronesa, Mirandesa, Mertolenga e Alentejana. Estas raças são produtoras de carne de alta qualidade, cuja denominação de origem é reconhecida a nível nacional e da União Europeia (FERNANDES, 1996).

As raças analisadas durante o decorrer deste trabalho encontram-se de seguida descritas de uma forma sucinta. A figura 1.1 indica o solar de cada raça e onde, actualmente, existe um maior número de indivíduos pertencentes ao livro genealógico de cada raça.

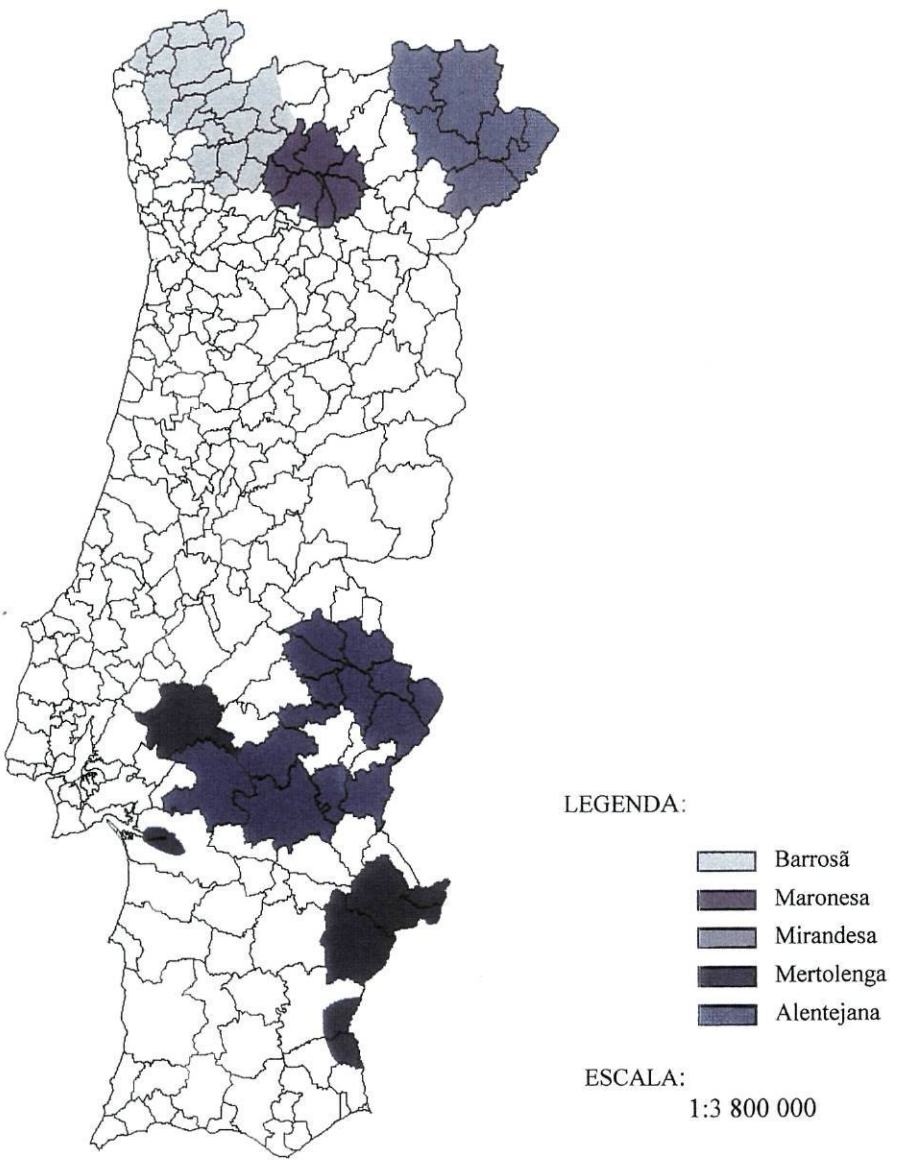



**Figura 1.1**: Mapa de distribuição de cinco raças portuguesas (adaptado de "Bovinos em Portugal", coordenação de RODRIGUES, 1981).

## BARROSÃ

É uma raça que vive sobretudo em zonas montanhosas, na Serra do Barroso, abrangendo os actuais concelhos de Montalegre, Boticas, Vieira do Minho e Cabeceiras de Basto. Esta região não possui condições agro-alimentares que permitam grandes explorações agrícolas, pelo que uma parte da população se dedica à criação do gado (GARCIA *et al.*, 1981).

O bovino Barrosão é utilizado essencialmente como força de trabalho e na produção de carne de excelente qualidade. Trata-se de um animal que apresenta uma estatura mediana, com 121-130 cm de altura à cernelha e pelagem de cor castanha que varia entre a cor palha até cor acerejada (LEAL, 1995). A cabeça é curta e larga, encimada por uma cornamenta 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 (MARTINS, 1982).



**Figura 1.2**: Exemplar da raça Barrosã.

É uma raça com caracteres sexuais secundários bem diferenciados. Os touros são sempre mais escuros, particularmente no terço anterior. Possuem uma maior corpulência

em relação às fêmeas, um tronco mais robusto, barbela mais desenvolvida, cabeça mais curta e mais larga, cornos mais grossos mas mais curtos (GARCIA *et al.*, 1981). A reprodução é efectuada, principalmente, em postos de cobrição.

A crescente necessidade de uma maior produção de carne levou a que durante a segunda metade deste século houvesse um progressivo declínio no efectivo populacional. Recentemente, as alterações introduzidas na política agrária e ambiental da União Europeia terão permitido alguma recuperação. A criação do livro genealógico da raça Barrosã em 1981 constituiu um passo importante para a certificação dos animais e o aumento do seu valor. Segundo dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura, em 1998 existiam 7300 animais inscritos no livro genealógico.

A origem desta raça permanece ainda por esclarecer, constatando-se a existência de opiniões controversas, devido às suas características particulares (acentuado perfil côncavo e cornamenta em forma de lira) que a tornam difícil de enquadrar no seio das restantes raças bovinas europeias. Enquanto JOÃO TIERNO (*in* GARCIA, 1964) admite uma proveniência da raça Barrosã do planalto superior castelhano, MIRANDA do VALE (1949) inclui-a no Tronco Mauritânico, tronco este derivado de um ancestral do tipo côncavo brevilíneo 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 (GARCIA, 1964). No entanto, estas hipóteses são baseadas em apenas algumas características morfológicas, e, portanto, pouco fundamentadas. Um estudo realizado por LEAL (1998) através da análise de variantes proteicas também não permitiu esclarecer esta questão, pelo que será necessário um estudo mais aprofundado, nomeadamente a nível da molécula de DNA para o esclarecimento da origem da raça Barrosã.

## MARONESA

O bovino Maronês tem como área natural de criação as serras do Alvão, Marão e Padrela. Possui uma extraordinária rusticidade e um poder de adaptação a terrenos mais ásperos e acidentados onde a mecanização não consegue ter lugar. Este facto torna a sua presença indispensável para a realização dos diferentes trabalhos das explorações locais. É

um produtor de carne de excelente qualidade e, além disso, no primeiro mês de criação, produz leite que excede quase sempre as necessidades da cria (LEITÃO, 1981b).



**Figura 1.3**: Exemplar da raça Maronesa.

Caracteriza-se por ter uma pequena corpulência, regular conformação, linha dorso-lombar direita. Possui uma pelagem de cor castanha escura. A cabeça é pequena, seca e bem expressiva, perfil côncavo, sendo este mais evidenciado devido à saliência das protuberâncias orbitarias, os cornos de inserção média, são delgados, lisos, de cor branco-sujo e pontas escuras. Os membros são fortes e apresentam no conjunto aprumos relativamente correctos (LEITÃO, 1981b). O touro apresenta acentuado dimorfismo na cabeça, que é mais compacta e menos recortada, de pelagem mais escura do que nas fêmeas.

A reprodução da Maronesa é efectuada por cobrição natural, existindo geralmente um touro por cada posto de cobrição. Os criadores desta raça possuem pequenas propriedades onde têm duas a cinco cabeças.

O livro de registo desta raça foi estabelecido em 1989, encontrando-se inscritos, em 1998, 7400 animais (dados fornecidos pelo Ministério da Agricultura).

Apesar de alguns autores a considerarem como uma sub-raça, a sua origem continua ainda por explicar. Neste contexto, JOÃO TIERNO (1904, *in* LEITÃO, 1981b) considera-a como uma sub-raça descendente apenas da Barrosã. Todavia, MIRANDA do

VALE (1949) afirma que se trata de um produto originário do cruzamento entre a raça Barrosã e a Mirandesa. No entanto, tal como ocorre no caso da Barrosã, estas opiniões são baseadas em escassas características morfológicas. RANGEL-FIGUEIREDO e IANNUZI (1993) através de um estudo citogenético realizado com estas três raças reforçam a hipótese colocada por MIRANDA DO VALE. No entanto, será necessário a realização de estudos mais alargados para resolver esta questão.

## MIRANDESA

A região solar da raça Mirandesa situa-se no concelho de Miranda do Douro, de onde irradia para os concelhos de Vimioso, Mogadouro, Bragança, Vinhais e Macedo de Cavaleiros. Terá sido, no passado, a raça portuguesa que mais se expandiu, invadindo as Beiras e chegando mesmo a penetrar no Alentejo. No entanto, o advento da tracção mecânica e a importação de raças exóticas mais produtivas do que a Mirandesa levaram ao declínio desta raça, que subsiste, actualmente, apenas em regiões onde o manuseamento das máquinas é praticamente impossível (FERNANDES, 1996).

A exploração desta raça visa a produção de carne e trabalho. Neste momento, a recria de machos está a ser orientada no sentido da produção de novilhos para abate.



**Figura 1.4**: Exemplar da raça Mirandesa.

Esta raça caracteriza-se por possuir animais de grande corpulência, compridos, largos, bem musculados, de linha dorso-lombar quase horizontal, de terço posterior desenvolvido e de membros de comprimento mediano. A pelagem é castanha, escurecendo nas extremidades. Os machos são mais escuros do que as fêmeas e as crias têm coloração castanho-claro. Possui uma boa capacidade maternal (LEITÃO *et al.*, 1981a).

Segundo dados do Ministério da Agricultura, em 1998 existiam 4800 animais inscritos no livro genealógico, cuja existência se verifica desde 1977.

O bovino Mirandês é geralmente enquadrado no tronco ibérico - *Bos taurus ibericus* - sendo classificado como pertencente a uma raça eumétrica, de perfil rectilíneo (MIRANDA do VALE, 1949).

**MERTOLENGA**

A raça Mertolenga existia inicialmente em Mértola, Alcoutim e Martilongo. Posteriormente, ocorreu uma radiação para outros solares secundários tais como o concelho de Barrancos e as zonas mais pobres dos concelhos de Serpa e Beja, de Vale do Sado e do Vale do Sorraia, onde provavelmente terão sido cruzados com indivíduos de outras raças, apresentando actualmente uma morfologia distinta do que inicialmente era considerada (MONTEIRO *et al.*, 1981).



**Figura 1.5**: Exemplares da raça Mertolenga.

Em cada uma destas regiões, os animais apresentam características morfológicas um pouco diferenciadas, no que respeita à pelagem e aos caracteres cefálicos, sendo muito semelhantes quanto às características funcionais (MONTEIRO *et al.*, 1981).

Apesar da sua boa fertilidade e notável rusticidade, aliadas a uma regular produção leiteira, o fraco desenvolvimento das crias em raça pura tornou esta etnia muito vulnerável à introdução de outras. Isto levou a uma diminuição dos efectivos puros a partir da década de 70 e à sua substituição por cruzados.

Apresenta um tamanho mediano e formas harmoniosas, esqueleto fino, pelagem que vai desde vermelha, rosilho mil-flores, vermelho-malhada até malhada de vermelho. Possui andamento fácil, enérgico e correcto; temperamento nervoso; a cabeça é de tamanho mediano, de fronte larga, perfil convexo ou recto; cornos finos, brancos, escuros nas pontas, de secção elíptica, em forma de gancho, acabanados ou em forma de lira baixa. Os membros são finos, bem proporcionados, musculados e aprumados (MONTEIRO *et al.*, 1981).

Possui boas características maternais, até mesmo quando as condições de alimentação são deficientes.

Além da produção de carne, em regime extensivo de sequeiro, os machos castrados desta raça são usados como cabrestos na condução dos rebanhos de raça brava e para recolha de toiros nos espectáculos taurinos.

O livro genealógico existe desde 1979, e em 1998 estavam representados 6000 animais, segundo dados obtidos do Ministério da Agricultura.

BERNARDO LIMA em 1873 (*in* Monteiro, 1986) considerou a raça Mertolenga como uma variedade ou sub-raça da Alentejana. No entanto, não há dados que confirmem esta hipótese. MIRANDA do VALE (1949) filia-a, juntamente com a raça Alentejana, no Tronco Aquitânico - *Bos taurus aquitanicus* - caracterizado por um perfil convexilíneo e cornos de grande desenvolvimento abertos para os lados.

**ALENTEJANA**

A raça Alentejana tem como solar de origem a zona do Alto e Baixo Alentejo. É no distrito de Portalegre que se encontra o maior número de vacadas, nomeadamente nos concelhos de Arronches, Avis, Elvas, Fronteira, Monforte, Sousel e, no Sul dos concelhos de Alter do Chão, Crato e Portalegre. Destacam-se ainda no distrito de Évora os concelhos de Arraiolos, Alandroal, Borba, Estremoz, Montemor-o-Novo, Mourão, Portel, Redondo, Reguengos de Monsaraz, Vendas Novas, Viana do Alentejo e Vila Viçosa (ROSADO *et al.*, 1981).

É uma das raças de maior formato e maior taxa de crescimento em Portugal. Encontra-se bem adaptada ao meio em que vive, o Alentejo, de clima quente e seco. As condições climatéricas são bastante irregulares, o que leva à alternância de más condições alimentares com períodos de maior abundância, tornando difícil a produção bovina. Nestas condições, a vaca Alentejana consegue produzir um vitelo quase todos os anos constituindo uma vantagem sobre outro tipo de animal menos bem adaptado (CUNHA, 1994).

Até meados dos anos 50, o bovino alentejano foi utilizado essencialmente como animal de trabalho, apresentando uma evidente variabilidade de corpulência, consoante o meio onde os animais eram criados e recriados. Hoje, é fundamentalmente utilizada na produção de carne, quer em linha pura, quer em cruzamento. Os sistemas de recria vão desde o extensivo ao intensivo.



**Figura 1.6**: Exemplar da raça Alentejana.

A pelagem é vermelha, com tons que vão desde o claro até ao retinto; a borla da cauda é geralmente interpolada. A cabeça apresenta um regular desenvolvimento, perfil convexo ou subconvexo, com acentuado dimorfismo sexual. Os cornos são de tamanho regular, branco-sujo, com as pontas de tonalidade que vai do âmbar-claro até ao afogueado, simétricos e de secção elíptica (ROSADO *et al.*, 1981).

A taxa de fecundidade oscila entre os 70 e os 80% segundo dados apurados na Estação de Fomento Pecuário do Alto Alentejo e citados por CUNHA (1994).

Os registos no livro genealógico iniciaram-se em 1970, sendo o efectivo em 1998 de 7000 animais, segundo dados do Ministério da Agricultura, estando representadas 50-100 vacas por exploração.

Esta raça é considerada por alguns autores como pertencente ao Tronco Aquitânico, de onde também são descendentes as raças portuguesas Mertolenga e Minhota (MIRANDA do VALE, 1949).

## Objectivos

Em virtude da reduzida informação relativa a estas populações e das suas relações, torna-se importante que o presente trabalho contribua para o preenchimento desta lacuna e, simultaneamente, que auxilie no estabelecimento de um plano de conservação para estas raças. Com esta finalidade, definiram-se os seguintes objectivos:

1. estudo da variabilidade genética de cinco raças bovinas autóctones portuguesas, Barrosã, Maronesa, Mirandesa, Mertolenga e Alentejana, através de marcadores proteicos e microssatélites;

2. análise comparativa entre os resultados obtidos pelos dois diferentes tipos de marcadores;

3. avaliação do grau de diferenciação genética entre estas cinco raças portuguesas e outras raças bovinas, de forma a ser possível uma melhor compreensão sobre a sua história;

4. optimização das técnicas de análise de microssatélites com vista à sua adequação, por um lado, aos condicionalismos técnicos e laboratoriais existentes e, por outro lado, à concretização dos outros objectivos do presente trabalho.

# 2

# Estudo da variabilidade genética ao nível proteico

## 2.1 INTRODUÇÃO

A electroforese de proteínas remonta à década de 60 e, até há bem poucos anos, era a técnica de análise genética mais generalizada. O estudo de polimorfismos proteicos permitiu aprofundar o conhecimento das relações entre as raças bovinas, a partir do qual foi possível demonstrar a existência de dois grupos, *Bos taurus* e *Bos indicus*, relativamente diferenciados (BRAEND, 1971, QUEVAL *et al.*, 1998). A maior parte das raças bovinas europeias encontram-se bem estudadas em termos de polimorfismos proteicos (GONZÁLEZ *et al.*, 1987; MEDJURAC *et al.*, 1994; LEAL, 1998; BLOTT *et al.*, 1998a, b; ARRANZ *et al.*, 1996). Estes resultados são, de uma forma geral, consistentes com os dados históricos conhecidos (EPSTEIN e MASON, 1984). No entanto, o acréscimo de informação fornecido por este tipo de marcadores tem-se revelado ainda insuficiente para resolver determinadas questões sobre o tema.

As metodologias de análise de DNA, desenvolvidas essencialmente nos últimos 15 anos, têm tido uma adesão e interesse crescentes. Contudo, apesar de actualmente serem das técnicas mais utilizadas, não suplantaram definitivamente os métodos envolvendo proteínas. A rapidez no processamento das amostras, a economia de custos, a facilidade de execução das técnicas e, principalmente, a existência de uma base de dados significativa que permite estabelecer análises comparativas, são alguns dos aspectos que levaram à continuação da sua aplicação. Por outro lado, os marcadores bioquímicos podem ser valiosos ao fornecer informação complementar aos resultados obtidos pelos marcadores moleculares. De acordo com CUNNINGHAM (1994, *in* BLOTT *et al.*, 1998b), uma correcta determinação das relações genéticas entre as raças requer o uso de diferentes tipos de marcadores genéticos. É importante, também, tomar conhecimento das mudanças evolutivas das proteínas, uma vez que são moléculas essenciais na construção de caracteres morfológicos e no desempenho de funções fisiológicas (NEI, 1987).

Assim, para uma melhor compreensão da estrutura genética das raças bovinas portuguesas propôs-se, para além da análise de DNA, a realização de um estudo de polimorfismos proteicos. Neste capítulo são analisados cinco *loci* proteicos polimórficos, hemoglobina, albumina, anidrase carbónica, transferrina e componente específico de grupo, cuja escolha se deveu ao seu carácter informativo e à sua utilização pela generalidade dos autores, permitindo uma análise comparativa da diversidade genética das raças bovinas de um modo fiável. De seguida encontram-se breves referências sobre esses *loci* proteicos.

**Hemoglobina (HB)**

A hemoglobina é responsável pelo transporte do oxigénio dos pulmões para os tecidos. A sua estrutura é tetramérica, tendo cada uma das subunidades um grupo prostético, o heme, com um átomo de ferro no centro. A fracção principal da hemoglobina de mamíferos é composta por duas cadeias α e duas cadeias ß (CECCHINI e NIJS, 1986).

A hemoglobina é das proteínas mais abundantes nos eritrócitos e de fácil detecção sendo, talvez por essa razão, a mais estudada a nível do seu polimorfismo. Foi a primeira a ser estudada por meio de electroforese em gel de amido e apresenta polimorfismo em vários mamíferos: carneiros (KILGOUR *et al.*, 1990), coelho (FERRAND, 1995), macacos (SHIMIZU e TAKENAKA, 1991) e cabra (WANG *et al.*, 1990).

Em 1955 CABANNE e SERAIN (*in* BRAEND, 1988) descrevem pela primeira vez o polimorfismo da HBB em bovinos do Norte de África, tendo detectado dois alelos, HBB*A e HBB*B. Posteriormente muitos estudos foram efectuados tendo sido descritos 13 variantes (raros na sua maioria) (CECCHINI e NIJS, 1986; BRAEND, 1988, CHEN *et al.*, 1989). A existência de variantes electroforéticas deve-se apenas a diferenças nas cadeias ß, uma vez que todos possuem a mesma cadeia α (CECCHINI e NIJS, 1986). Na maior parte das populações europeias existem apenas dois alelos estando o alelo HBB*A fixado em algumas populações.

Nos bovinos o *locus* HBB encontra-se no cromossoma 15 (15q13-q23) (FRIES *et al.*, 1993).

**Anidrase Carbónica (CAII) -E.C.4.2.1.1**

A CAII é uma metaloenzima com grande distribuição nos animais e nas plantas e cataliza de forma reversível a hidratação do $CO_2$ em $H_2CO_3$. O seu papel fisiológico ainda não é bem conhecido mas pressupõe-se que tenha participação na manutenção do balanço osmótico (TASHIAN, 1989).

Em várias espécies de mamíferos foram descritos dois *loci* polimórficos (CAI e CAII) (TASHIAN e CARTER, 1976; CLARKE *et al.*, 1989; BOWLING *et al.*, 1990). Nos eritrócitos de bovinos apenas se exprime a anidrase carbónica II.

SARTORE *et al.* (1969) foram os primeiros a detectar polimorfismo electroforético da anidrase carbónica em bovinos domésticos e búfalos americanos, através da electroforese em gel de amido, tendo descrito 2 alelos codominantes autossómicos (CAII*F e CAII*S) (SARTORE *et al.*, 1969, TASHIAN e CARTER, 1976). Mais tarde foram encontrados mais três alelos (C, Z e X) (CECCHINI e NIJS, 1986).

A facilidade de isolamento e purificação da CAII tornou este sistema isoenzimático num dos mais estudados ao nível da sua estrutura molecular, variação genética e evolução. A ocorrência de variação genética na CA está descrita em muitas espécies de mamíferos, nomeadamente no Homem (TASHIAN e CARTER, 1976), outros primatas (TASHIAN e CARTER, 1976), porco (TASHIAN e CARTER, 1976), coelho (BERNOCO, 1970) e carneiro (TASHIAN e CARTER, 1976).

O *locus* CAII nos bovinos encontra-se no cromossoma 14 (BISHOP *et al.*, 1994).

**Albumina (ALB)**

A albumina é a proteína mais abundante no plasma dos mamíferos e apresenta uma estrutura monomérica. A sua função está relacionada com processos de transporte e de regulação do balanço osmótico (CARTER *et al.*, 1989).

Nos mamíferos, a existência de polimorfismo genético na ALB foi descrita em búfalos (SCHNEIDER *et al.*, 1990), cavalos (STORMONT e SUZUKI, 1963; BOWLING e CLARK, 1988), coelhos (FERRAND e ROCHA, 1992) e carneiros (ERHARDT e SIMIANER, 1993). Nos bovinos foi GAHNE *et al.* (1977) quem descreveu pela primeira vez a variação genética nesta proteína. EFREMOV e ASHTON em 1965 (*in* CECCHINI e NIJS, 1986) descrevem pela primeira vez polimorfismo genético em raças bovinas inglesas. Inicialmente foram descritos dois alelos (ALB*A ou ALB*F, e ALB*B ou ALB*S), por electroforese ácida.

Mais tarde, foram descritos outros alelos em raças britânicas (ALB*H e ALB*G), e em raças africanas (ALB*D, ALB*E e ALB*F) (CECCHINI e NIJS, 1986). Na maior parte das raças o alelo ALB*A é o mais predominante.

O *locus* desta proteína encontra-se no cromossoma 6 (BISHOP *et al.*, 1994).

**Transferrina (TF)**

A transferrina é uma β-globulina sérica com uma estrutura monomérica glicosilada. Tem como função o transporte do ferro, possuindo, também, um papel importante no seu metabolismo (FLETCHER e HUEHNS, 1968). O polimorfismo da transferrina, em mamíferos, foi estudado por vários autores dos quais se podem citar GAHNE *et al.* (1977), EVANS e WILLIAMS (1980), ERHARDT (1986), FERRAND *et al.* (1988), TSUJI *et al.* (1989), SCHNEIDER *et al.* (1990), WELCH (1990), PENHALLOW *et al.* (1991).

ASHTON (1965, *in* CECCHINI e NIJS, 1986) descreveu, pela primeira vez, o polimorfismo genético de TF em bovinos, tendo detectado a presença de três alelos, TF*A, TF*D e TF*E. Desenvolvimentos posteriores na técnica electroforética em gel de amido permitiram visualizar diferenças no alelo TF*D levando à sua divisão em TF*D1 e TF*D2 (KRISTJANSSON e HICKMAN, 1965).

A utilização de focagem isoeléctrica por GAHNE *et al.* (1977) permitiu observar uma diferenciação clara entre os alelos, nomeadamente de TF*D1 e TF*D2, estando actualmente descritos doze variantes: TF*A, TF*B, TF*D1, TF*D2, TF*E, TF*F, TF*N, TF*GSA, TF*GKE, TF*H, TF*J e TF*I.

É o sistema proteico em que se conhece um maior número de alelos. A transferrina ocorre com mais variantes nas formas asiáticas e africanas do que nas raças europeias (BRAEND, 1971).

O *locus* transferrina encontra-se no cromossoma 1 (BISHOP *et al.*, 1994).

**Componente específico de grupo (GC)**

O componente específico de grupo (GC) é uma α-globulina de estrutura monomérica que tem a capacidade de se ligar à vitamina D, e está envolvida no seu transporte.

A existência de polimorfismo genético no *locus* GC foi demonstrada em muitos mamíferos dos quais se pode salientar o Homem (BRAUN *et al.*, 1992), o cavalo, o veado (VAN DE WEGHE *et al.*, 1982), o carneiro e o muflão (KALÁB *et al.*, 1990).

Nos bovinos, este polimorfismo foi inicialmente descrito por GAHNE (1963), que detectou através de géis de amido dois alelos em codominância (GC*A ou GC*1 e GC*B ou GC*2). Mais tarde, foram descobertos dois novos alelos, GC*C e GC*X (VAN DE WEGHE *et al.*, 1982; CHEN *et al.*, 1989).

A ligação factorial entre GC e ALB foi descoberta nos bovinos por BOUQUET *et al.* (1986), tendo já sido demonstrada em humanos (WEITKAMP *et al.*, 1966 *in* ERHARDT e SIMIANER, 1993), cavalos (SANDBERG e JUNEJA, 1978), galináceos (JUNEJA *et al.*, 1982, *in* ERHARDT e SIMIANER, 1993) e, posteriormente, também, detectada em carneiros (ERHARDT e SIMIANER, 1993).

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Colheita de amostras

Durante o período de amostragem efectuado em 1997 e 1998 foram colhidas 255 amostras de sangue correspondentes a 96 indivíduos da raça Mertolenga, 58 da raça Alentejana, 52 da raça Mirandesa e 49 da raça Maronesa. Relativamente à raça Barrosã não foram efectuadas colheitas, uma vez que já existiam dados referentes a polimorfismos bioquímicos realizados no mesmo laboratório (LEAL, 1998). Deste trabalho realizado por LEAL (1998) foram utilizados dados de 141 animais inscritos no livro genealógico, de entre os quais constam alguns indivíduos aparentados.

As colheitas efectuaram-se nas principais zonas de criação de cada raça onde se obteve uma amostragem de indivíduos não aparentados (pelo menos até à terceira geração) e uma distribuição equitativa de sexos. Porém, para a raça Mertolenga tal não foi conseguido uma vez que só foi possível ter acesso a poucos locais de recolha (Serpa, Moura e Barrancos) dos quais se obteve 75 amostras de fêmeas e 21 de machos, com alguns indivíduos aparentados.

As amostras de sangue foram colhidas em EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), que funciona como anticoagulante, e conservadas a 4°C até ao seu tratamento.

### 2.2.2 Conservação das amostras

No tratamento das proteínas cada amostra foi centrifugada a 13 000 rpm durante 10 minutos, efectuando-se em seguida a separação da fracção plasmática dos eritrócitos. Posteriormente, procedeu-se ao armazenamento dos eritrócitos a -20°C em meio de glicerol, e do plasma, à mesma temperatura, mas sem qualquer aditivo.

## 2.2.3 Tratamento das amostras

### HBB

A separação da molécula HBB por focagem isoeléctrica foi realizada mediante a utilização de hemolisados diluídos 1:10 em água bidestilada.

### CAII

As amostras de eritrócitos foram tratadas com tolueno, tendo sido depois adicionado como agente redutor uma solução de ditiotreitol (DTT) 120mM (100µl de amostra não diluída e 20µl de DTT 120mM), durante 1h a 37ºC. Antes da aplicação no gel as amostras foram diluídas numa proporção de 1:10 com água bidestilada.

### ALB

Na separação da ALB utilizaram-se amostras de plasma diluídas em água bidestilada na proporção de 1:70.

### TF

No tratamento das amostras de plasma para separação da TF efectuou-se uma diluição 1:3 com uma solução de sulfato de amónio férrico 0,15% (p/v) em ácido cítrico 60mM, seguida de incubação à temperatura ambiente durante 18h. Este tratamento tem como finalidade a saturação da molécula transferrina, uma vez que o conteúdo em ferro é também responsável pela variação do comportamento da transferrina. Antes da inserção, as amostras foram parcialmente purificadas através da adição de 5 volumes de uma solução de rivanol 0,6% (p/v) em tampão Tris/HCl 0,05M (ajusta-se o pH para valores de 9,1 com Tris 1M), seguida de centrifugação.

**GC**

As amostras de plasma foram colocadas juntamente com uma solução de neuraminidase (*Clostridium perfringens*, SIGMA type V, 1,8 U/ml) numa proporção de 1:3 durante 1h a 37°C e 16h à temperatura ambiente, o que permitiu a remoção dos resíduos de ácido siálico existente nas cadeias de hidratos de carbono ligadas à molécula. Na altura da aplicação das amostras no gel procedeu-se a uma diluição com água bidestilada numa proporção de 1:4.

## 2.2.4 Métodos de separação

A separação das proteínas por focagem isoeléctrica convencional foi realizada em matrizes de poliacrilamida (T:5%, C:3%) preparadas com auxílio de moldes artesanais com dimensões de 230x100x0,3mm.

De modo a ser possível manusear de forma adequada géis desta espessura foi incluída, nos moldes, uma película de suporte GELFIX (SERVA), à qual o gel de poliacrilamida adere firmemente. A aplicação de dimetildiclorosilano na placa de vidro em contacto com o gel destinou-se a facilitar a sua remoção do molde.

Os catalizadores da reacção de polimerização adicionados aos componentes da solução foram N,N,N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED) 99% (v/v) e persulfato de amónia (PSA) 10% (p/v). Após a introdução da solução do gel no molde, este foi colocado durante uma hora na estufa, à temperatura de 37°C, para polimerizar ou à temperatura ambiente durante toda a noite.

As separações decorreram sobre uma placa de arrefecimento a 8-10°C.

**HBB**

A composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados na separação da molécula nativa da HBB estão indicados na tabela 2.1 e 2.2, respectivamente.

**Tabela 2.1**: Solução de polimerização utilizada para separação da molécula nativa de HBB por focagem isoeléctrica.

| Componentes do gel | Quantidades |
|---|---|
| *Ready Solution* 40% (PHARMACIA) | 1,250 ml |
| Sacarose | 2 g |
| Anfólitos 5-8 (PHARMACIA) | 300 µl |
| Anfólitos 7-9 (PHARMACIA) | 300 µl |
| Água bidestilada | até 10 ml volume final |
| TEMED 99% (v/v) | 10 µl |
| PSA 10% (p/v) | 70 µl |
| Eléctrodos | |
| Ânodo: | Ácido aspártico 0,04M |
| Cátodo: | Hidróxido de sódio 1M |

**Tabela 2.2**: Parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoeléctrica de HBB.

| | Voltagem (V) | Corrente (mA) | Potência (W) | Tempo (T) |
|---|---|---|---|---|
| **Pré-focagem** | 1500 | 25 | 1 | 30 min |
| | | | 2 | 15 min |
| | | | 3 | 15 min |
| **Focagem** | 1500 | 25 | 15 | 2h30 min |

As amostras foram aplicadas a 1,5cm do cátodo, tendo sido inseridas com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

## CAII

Para a separação de CAII por focagem isoeléctrica utilizou-se a técnica descrita por BOWLING *et al.* (1990), com algumas modificações. A composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados estão indicados nas tabelas 2.3 e 2.4, respectivamente.

A inserção das amostras efectuou-se a 1,5cm do cátodo com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

**Tabela 2.3**: Solução de polimerização utilizada na separação de CAII por focagem isoeléctrica.

| Componentes do gel | Quantidades |
|---|---|
| *Ready Solution* 40% (PHARMACIA) | 1,250 ml |
| Sacarose | 2 g |
| Anfólitos 4-6,5 (PHARMACIA) | 500 µl |
| Anfólitos 7-9 (PHARMACIA) | 100 µl |
| Água bidestilada | até 10 ml volume final |
| TEMED 99% (v/v) | 10 µl |
| PSA 10% (p/v) | 70 µl |
| Eléctrodos | |
| Ânodo: | Ácido aspártico 0,04M |
| Cátodo: | Hidróxido de sódio 1M |

**Tabela 2.4**: Parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoeléctrica de CAII.

| | Voltagem (V) | Corrente (mA) | Potência (W) | Tempo (T) |
|---|---|---|---|---|
| **Pré-focagem** | 1500 | 25 | 1 | 30 min |
| | | | 2 | 15 min |
| | | | 3 | 15 min |
| **Focagem** | 2500 | 25 | 8 | 30 min |
| | | | 10 | 30 min |
| | | | 12 | 30 min |

## ALB

Nas tabelas 2.5 e 2.6 indicam-se, respectivamente, a composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados na separação de ALB por focagem isoeléctrica, segundo a técnica descrita por ROCHA *et al.* (1991), com algumas modificações.

**Tabela 2.5**: Solução de polimerização utilizada na separação de ALB por focagem isoeléctrica.

| Componentes do gel | Quantidades |
|---|---|
| *Ready Solution* 40% (PHARMACIA) | 1,250 ml |
| Ureia | 4,8 g |
| Anfólitos 5-6 (PHARMACIA) | 250 µl |
| Anfólitos 5-8 (PHARMACIA) | 250 µl |
| Anfólitos 6-8 (PHARMACIA) | 125 µl |
| Água bidestilada | até 10 ml volume final |
| TEMED 99% (v/v) | 10 µl |
| PSA 10% (p/v) | 70 µl |
| Eléctrodos | |
| Ânodo: | Ácido aspártico 0,04M |
| Cátodo: | Hidróxido de sódio 1M |

**Tabela 2.6**: Parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoeléctrica de ALB.

| | Voltagem (V) | Corrente (mA) | Potência (W) | Tempo (T) |
|---|---|---|---|---|
| **Pré-focagem** | 1500 | 25 | 1 | 30 min |
| | | | 2 | 15 min |
| | | | 3 | 15 min |
| **Focagem** | 1500 | 25 | 4 | 3 h |
| | | | 5 | 30 min |

As amostras foram aplicadas a 1,5cm do cátodo, com auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

**TF**

A separação da molécula de TF foi efectuada por focagem isoeléctrica. A composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados estão indicados nas tabelas 2.7 e 2.8, respectivamente.

**Tabela 2.7**: Solução de polimerização utilizada na separação de TF por focagem isoeléctrica.

| Componentes do gel | Quantidades |
|---|---|
| *Ready Solution* 40% (PHARMACIA) | 1,250 ml |
| Ureia | 4,8 g |
| Anfólitos 3,5-5 (PHARMACIA) | 100 µl |
| Anfólitos 4-6,5 (PHARMACIA) | 500 µl |
| Água bidestilada | Até 10 ml volume final |
| TEMED 99% (v/v) | 10 µl |
| PSA 10% (p/v) | 70 µl |
| Eléctrodos | |
| Ânodo: | Ácido aspártico 0,04M |
| Cátodo: | Hidróxido de sódio 1M |

**Tabela 2.8**: Parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoeléctrica de TF.

| | Voltagem (V) | Corrente (mA) | Potência (W) | Tempo (T) |
|---|---|---|---|---|
| **Pré-focagem** | 1500 | 25 | 1 | 20 min |
| | | | 2 | 10 min |
| | | | 3 | 10 min |
| **Focagem** | 2500 | 25 | 8 | 30 min |
| | | | 10 | 30 min |
| | | | 12 | 30 min |

As amostras foram aplicadas a 1,5cm do cátodo, com o auxílio de um aplicador de borracha silicone (SERVA).

## GC

Nas tabelas 2.9 e 2.10 apresenta-se, respectivamente, a composição da solução de polimerização e os parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoeléctrica de GC.

**Tabela 2.9**: Solução de polimerização utilizada na separação de GC por focagem isoeléctrica.

| Componentes do gel | Quantidades |
|---|---|
| *Ready Solution* 40% (PHARMACIA) | 1,250 ml |
| Sacarose | 2 g |
| Anfólitos 4,5-5,4 (PHARMACIA) | 437 µl |
| Anfólitos 4-6 (PHARMACIA) | 188 µl |
| Água bidestilada | Até 10 ml volume final |
| TEMED 99% (v/v) | 10 µl |
| PSA 10% (p/v) | 70 µl |
| Eléctrodos | |
| Ânodo: | Ácido aspártico 0,04M |
| Cátodo: | Hidróxido de sódio 0,2M |

**Tabela 2.10**: Parâmetros eléctricos utilizados na focagem isoeléctrica de GC.

| | Voltagem (V) | Corrente (mA) | Potência (W) | Tempo (T) |
|---|---|---|---|---|
| **Pré-focagem** | 1500 | 25 | 1 | 30 min |
| | | | 2 | 15 min |
| | | | 3 | 15 min |
| **Focagem** | 1500 | 25 | 4 | 3 h |
| | | | 5 | 30 min |

As amostras foram inseridas com o auxílio de um aplicador de borracha de silicone (SERVA), colocado a 1,5cm do cátodo.

## 2.2.5 Métodos de detecção

### HBB

Para a visualização da hemoglobina não foi necessário qualquer tipo de tratamento uma vez que a coloração da própria molécula permitiu a visualização dos diferentes fenótipos. Utilizou-se, simplesmente, um fixador de maneira a não permitir a dispersão das bandas (imersão do gel numa solução de ácido tricloroacético 12,5% (p/v), durante 10 minutos).

### ALB, TF, CAII

A detecção das proteínas ALB, TF, CAII foi realizada mediante a coloração geral de proteínas, e que é descrita da seguinte maneira: colocação do gel durante 5-10 minutos numa solução de Coomassie R-250 0,115% (p/v) com ácido acético:etanol:água destilada (4:25:71) após aquecimento seguido de filtração. O contraste desejado foi obtido através da realização de sucessivas descolorações com uma solução idêntica de ácido acético, etanol e água destilada, também aquecida a cerca de 60°C.

### GC

A visualização da GC efectuou-se por detecção imunoenzimática após transferência da proteína para uma membrana de nitrocelulose (*immunoblotting*) (0,45µm; SCHLEICHER e SCHULL). Após o processo de transferência (com duração aproximadamente de 1h), as membranas de nitrocelulose foram lavadas 3 vezes (15 minutos) numa solução de Tween 20 (MERCK) 0,025% (v/v) em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS: $NaHPO_4$ 50mM, $KH_2PO_4$ 18mM, NaCl 147mM, pH=7,1), e bloqueadas numa solução de leite em pó magro (5% p/v em PBS) durante 18h, com agitação permanente e à temperatura ambiente.

Após nova lavagem com Tween 20/PBS (3 vezes 15 minutos), aplicou-se o primeiro antisoro (anti-GC humana, ATAB 81936), diluído 1:170 em PBS com 1% (p/v) de albumina sérica bovina (SIGMA), durante 1h à temperatura ambiente.

Repetiu-se o passo da lavagem com Tween 20 nas condições já referidas, e aplicou-se o segundo antisoro (anticorpos contra imunoglobulinas caprinas desenvolvidos em coelho, e conjugados com uma peroxidase; ATAB 83806), diluído 1:600 em PBS com1% (p/v) de albumina sérica bovina (SIGMA), durante 1h à temperatura ambiente.

Finalmente, e depois de duas lavagens (5min) com Tween 20/PBS, a detecção de GC foi feita com uma solução de 9-amino-2-etilcarbazol 0,04% (p/v) e de metanol 20% (v/v) em PBS. As bandas correspondentes à actividade peroxidásica aparecem quase de imediato, parando-se a reacção com água bidestilada.

## 2.2.6 Análise estatística

A variabilidade genética das diferentes populações foi estudada através da análise estatística dos dados obtidos, utilizando o programa GENEPOP versão 3.1b (RAYMOND e ROUSSET, 1995): i) cálculo das frequências génicas a partir da distribuição fenotípica obtida; ii) cálculo do teste exacto (GUO e THOMPSON, 1992) de acordo com o formalismo de Hardy-Weinberg; iii) cálculo dos valores de heterozigotia média (H) segundo a fórmula corrigida para baixos efectivos (*unbiased estimates*; NEI, 1978) e do número médio de alelos por *locus* ($n_a$).

A probabilidade de exclusão *a priori* foi calculada segundo JAMIESON (1994), para cada *locus* e raça, de modo a verificar o seu potencial uso em análises de paternidade.

Para testar desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg entre os valores observados e esperados de heterozigotia obtidos para cada um dos *loci* analisados, nas cinco populações estudadas, utilizou-se um teste de $\chi^2$, tal como sugerido por ZAJC, (1996):

$$\chi^2 = (1\text{-Ho/He})^2.n,$$

em que Ho-heterozigotia observada, He-heterozigotia esperada, n-tamanho populacional. O número de graus de liberdade foi calculado de acordo com a fórmula:

$$d.f.=r.(r-1)/2,$$

onde r é o número de alelos num *locus*.

A análise de variações temporais das frequências génicas de oito populações ibéricas foi realizada por recurso a tabelas de contingência através de testes $\chi^2$. Para verificar a existência de diferenças significativas entre os valores de heterozigotia obtidos

para os *loci* analisados em dois períodos amostrais recorreu-se ao teste t de *Student*, utilizando o programa STATSFOT (1994).

# 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 2.3.1 Análise dos métodos de separação

### HBB

A utilização da focagem isoeléctrica permitiu observar a presença de dois alelos codominantes, HBB*A e HBB*B (figura 2.1), no conjunto das cinco raças estudadas. Resultados idênticos estão descritos nas raças bovinas europeias (VICENTE, 1978; KIDD *et al.*, 1980; GONZALEZ *et al.*, 1987).

Nas raças Barrosã e Maronesa foi apenas encontrado o alelo HBB*A, sendo provável que este se encontre fixado nestas duas raças, tal como acontece noutras raças europeias.

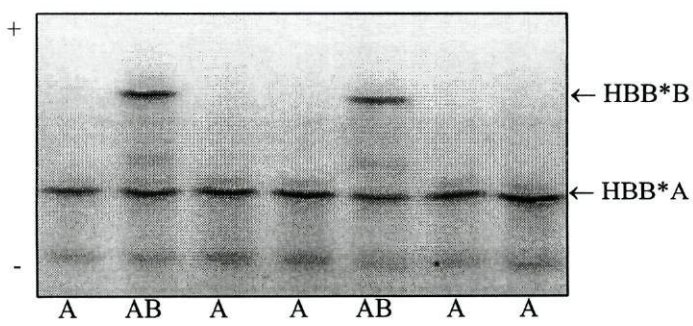



**Figura 2.1** – Separação da hemoglobina nativa por focagem isoeléctrica.

### CA

Na anidrase carbónica foram detectados três fenótipos, CAII*F, CAII*FS e CAII*S, atribuídos à expressão de dois alelos codominantes (figura 2.2).

Cada alelo expressa-se numa só banda, sendo o alelo CAII*F mais anódico que o CAII*S.

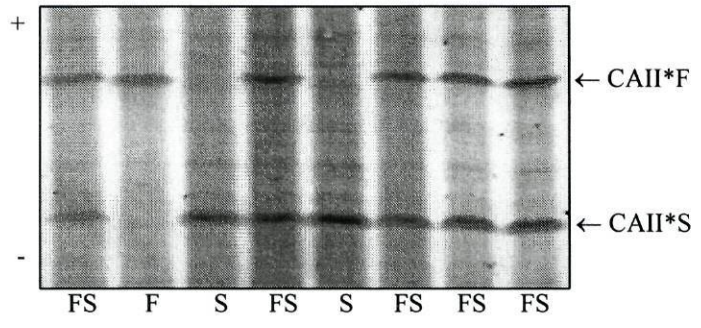



**Figura 2.2** – Fenótipos de CAII observados por focagem isoeléctrica, após coloração geral de proteínas.

## ALB

No trabalho realizado por LEAL (1998) foram identificados na raça Barrosã 3 alelos codominantes (ALB*A, ALB*B e ALB*V, sendo este último raro); nas restantes raças analisadas neste trabalho detectaram-se apenas dois alelos (figura 2.3). Nas raças europeias os alelos ALB*A e ALB*B são os mais frequentes, aparecendo, no entanto, outros alelos com frequências muito reduzidas (SPOONER e OLIVER, 1969 e BOUQUET e VAN DE WEGHE, 1972 *in* IGLESIAS, 1989).

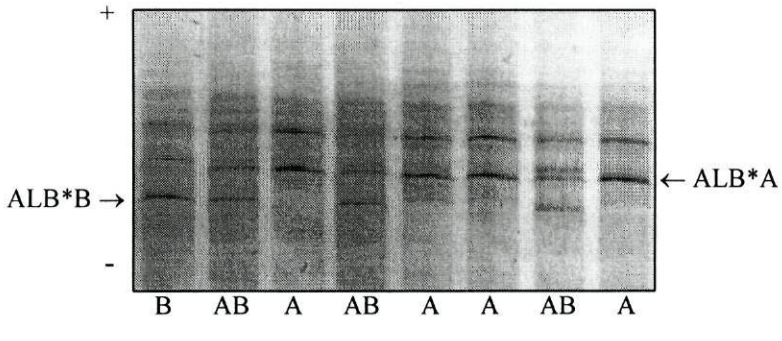



**Figura 2.3** – Fenótipos de ALB determinados por focagem isoeléctrica na presença de ureia 8M.

Cada indivíduo homozigótico é representado por 3 bandas, duas de maior intensidade e uma mais acídica, de menor intensidade. Os indivíduos heterozigóticos podem apresentar até 6 bandas.

## TF

Na figura 2.4 apresentam-se os padrões observados para a molécula de transferrina. Nas cinco raças autóctones em estudo foram identificados 4 alelos em codominância, TF*A, TF*D1, TF*D2 e TF*E, dos oito alelos já descritos para este *locus*. A expressão fenotípica dos alelos em homozigotia caracteriza-se pela presença de dois dupletos de bandas, aparecendo a banda mais acídica de cada dupleto com intensidade mais fraca. Os indivíduos heterozigóticos podem apresentar até oito bandas. O alelo TF*A encontra-se numa zona mais anódica relativamente aos outros alelos, o alelo TF*E numa zona mais catódica, e D1 e D2 encontram-se numa área intermédia entre estes dois alelos.

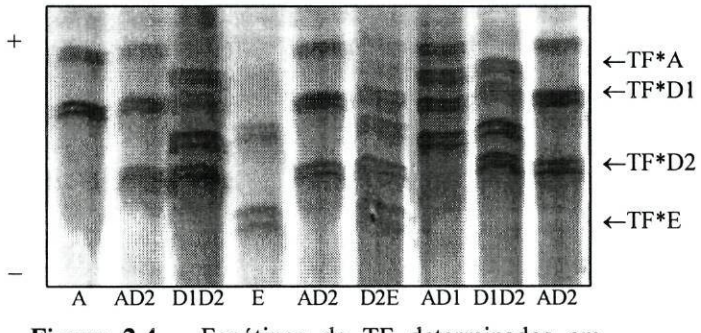



**Figura 2.4** – Fenótipos de TF determinados em amostras de plasma saturadas com uma solução de sulfato de amónio férrico.

## GC

Na figura 2.5 apresentam-se alguns fenótipos obtidos na separação da GC por focagem isoeléctrica. Cada alelo apresenta duas bandas, uma mais forte e anódica e outra mais fraca e acídica.

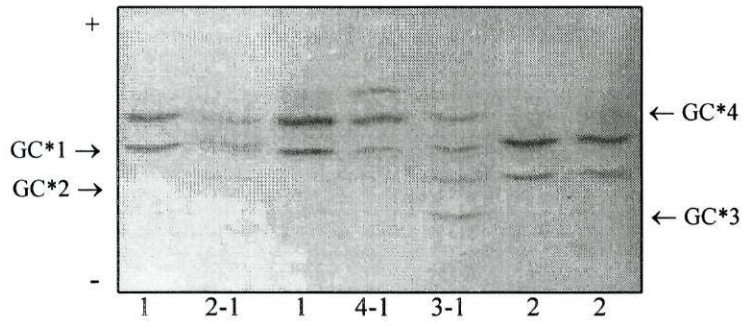



**Figura 2.5** – Fenótipos de GC determinados por focagem isoeléctrica.

Foram encontrados quatro alelos, dois deles, GC*3 e GC*4, de baixa frequência e ainda não descritos nas raças europeias. VAN DE WEGHE *et al.* (1982), na raça White and Red East Flemish, descreveram um alelo, para além dos alelos GC*1 (S ou B) e GC*2 (F ou A), que denominaram de GC*C, com uma frequência razoável (0,29) em 1411 indivíduos fenotipados. No entanto, devido à falta de referências sobre a sua mobilidade relativamente aos alelos GC*1 e GC*2, poderá ou não corresponder a um dos novos alelos descritos neste trabalho.

## 2.3.2 Análise populacional *locus* a *locus*

### HBB

Os resultados obtidos no estudo do *locus* HBB permitiram distinguir dois fenótipos, definidos por dois alelos, HBB*A e HBB*B (tabela 2.11). Não foi encontrado qualquer desvio significativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

**Tabela 2.11:** Distribuição fenotípica de HBB em cinco raças autóctones portuguesas. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg estão indicados entre parêntesis.

| | | Fenótipos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | N | HBB A | HBB AB | HBB B | P* |
| Barrosã | 141 | 141 | - | - | - |
| Maronesa | 49 | 49 | - | - | - |
| Mirandesa | 52 | 49 (49,0) | 3 (2,9) | 0 (0,0) | 1,000 |
| Mertolenga | 95 | 85 (85,2) | 10 (9,5) | 0 (0,2) | 1,000 |
| Alentejana | 58 | 54 (54,0) | 4 (4,0) | 0 (0,1) | 1,000 |

* P – valor de probabilidade correspondente ao teste exacto (± desvio padrão)

As frequências génicas estimadas das raças estudadas, bem como outras já publicadas referentes a várias raças bovinas europeias, encontram-se indicadas na tabela 2.12.

A sua análise revela a baixa diversidade existente, neste *locus,* nas várias raças europeias, encontrando-se apenas dois alelos. Destes o alelo HBB*A encontra-se fixado nas raças Barrosã, Maronesa, Cachena, Limiana e Friesian espanhola, e com elevada frequência nas restantes raças europeias, com excepção da Jersey.

Contudo, é um *locus* relevante na diferenciação dos dois principais grupos de bovinos, *Bos taurus* e *Bos indicus*. De facto, o produto génico HBB*B de baixa frequência nas raças taurinas é encontrado em frequências superiores em raças zebuínas atingindo valores de 0,5 (BRAEND, 1971). Em raças africanas, a frequência deste alelo oscila entre 0,1 e 0,5 (BRAEND, 1971). Além disso, em raças zebuínas existem outros alelos de baixa frequência e que não são encontrados nas raças taurinas (CECHINI e NIJS, 1986).

**Tabela 2.12:** Frequências génicas de HBB em várias populações de raças bovinas.

| | N | Frequências génicas | | | Referência |
|---|---|---|---|---|---|
| | | HBB*A | HBB*B | HBB*C | |
| **Portugal** | | | | | |
| Barrosã | 141 | 1,00 | - | - | LEAL (1998) |
| Maronesa | 49 | 1,00 | - | - | Este trabalho |
| Mirandesa | 52 | 0,97 ± 0,02 | 0,03 ± 0,02 | - | " |
| Mertolenga | 95 | 0,95 ± 0,02 | 0,05 ± 0,02 | - | " |
| Alentejana | 58 | 0,97 ± 0,02 | 0,03 ± 0,02 | - | " |
| Minhota | 62 | 0,95 ± 0,02 | 0,05 ± 0,02 | - | LEAL (1998) |
| Arouquesa | 63 | 0,91 ± 0,02 | 0,09 ± 0,02 | - | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| **Espanha** | | | | | |
| Cachena | 27 | 1,00 | - | - | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| Caldelana | 33 | 0,98 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | - | " |
| Frieiresa | 26 | 0,98 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | - | " |
| Limiana | 26 | 1,00 | - | - | " |
| Vianesa | 31 | 0,98 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | - | " |
| Rubia Gallega | 168 | 0,93 ± 0,01 | 0,07 ± 0,01 | - | IGLESIAS (1989) |
| Sayaguesa (Zamora) | 147 | 0,83 ± 0,02 | 0,17 ± 0,02 | - | GONZALEZ *et al.* (1987) |
| Morucha (Salamanca) | 101 | 0,84 ± 0,03 | 0,16 ± 0,03 | - | " |
| Alistana Sanabresa | 157 | 0,99 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | - | " |
| Blanca Cacereña | 62 | 0,71 ± 0,04 | 0,29 ± 0,04 | - | " |
| Cárdena Andaluza | 25 | 0,96 ± 0,03 | 0,04 ± 0,03 | - | " |
| Asturiana de los Valles | 127 | 0,91 ± 0,02 | 0,09 ± 0,02 | - | " |
| Asturiana de la Montaña | 106 | 0,79 ± 0,03 | 0,21 ± 0,03 | - | " |
| Pirenaica | 383 | 0,84 ± 0,01 | 0,16 ± 0,01 | - | VICENTE (1978) |
| Tudanca | 42 | 0,65 ± 0,05 | 0,35 ± 0,05 | - | " |
| Friesian | 97 | 1,00 | - | - | " |
| De Lidia | 124 | 0,79 ± 0,03 | 0,21 ± 0,03 | - | KIDD *et al.* (1980) |
| Retinta | 164 | 0,81 ± 0,02 | 0,19 ± 0,02 | - | " |
| **Itália** | | | | | |
| Chianina | 264 | 0,96 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | - | CARENZI *et al.* (1970)* |
| Marchigiana | 112 | 0,99 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | - | " |
| **G. Bretanha** | | | | | |
| Jersey | 467 | 0,38 ± 0,02 | 0,62 ± 0,02 | - | LARSEN *et al.* (1974)* |

**in* IGLESIAS (1989)

## CAII

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* CAII apresenta-se na tabela 2.13. Foram identificados três fenótipos atribuídos a dois alelos, CA*F e CA*S.

**Tabela 2.13:** Distribuição fenotípica de CAII em cinco raças bovinas portuguesas. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| | | Fenótipos | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | N | CAII F | CAII FS | CAII S | P* |
| Barrosã | 141 | 17 | 58 | 66 | 0,446 ± 0,003 |
| | | (14,9) | (62,2) | (63,9) | |
| Maronesa | 49 | 3 | 27 | 19 | 0,197 ± 0,002 |
| | | (5,4) | (22,1) | (21,4) | |
| Mirandesa | 52 | 0 | 3 | 49 | 1,000 |
| | | (0,0) | (2,9) | (49,0) | |
| Mertolenga | 95 | 2 | 16 | 77 | 0,260 ± 0,002 |
| | | (1,0) | (18,0) | (76,0) | |
| Alentejana | 58 | 4 | 23 | 31 | 1,000 |
| | | (4,0) | (22,9) | (31,0) | |

* P – valor de probabilidade correspondente ao teste exacto (± desvio padrão)

Não se verificaram diferenças significativas entre os valores observados e os esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Na tabela 2.14 comparam-se as frequências génicas de CAII estimadas nas amostras investigadas durante este trabalho com as publicadas por outros autores.

O *locus* CAII apresenta-se polimórfico na maior parte das populações bovinas europeias aqui comparadas, sendo CAII*S o alelo que ocorre com frequência mais elevada.

Das raças portuguesas apresentadas na tabela, a Mirandesa é a que apresenta uma frequência mais baixa do alelo CAII*F, à semelhança das raças Limiana e Alistana Sanabresa que, segundo SANCHEZ BELDA (1984), pertencem ao tronco Cantábrico (caracterizado pela cor castanha e perfil côncavo) e se encontram geograficamente próximas. É de salientar, ainda, a grande semelhança existente entre as frequências alélicas das raça Barrosã e Maronesa.

Dados obtidos por CECCHINI e NIJS (1986) indicam que as raças pertencentes ao grupo *Bos indicus* apresentam, geralmente, frequências mais elevadas para o alelo CAII*S, o que revela que o *locus* CAII não é muito útil na diferenciação dos grandes grupos raciais.

**Tabela 2.14:** Frequências génicas de CAII em várias populações de raças bovinas.

| | N | Frequências génicas | | Referência |
|---|---|---|---|---|
| | | CAII*S | CAII*F | |
| **Portugal** | | | | |
| Barrosã | 141 | 0,68 ± 0,03 | 0,32 ± 0,03 | LEAL (1998) |
| Maronesa | 49 | 0,66 ± 0,05 | 0,34 ± 0,05 | Este trabalho |
| Mirandesa | 52 | 0,97 ± 0,02 | 0,03 ± 0,02 | " |
| Mertolenga | 95 | 0,89 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 | " |
| Alentejana | 58 | 0,73 ± 0,04 | 0,27 ± 0,04 | " |
| Minhota | 62 | 0,85 ± 0,03 | 0,15 ± 0,03 | LEAL (1998) |
| Arouquesa | 63 | 0,82 ± 0,03 | 0,18 ± 0,03 | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| **Espanha** | | | | |
| Cachena | 27 | 0,74 ± 0,06 | 0,26 ± 0,06 | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| Caldelana | 33 | 0,88 ± 0,04 | 0,12 ± 0,04 | " |
| Frieiresa | 26 | 0,83 ± 0,05 | 0,17 ± 0,05 | " |
| Limiana | 26 | 0,94 ± 0,03 | 0,06 ± 0,03 | " |
| Vianesa | 31 | 0,89 ± 0,04 | 0,11 ± 0,04 | " |
| Rubia Gallega | 168 | 0,89 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 | IGLESIAS (1989) |
| Sayaguesa | 147 | 0,72 ± 0,03 | 0,28 ± 0,03 | GONZALEZ *et al.* (1987) |
| Morucha | 101 | 0,72 ± 0,03 | 0,28 ± 0,03 | " |
| Alistana Sanabresa | 157 | 0,92 ± 0,02 | 0,08 ± 0,02 | " |
| Blanca Cacereña | 62 | 0,67 ± 0,04 | 0,33 ± 0,04 | " |
| Cárdena Andaluza | 25 | 1,00 | - | " |
| Asturiana de los Valles | 127 | 0,87 ± 0,02 | 0,13 ± 0,02 | " |
| Asturiana de la Montaña | 106 | 0,77 ± 0,03 | 0,23 ± 0,03 | " |
| Tudanca | 42 | 0,76 ± 0,05 | 0,24 ± 0,05 | VICENTE (1978) |
| De Lidia | 124 | 0,61 ± 0,03 | 0,39 ± 0,03 | KIDD *et al.* (1980) |
| Retinta | 164 | 0,65 ± 0,03 | 0,35 ± 0,03 | " |
| **Alemanha** | | | | |
| Friesian | 550 | 0,83 ± 0,01 | 0,17 ± 0,01 | THINNES *et al.* (1976)* |
| **Suíça** | | | | |
| Simmental | 1039 | 0,79 ± 0,01 | 0,21 ± 0,01 | KASTLI *et al.* (1980)* |
| Swiss Brown | 546 | 0,87 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | " |
| Friburg | 223 | 0,84 ± 0,02 | 0,16 ± 0,02 | " |

**in* IGLESIAS (1989)

## ALB

A distribuição dos fenótipos observados para o *locus* ALB apresenta-se na tabela 2.15. Na raça Mertolenga verifica-se um desvio significativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, devendo-se, provavelmente, o excesso de indivíduos homozigóticos para o produto génico ALB*B, à existência de subestruturação. Em relação às outras raças, os valores observados não são significativamente diferentes dos esperados.

**Tabela 2.15:** Distribuição fenotípica de ALB em cinco raças bovinas portuguesas. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| | | Fenótipos | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | ALB A | ALB AB | ALB B | ALB BV | ALB AV | ALB V | P* |
| Barrosã | 141 | 136 | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1,000 |
| | | (136,0) | (3,0) | (0,0) | (0,0) | (2,0) | (0,0) | |
| Maronesa | 49 | 44 | 5 | 0 | - | - | - | 1,000 |
| | | (44,1) | (4,8) | (0,1) | | | | |
| Mirandesa | 51 | 48 | 3 | 0 | - | - | - | 1,000 |
| | | (48,0) | (2,9) | (0,0) | | | | |
| Mertolenga | 96 | 70 | 16 | 10 | - | - | - | 0,000 ± 0,000 |
| | | (63,3) | (29,4) | (3,3) | | | | |
| Alentejana | 58 | 31 | 21 | 6 | - | - | - | 0,519 ± 0,002 |
| | | (29,6) | (23,8) | (4,6) | | | | |

P* – valor de probabilidade correspondente ao teste exacto (± desvio padrão)

Na tabela 2.16 estão discriminadas as frequências génicas estimadas para as populações em estudo, indicando-se, ainda, para comparação, os valores encontrados noutras populações bovinas da Europa.

Pela análise da tabela verifica-se que ALB*A é o alelo mais comum, encontrando-se aparentemente fixado em algumas raças europeias. Relativamente ao alelo ALB*B, para as raças portuguesas, verifica-se uma variação conforme a região geográfica, apresentando valores de 0,19 a 0,28 nas raças do Sul, enquanto que nas raças do Norte os valores são consideravelmente mais baixos (0,01 a 0,05), encontrando-se ausente nas raças Minhota e Arouquesa. Esta diferenciação geográfica já não se verifica para as raças espanholas.

**Tabela 2.16:** Frequências génicas de ALB em várias populações de raças bovinas.

| | N | Frequências génicas | | | Referência |
|---|---|---|---|---|---|
| | | ALB*A (F) | ALB*B (S) | ALB*V | |
| **Portugal** | | | | | |
| Barrosã | 141 | 0,98 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | LEAL (1998) |
| Maronesa | 49 | 0,95 ± 0,02 | 0,05 ± 0,02 | - | Este trabalho |
| Mirandesa | 51 | 0,97 ± 0,02 | 0,03 ± 0,02 | - | " |
| Mertolenga | 96 | 0,81 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03 | - | " |
| Alentejana | 58 | 0,72 ± 0,04 | 0,28 ± 0,04 | - | " |
| Minhota | 62 | 0,98 ± 0,01 | - | 0,02 ± 0,01 | LEAL (1998) |
| Arouquesa | 63 | 1,00 | - | - | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| **Espanha** | | | | - | |
| Cachena | 27 | 0,98 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | - | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| Caldelana | 33 | 0,98 ± 0,02 | 0,02 ± 0,02 | - | " |
| Frieiresa | 26 | 0,94 ± 0,03 | 0,06 ± 0,03 | - | " |
| Limiana | 26 | 0,88 ± 0,04 | 0,12 ± 0,04 | - | " |
| Vianesa | 31 | 0,95 ± 0,03 | 0,05 ± 0,03 | - | " |
| Rubia Gallega | 201 | 0,99 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | - | IGLESIAS (1989) |
| Sayaguesa | 147 | 0,96 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | - | GONZALEZ *et al* (1987) |
| Morucha | 101 | 0,89 ± 0,02 | 0,11 ± 0,02 | - | " |
| Alistana Sanabresa | 157 | 0,90 ± 0,02 | 0,10 ± 0,02 | - | GONZALEZ *et al* (1987) |
| Blanca Cacereña | 62 | 0,56 ± 0,05 | 0,44 ± 0,05 | - | " |
| Cárdena Andaluza | 25 | 1,00 | - | - | " |
| Asturiana de los Valles | 127 | 0,99 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | - | " |
| Asturiana de la Montaña | 106 | 0,99 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | - | " |
| Pirenaica | 265 | 0,92 ± 0,01 | 0,08 ± 0,01 | - | VICENTE (1978) |
| Tudanca | 42 | 1,00 | - | - | " |
| Friesian | 97 | 1,00 | - | - | " |
| De Lidia | 124 | 1,00 | - | - | KIDD *et al.*(1980) |
| Retinta | 164 | 0,97 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | - | " |
| **Itália** | | | | | |
| Chianina | 264 | 0,89 ± 0,01 | 0,11 ± 0,01 | - | CARENZI *et al.* (1970)* |
| Marchigiana | 124 | 0,74 ± 0,03 | 0,26 ± 0,03 | - | " |
| **Bélgica** | | | | | |
| Red Pied of East-Flandern | 503 | 1,00 | - | - | BOUQUET e VAN DE WEGHE (1972)* |
| Red of West-Flandern | 155 | 1,00 | - | - | " |
| Black Pied | 174 | 1,00 | - | - | " |
| Red Pied of Campine | 265 | 1,00 | - | - | " |

**in* IGLESIAS (1989)

(continuação)

**Tabela 2.16**: Frequências de ALB em várias populações de raças bovinas (continuação).

| | | Frequências génicas | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | N | ALB*A (F) | ALB*B (S) | ALB*V | Referência |
| **G. Bretanha** | | | | | |
| Charolais | 99 | 0,84 ± 0,03 | 0,16 ± 0,03 | - | SPOONER & OLIVER (1969)* |
| Friesian | 1422 | 1,00 | - | - | " |
| Hereford | 215 | 0,99 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | - | " |
| Jersey | 217 | 1,00 | - | - | " |

**in* IGLESIAS (1989)

Tal como o *locus* HBB, o *locus* ALB é importante na diferenciação das raças de *Bos taurus* e *Bos indicus*, uma vez que o alelo ALB*B aparece com frequência elevada nestas últimas (0,46 a 0,67) (CECCHINI e NIJS, 1986).

A frequência considerável do alelo ALB*B nas raças do Sul de Portugal poderá dever-se à existência de alguma miscigenação com raças introduzidas nos finais da década de 50 nesta região (RALO *et al.*, 1979), nomeadamente a raça Santa Gertrudis* que, segundo dados obtidos por EZCURRA *et al.* (1972, *in* IGLESIAS, 1989), apresenta uma frequência para este alelo de 0,33. No entanto, só o estudo de uma adequada bateria de marcadores genéticos e o aumento do número de indivíduos amostrados poderá contribuir para o esclarecimento desta questão.

Há ainda a salientar, como aspecto interessante, a presença de um alelo raro (ALB*V) nas raças Barrosã e Minhota, encontrado por LEAL (1998), e que não se encontra descrito em mais nenhuma raça europeia.

## TF

No total das amostras analisadas foram observados 10 fenótipos para o *locus* TF originados pela expressão de 4 alelos codominantes (tabela 2.17).

É possível verificar que existe, em geral, um acordo razoável entre os valores observados e os valores esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, constituindo excepção a raça Barrosã que apresenta um ligeiro desvio (P=0,038). A causa para este desvio parece dever-se à existência de várias classes fenotípicas com baixo efectivo.

*primeira raça norte americana obtida do cruzamento programado entre a raça Brahman (3/8) e a raça Shorthorn (5/8) e estabelecida posteriormente por via selectiva.

**Tabela 2.17:** Distribuição fenotípica de TF em populações das raças autóctones portuguesas. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| | | Fenótipos | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | TF A | TF AD1 | TF AD2 | TF AE | TF D1 | TFD1D2 | TF D1E | TF D2 | TF D2E | TF E | P* |
| Barrosã. | 141 | 45 | 30 | 41 | 3 | 4 | 6 | 2 | 5 | 3 | 2 | 0,038 ± 0,002 |
| | | (47,6) | (26,9) | (35,0) | (7,0) | (3,7) | (9,8) | (2,0) | (6,3) | (2,6) | (0,3) | |
| Maronesa | 49 | 12 | - | 26 | 2 | - | - | - | 8 | 1 | 0 | 0,675 ± 0,004 |
| | | (13,7) | | (23,0) | (1,6) | | | | (9,3) | (1,3) | (0,0) | |
| Mirandesa | 51 | 26 | 4 | 15 | - | 2 | 1 | - | 3 | - | - | 0,082 ± 0,002 |
| | | (24,6) | (6,3) | (15,5) | | (0,4) | (2,0) | | (2,3) | | | |
| Mertolenga | 96 | 19 | 2 | 43 | 6 | 1 | 2 | 2 | 18 | 3 | 0 | 0,084 ± 0,004 |
| | | (20,5) | (3,7) | (39,1) | (5,1) | (0,1) | (3,5) | (0,5) | (18,2) | (4,8) | (0,3) | |
| Alentejana | 58 | 5 | 6 | 11 | 2 | 2 | 14 | 2 | 14 | 2 | 0 | 0,781 ± 0,004 |
| | | (3,5) | (6,6) | (13,9) | (1,5) | (2,8) | (12,4) | (1,4) | (12,9) | (2,9) | (0,1) | |

* P – valor de probabilidade correspondente ao teste exacto (± desvio padrão)

Na tabela 2.18 apresentam-se as frequências génicas estimadas nas raças portuguesas e em várias raças europeias. Dos quatro alelos descritos, verifica-se, em geral, uma maior frequência dos alelos TF*A e TF*D2, surgindo os restantes alelos com uma frequência mais reduzida e com distribuição mais restrita. De facto, o alelo TF*D1 não foi encontrado nas raças Maronesa e De Lidia e é muito pouco frequente nas raças Mirandesa, Mertolenga e Arouquesa, o mesmo ocorrendo com algumas raças da Galiza, nomeadamente a Caldelana, Limiana, Vianesa e Rubia Gallega. Por outro lado, o alelo TF*E surge claramente com uma frequência muito reduzida em quase todas as raças analisadas encontrando-se ausente em algumas delas. Este alelo confere ao marcador uma boa capacidade discriminante entre as raças europeias e as raças de origem africana e asiática, já que nestas últimas surge com uma frequência relativamente superior (0,082 a 0,220) (CECCHINI e NIJS, 1986; BRAEND, 1971).

**Tabela 2.18:** Frequências génicas de TF em várias populações de raças bovinas.

| | | Frequências génicas | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | TF*A | TF*D1 | TF*D2 | TF*E | Referência |
| **Portugal** | | | | | | |
| Barrosã | 141 | 0,58 ± 0,03 | 0,16 ± 0,02 | 0,21 ± 0,02 | 0,05 ± 0,01 | LEAL (1998) |
| Maronesa | 49 | 0,53 ± 0,05 | - | 0,44 ± 0,05 | 0,03 ± 0,02 | Este trabalho |
| Mirandesa | 51 | 0,69 ± 0,05 | 0,09 ± 0,03 | 0,22 ± 0,04 | - | " |
| Mertolenga | 96 | 0,46 ± 0,04 | 0,04 ± 0,01 | 0,44 ± 0,04 | 0,06 ± 0,02 | " |
| Alentejana | 58 | 0,25 ± 0,04 | 0,23 ± 0,04 | 0,47 ± 0,05 | 0,05 ± 0,02 | " |
| Minhota | 62 | 0,36 ± 0,04 | 0,19 ± 0,04 | 0,45 ± 0,05 | - | LEAL (1998) |
| Arouquesa | 63 | 0,45 ± 0,04 | 0,09 ± 0,02 | 0,32 ± 0,04 | 0,14 ± 0,03 | FERNÁNDEZ *et al.* (1998) |
| **Espanha** | | | | | | |
| Cachena | 27 | 0,35 ± 0,06 | 0,13 ± 0,05 | 0,46 ± 0,07 | 0,06 ± 0,03 | FERNÁNDEZ *et al.* (1998) |
| Caldelana | 33 | 0,42 ± 0,06 | 0,01 ± 0,01 | 0,56 ± 0,06 | - | " |
| Frieiresa | 26 | 0,52 ± 0,07 | 0,10 ± 0,04 | 0,38 ± 0,07 | - | " |
| Limiana | 26 | 0,54 ± 0,07 | 0,04 ± 0,03 | 0,42 ± 0,07 | - | " |
| Vianesa | 31 | 0,68 ± 0,06 | 0,03 ± 0,02 | 0,29 ± 0,06 | | " |
| Rubia Gallega | 201 | 0,45 ± 0,03 | \|-----0,52 ± 0,03-----\| | | 0,03 ± 0,01[§] | IGLESIAS (1989) |
| Sayaguesa | 147 | 0,54 ± 0,03 | \|-----0,44 ± 0,03-----\| | | 0,02 ± 0,01 | GONZALEZ *et al.* (1987) |
| Morucha | 101 | 0,41 ± 0,04 | \|-----0,51 ± 0,04-----\| | | 0,08 ± 0,02 | " |
| Alistana Sanabresa | 157 | 0,54 ± 0,03 | \|-----0,45 ± 0,03-----\| | | 0,01 ± 0,01 | " |
| Blanca Cacereña | 62 | 0,92 ± 0,02 | \|-----0,08 ± 0,02-----\| | | - | " |
| Cárdena Andaluza | 25 | 0,68 ± 0,07 | \|-----0,32 ± 0,07-----\| | | - | " |
| Asturiana Valles | 127 | 0,46 ± 0,03 | \|-----0,51 ± 0,03-----\| | | 0,03 ± 0,01 | " |

*in* IGLESIAS (1989); [§] corresponde à soma da frequência do alelo TF*E e de TF*R. (continuação)

**Tabela 2.18:** Frequências génicas de TF em várias populações de raças bovinas (continuação).

| | N | Frequências génicas | | | | Referência |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | TF*A | TF*D1 | TF*D2 | TF*E | |
| Asturiana Montaña | 106 | 0,27 ± 0,03 | \|-----0,72 ± 0,03-----\| | | 0,01 ± 0,01 | GONZALEZ *et al.* (1987) |
| Pirenaica | 381 | 0,53 ± 0,02 | 0,16 ± 0,01 | 0,30 ± 0,02 | 0,01 ± 0,00 | VICENTE (1978) |
| Tudanca | 42 | 0,32 ± 0,05 | 0,10 ± 0,03 | 0,57 ± 0,05 | 0,01 ± 0,01 | " |
| Friesian | 97 | 0,42 ± 0,04 | 0,22 ± 0,03 | 0,31 ± 0,03 | 0,05 ± 0,02 | VICENTE (1978) |
| De Lidia | 124 | 0,41 ± 0,03 | - | 0,37 ± 0,03 | 0,22 ± 0,03 | KIDD *et al.*(1980) |
| Retinta | 164 | 0,61 ± 0,02 | 0,07 ± 0,01 | 0,19 ± 0,02 | 0,13 ± 0,02 | " |
| **Itália** | | | | | | |
| Chianina | 259 | 0,33 ± 0,02 | 0,33 ± 0,02 | 0,31 ± 0,02 | 0,02 ± 0,01 | CARENZI *et al.* (1970)* |
| Marchigiana | 125 | 0,32 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03 | 0,34 ± 0,03 | 0,14 ± 0,02 | " |
| **Bulgária** | | | | | | |
| Sofia Brown | 173 | 0,30 ± 0,03 | \|-----0,67 ± 0,03-----\| | | 0,03 ± 0,01 | MAKAVEEV (1970)* |
| Grey Iskar | 265 | 0,38 ± 0,02 | \|-----0,47 ± 0,02-----\| | | 0,15 ± 0,02 | " |
| **Alemanha** | | | | | | |
| Schwarzbunte | 1975 | 0,50 ± 0,01 | 0,18 ± 0,01 | 0,26 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 | GELDERMAN (1972)* |
| Rotbunte | 1014 | 0,51 ± 0,01 | 0,19 ± 0,01 | 0,23 ± 0,01 | 0,05 ± 0,01 | " |

*in* IGLESIAS (1989)

## GC

Na tabela 2.19 indica-se a distribuição dos fenótipos observados para o *locus* GC.

É possível observar a existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg nas raças portuguesas analisadas, com excepção da Mertolenga que apresenta um ligeiro excesso de indivíduos homozigóticos (P=0,045).

**Tabela 2.19:** Distribuição fenotípica de GC em cinco raças bovinas portuguesas. Entre parêntesis indicam-se os valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

| | N | Fenótipos | | | | | | | P* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GC 1 (F ou A) | GC 21 | GC 31 | GC 41 | GC 2 (S ou B) | GC 32 | outros | |
| Barrosã | 142 | 8 | 35 | - | - | 98 | - | - | 0,081 ± 0,001 |
| | | (4,5) | (41,9) | | | (94,5) | | | |
| Maronesa | 49 | 26 | 15 | 1 | 1 | 6 | 0 | 0 | 0,349 ± 0,009 |
| | | (24,2) | (19,2) | (0,7) | (0,7) | (3,6) | (0,3) | (0,3) | |
| Mirandesa | 51 | 2 | 11 | 0 | - | 37 | 1 | - | 0,393 ± 0,006 |
| | | (1,0) | (12,8) | (0,1) | | (36,2) | (0,8) | | |
| Mertolenga | 96 | 12 | 31 | - | - | 53 | | - | 0,045* ± 0,001 |
| | | (7,8) | (39,4) | | | (48,8) | | | |
| Alentejana | 58 | 8 | 20 | 1 | - | 28 | 1 | - | 0,276 ± 0,004 |
| | | (5,8) | (24,8) | (0,6) | | (25,4) | (1,3) | | |

* P – valor de probabilidade correspondente ao teste exacto (± desvio padrão)

A distribuição das frequências génicas apresentada na tabela 2.20 revela que GC*2 é o alelo mais comum nas raças europeias. A população Maronesa manifesta, contudo, alguma diferenciação relativamente às restantes. Na verdade, além de possuir uma frequência elevada para o alelo GC*1, ocorrem ainda nesta população dois outros alelos: GC*3 e GC*4. Este último alelo é, aparentemente, privativo desta raça. Quanto a GC*3, foi também detectado na Mirandesa e na Alentejana numa frequência muito semelhante.

A raça Red White Flemish da Bélgica possui um alelo designado GC*C com frequência de 0,29, porém, a escassez de dados referentes à sua mobilidade não permite concluir se existe correspondência com algum dos alelos GC*3 ou GC*4.

Um aspecto interessante a salientar é o facto de a raça Friesian apresentar frequências génicas relativamente opostas em diferentes países, o que poderá sugerir interacção do alelo com o meio ambiente, efeitos selectivos diferenciados, miscigenação, efeito fundador ou deriva génica. O primeiro aspecto não parece ser muito plausível, uma vez que, as raças Barrosã e Maronesa apesar de se encontrarem em regiões próximas apresentam frequências génicas para o alelo GC*1 e GC*2 bastante distintas. BLOTT *et al.*, (1998a) no estudo da raça Hereford encontraram, igualmente, diferenças genéticas significativas das populações nos vários países analisados, realçando como principais causas o efeito fundador e diferentes objectivos de selecção.

**Tabela 2.20:** Frequências génicas de GC em várias populações de raças bovinas.

| | N | Frequências génicas | | | | Referência |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | GC*1 (F ou A) | GC*2 (S ou B) | GC*3 (C) | GC*4 | |
| **Portugal** | | | | | | |
| Barrosã | 141 | 0,18 ± 0,02 | 0,82 ± 0,02 | - | - | LEAL (1998) |
| Maronesa | 49 | 0,70 ± 0,05 | 0,28 ± 0,04 | 0,01 ± 0,01 | 0,01 ± 0,01 | Este trabalho |
| Mirandesa | 51 | 0,15 ± 0,01 | 0,84 ± 0,04 | 0,01 ± 0,00 | - | " |
| Mertolenga | 96 | 0,29 ± 0,03 | 0,71 ± 0,03 | - | - | " |
| Alentejana | 58 | 0,32 ± 0,04 | 0,66 ± 0,04 | 0,02 ± 0,01 | - | " |
| Minhota | 62 | 0,09 ± 0,03 | 0,91 ± 0,03 | - | | LEAL (1998) |
| Arouquesa | 63 | 0,07 ± 0,02 | 0,93 ± 0,02 | - | - | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| **Espanha** | | | | | | |
| Cachena | 27 | 0,22 ± 0,06 | 0,78 ± 0,06 | - | - | FERNANDEZ *et al.* (1998) |
| Caldelana | 33 | 0,30 ± 0,06 | 0,70 ± 0,06 | - | - | " |
| Frieiresa | 26 | 0,25 ± 0,06 | 0,75 ± 0,06 | - | - | " |
| Limiana | 26 | 0,25 ± 0,06 | 0,75 ± 0,06 | - | - | " |
| Vianesa | 31 | 0,11 ± 0,04 | 0,89 ± 0,04 | - | - | " |
| Rubia Gallega | 60 | 0,07 ± 0,02 | 0,93 ± 0,02 | - | - | " |
| De Lidia | 1306 | 0,08 ± 0,01 | 0,92 ± 0,01 | - | - | PIEDRAFITA *et al.* (1984) |
| Friesian | 124 | 0,15 ± 0,02 | 0,85 ± 0,02 | - | - | " |
| **Bélgica** | | | | | | |
| White and Blue | 2323 | 0,31 ± 0,01 | 0,69 ± 0,01 | - | - | VAN DE WEGHE *et al.*(1982)* |
| Red West Flemish | 431 | 0,16 ± 0,01 | 0,84 ± 0,01 | - | - | " |
| Red and White Campine | 299 | 0,12 ± 0,01 | 0,88 ± 0,01 | - | - | " |
| Black and White | 299 | 0,19 ± 0,02 | 0,81 ± 0,02 | - | - | " |
| Red and White East Flemish | 140 | 0,06 ± 0,01 | 0,65 ± 0,03 | (0,29 ± 0,03)[a] | - | " |
| **Suécia** | | | | | | |
| Swedish Polled | 48 | 0,39 ± 0,01 | 0,61 ± 0,01 | - | - | GAHNE (1963)* |
| Friesian | 273 | 0,79 ± 0,02 | 0,21 ± 0,02 | - | - | " |

* *in* PIEDRAFITA *et al.* (1984); a - correspondente ao alelo GC*C.

## 2.3.3 Análise populacional conjunta

### 2.3.3.1 Variabilidade genética

Um aspecto importante relativo à compreensão da estrutura das raças bovinas prende-se com a avaliação da distribuição da diversidade genética. Os resultados desta análise para as populações em estudo encontram-se descritos na tabela 2.21 sob a forma de valores de heterozigotia observada e esperada (NEI,1978) e do número médio de alelos por *locus*. É igualmente apresentada a probabilidade de exclusão *a priori* em cada raça com base nos cinco *loci* agora analisados.

**Tabela 2.21:** Estimativa da variabilidade genética através de valores de heterozigotia observada (Ho) e esperada (He), do número médio de alelos por *locus* ($n_a$) e da probabilidade de exclusão *a priori* (Pex) nas populações estudadas.

| **Raças** / *Locus* | **Barrosã** | | **Maronesa** | | **Mirandesa** | | **Mertolenga** | | **Alentejana** | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Ho** | **He** | **Ho** | **He** | **Ho** | **He** | **Ho** | **He** | **Ho** | **He** |
| **HBB** | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,058 | 0,057 | 0,105 | 0,100 | 0,069 | 0,067 |
| **CAII** | 0,411 | 0,441 | 0,551 | 0,451 | 0,058 | 0,057 | 0,168 | 0,189 | 0,397 | 0,395 |
| **ALB** | 0,035 | 0,035 | 0,102 | 0,098 | 0,059 | 0,058 | 0,167 | 0,306 | 0,362 | 0,411 |
| **TF** | 0,603 | 0,590 | 0,592 | 0,530 | 0,392 | 0,466 | 0,604 | 0,592 | 0,603 | 0,590 |
| **GC** | 0,248 | 0,297 | 0,347 | 0,433 | 0,235 | 0,270 | 0,323 | 0,411 | 0,379 | 0,461 |
| **Hméd** | 0,260 | 0,273 | 0,318 | 0,302 | 0,160 | 0,181 | 0,273 | 0,320 | 0,369 | 0,400 |
| (s.e.) | (0,254) | (0,114) | (0,264) | (0,106) | (0,151) | (0,082) | (0,202) | (0,086) | (0,202) | (0,096) |
| $n_a$ | 2,4 | | 2,4 | | 2,4 | | 2,4 | | 2,6 | |
| **Pex** | 0,531 | | 0,502 | | 0,380 | | 0,536 | | 0,664 | |

Os valores de heterozigotia observados para os cinco *loci* estudados, nas cinco populações, não demonstraram ser significativamente diferentes dos esperados. No entanto, observam-se duas excepções, na raça Mertolenga, em que ocorre um desvio significativo entre estes dois parâmetros de heterozigotia para os *loci* ALB ($\chi^2$= 19,8; g.l.=1; P<0,001) e GC ($\chi^2$=4,4; g.l.=1; P<0,05).

Como esperado, a transferrina é o *locus* que apresenta um valor de heterozigotia mais elevado para todas as raças, observando-se uma distribuição mais equitativa das

frequências alélicas. Pelo contrário, no *locus* HBB há uma tendência geral para a fixação do alelo HBB*A. A raça Barrosã apresenta valores baixos de heterozigotia para o *locus* ALB, apresentando a raça Alentejana uma maior variabilidade para esta enzima. Com excepção da Maronesa, observa-se geralmente um ligeiro défice de heterozigóticos. Na figura 2.6 apresentam-se, graficamente, os valores de heterozigotia para os cinco *loci* estudados.

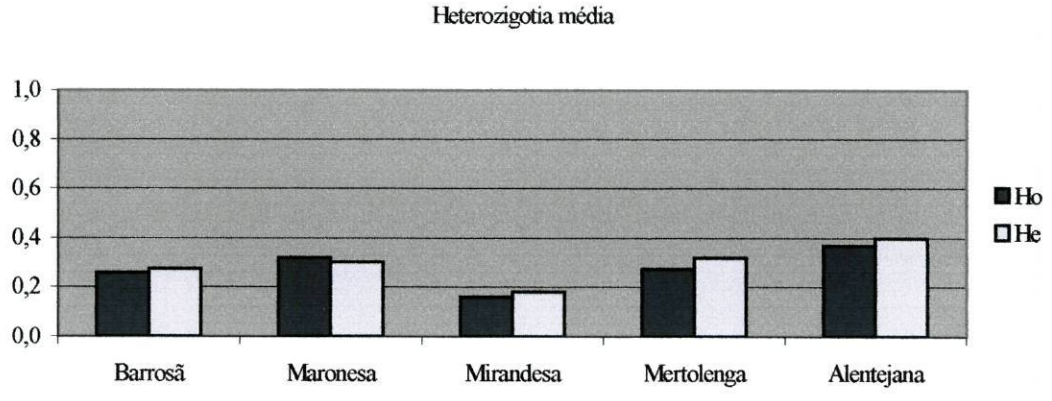



**Figura 2.6**: Representação da variabilidade genética através da heterozigotia observada (Ho) e esperada (He) para os 5 *loci* analisados nas populações estudadas.

Em termos comparativos, verifica-se que a raça Alentejana apresenta maiores valores de variabilidade genética e, pelo contrário, a raça Mirandesa apresenta os valores mais baixos. Nos últimos anos, esta raça sofreu uma redução considerável no número de indivíduos, o que constituirá, provavelmente, a causa desta baixa diversidade.

Na tabela 2.22 comparam-se os valores de variabilidade genética obtidos para as várias populações ibéricas através da análise de 4 *loci* (HBB, CAII, ALB e TF) (GONZALEZ *et al.*, 1987; KIDD *et al.*, 1980; VICENTE 1978, IGLESIAS, 1989). Os alelos TF*D1 e TF*D2 foram considerados em conjunto devido à falta de discriminação destes dois alelos em algumas referências. De um modo geral, os valores encontrados para as populações em estudo enquadram-se no espectro de variação referida para as outras raças ibéricas.

**Tabela 2.22**: Variabilidade genética de várias populações ibéricas através da análise de 4 *loci* polimórficos. N – efectivo médio estudado por *locus*, $n_a$ – número médio de alelos por *locus*, P – proporção de *loci* polimórficos, H – heterozigotia média esperada (NEI, 1978). Entre parêntesis indicam-se os valores do erro padrão.

| Raça/População | N | $n_a$ | $P_{(0,95)}$ | H |
|---|---|---|---|---|
| **Portugal** | | | | |
| Barrosã | 141,0 (0,0) | 2,3 (0,5) | 50,0 | 0,249 (0,13) |
| Maronesa | 49,0 (0,0) | 2,0 (0,4) | 75,0 | 0,270 (0,13) |
| Mirandesa | 51,5 (0,3) | 2,0 (0,0) | 25,0 | 0,150 (0,09) |
| Mertolenga | 95,5 (0,3) | 2,3 (0,3) | 100,0 | 0,288 (0,10) |
| Alentejana | 58,0 (0,0) | 2,3 (0,3) | 75,0 | 0,331 (0,09) |
| Minhota | 62,0 (0,0) | 2,0 (0,0) | 50,0 | 0,216 (0,09) |
| Arouquesa | 63,0 (0,0) | 2,0 (0,4) | 75,0 | 0,273 (0,13) |
| **Espanha** | | | | |
| Cachena | 27,0 (0,0) | 2,0 (0,4) | 50,0 | 0,240 (0,13) |
| Caldelana | 33,0 (0,0) | 2,0 (0,0) | 50,0 | 0,193 (0,11) |
| Frieiresa | 26,0 (0,0) | 2,0 (0,0) | 75,0 | 0,261 (0,10) |
| Limiana | 26,0 (0,0) | 1,8 (0,3) | 75,0 | 0,206 (0,11) |
| Vianesa | 31,0 (0,0) | 2,0 (0,0) | 50,0 | 0,193 (0,09) |
| Rubia Gallega | 184,5 (9,5) | 2,5 (0,5) | 75,0 | 0,219 (0,11) |
| Sayaguesa | 147,0 (0,0) | 2,3 (0,3) | 75,0 | 0,320 (0,09) |
| Morucha | 101,0 (0,0) | 2,3 (0,3) | 100,0 | 0,361 (0,08) |
| Alistana Sanabresa | 157,0 (0,0) | 2,3 (0,3) | 75,0 | 0,213 (0,10) |
| Blanca Cacereña | 61,8 (0,3) | 2,0 (0,0) | 100,0 | 0,377 (0,08) |
| Cárdena Andaluza | 25,0 (0,0) | 1,5 (0,3) | 25,0 | 0,131 (0,11) |
| Asturiana de los Valles | 126,5 (0,5) | 2,3 (0,3) | 75,0 | 0,237 (0,11) |
| Asturiana de la Montaña | 106,0 (0,0) | 2,3 (0,3) | 75,0 | 0,280 (0,09) |
| Tudanca | 42,0 (0,0) | 2,0 (0,4) | 75,0 | 0,321 (0,11) |
| De Lidia | 124,0 (0,0) | 2,0 (0,4) | 75,0 | 0,364 (0,14) |
| Retinta | 164,0 (0,0) | 2,3 (0,3) | 75,0 | 0,338 (0,11) |

Há a salientar, no entanto, que de entre estas raças bovinas ibéricas a Mirandesa é a raça que apresenta valores mais baixos de heterozigotia em conjunto com a raça Cárdena Andaluza. Dados referidos por SANCHEZ BELDA (1984) indicam esta raça espanhola como em risco de extinção, estando catalogada pela FAO como "relíquia". Estes dados vêm realçar o aspecto preocupante em que se encontram algumas das raças autóctones, principalmente as possuidoras de um baixo efectivo populacional e para as quais não existe

um programa de selecção adequado, tendo em vista a manutenção da variabilidade genética da raça.

A extensão desta análise a outras raças europeias torna-se, assim, fundamental para a confirmação do nível da variabilidade genética encontrado, nomeadamente a populações comerciais, sujeitas a uma forte selecção, e a populações relativamente isoladas, uma vez que estas estão a ser substituídas progressivamente pelas primeiras.

### 2.3.3.4 Variações temporais na variabilidade genética

A manutenção da diversidade genética das raças bovinas é um importante requisito para futuras estratégias de conservação e para uma melhor adaptação a variações ambientais. Muitas raças autóctones, adaptadas a condições ambientais locais, encontram-se em perigo de extinção em detrimento de raças altamente comerciais. O progressivo declínio do efectivo a que estas raças estão sujeitas resulta na perda da variabilidade genética o que poderá conduzir, em última análise, ao seu eventual desaparecimento por efeitos de deriva genética ou consanguinidade.

Na tentativa de verificar uma possível variação temporal na distribuição das frequências alélicas de 4 *loci* polimórficos foram comparados dados publicados em 1980 (KIDD *et al.*, 1980), 1989 (IGLESIAS, 1989) e 1991 (NOBRE, 1991) com dados recentes, de 1998 (FÉRNANDEZ *et al.*, 1998) e os dados apresentados neste trabalho.

Na tabela 2.23 estão descritas as frequências génicas respeitantes aos períodos em análise. As frequências dos alelos TF*D1 e TF*D2 foram consideradas em conjunto, devido à falta de discriminação destes dois alelos por alguns autores.

**Tabela 2.23**: Frequências génicas de algumas populações da Península Ibérica de duas épocas distintas.

| Raça | | *Locus* | HBB | | CA | | ALB | | TF | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | N | Data | A | B | A | B | A | B | A | D | E |
| Mirandesa | 107 | 1991[†] | 0,99 | 0,01 | 0,99 | 0,01 | 0,94 | 0,06 | 0,60 | 0,08 | 0,32*** |
| | 52 | 1999 | 0,97 | 0,03 | 0,97 | 0,03 | 0,97 | 0,03 | 0,70 | 0,30 | - |
| Mertolenga | 147 | 1980[ψ] | 0,92 | 0,08 | 0,85 | 0,15 | 0,84 | 0,16 | 0,44 | 0,45 | 0,11 |
| | 95 | 1999 | 0,95 | 0,05 | 0,89 | 0,11 | 0,81 | 0,19 | 0,46 | 0,48 | 0,06 |
| Alentejana | 155 | 1980[ψ] | 0,96 | 0,04 | 0,91 | 0,09*** | 0,94 | 0,06*** | 0,30 | 0,51 | 0,19* |
| | 58 | 1999 | 0,97 | 0,03 | 0,73 | 0,27 | 0,72 | 0,28 | 0,25 | 0,70 | 0,05 |
| Cachena | 71 | 1989[§] | 0,91 | 0,09* | 0,77 | 0,23 | 0,98 | 0,02 | 0,48 | 0,47 | 0,05 |
| | 27 | 1998[ϕ] | 1,00 | - | 0,74 | 0,26 | 0,98 | 0,02 | 0,35 | 0,59 | 0,06 |
| Caldelana | 60 | 1989[§] | 0,97 | 0,03 | 0,96 | 0,04 | 0,98 | 0,02 | 0,59 | 0,41 | - |
| | 33 | 1998[ϕ] | 0,98 | 0,02 | 0,88 | 0,12 | 0,98 | 0,02 | 0,42 | 0,58 | - |
| Frieiresa | 33 | 1989[§] | 0,95 | 0,05 | 0,94 | 0,06 | 1,00 | - * | 0,45 | 0,55 | - |
| | 26 | 1998[ϕ] | 0,98 | 0,02 | 0,83 | 0,17 | 0,94 | 0,06 | 0,52 | 0,48 | - |
| Limiana | 39 | 1989[§] | 0,90 | 0,10* | 0,83 | 0,17 | 0,97 | 0,03* | 0,64 | 0,36 | - |
| | 26 | 1998[ϕ] | 1,00 | - | 0,94 | 0,06 | 0,88 | 0,12 | 0,54 | 0,46 | - |
| Vianesa | 40 | 1989[§] | 0,98 | 0,02 | 0,86 | 0,14 | 0,93 | 0,07 | 0,66 | 0,34 | - |
| | 31 | 1998[ϕ] | 0,98 | 0,02 | 0,89 | 0,11 | 0,95 | 0,05 | 0,68 | 0,32 | - |

[ψ]KIDD *et al.* (1980), [§] IGLESIAS (1989), [ϕ] FERNÁNDEZ *et al.* (1998), [†]NOBRE (1991)
*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 indica o nível de significância da diferença entre os dados antigos e recentes, ausência de asterisco indica diferenças não significativas.

Pela análise da tabela 2.23 constata-se a existência de algumas diferenças significativas entre as frequências génicas dos dois períodos de amostragem para as raças Mirandesa, Alentejana, Cachena, Frieiresa e Limiana. No entanto, verifica-se que estes desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, na maior parte dos casos, se devem, à introdução no cálculo de $\chi^2$ de classes fenotípicas em que os valores esperados são inferiores a cinco. Estes baixos valores são consequência, por um lado, da ausência de alguns alelos na nova amostragem, como se verifica para as raças Cachena, Limiana e Mirandesa, ou, por outro lado, do aparecimento de alelos que não foram observados na amostra anterior, como é o caso de ALB*B, na raça Frieiresa. O reduzido número de indivíduos amostrados poderá ser uma das razões que explicam este facto. Em relação à raça Mirandesa, verifica-se que a perda do alelo TF*E é bastante significativa, observando-se uma tendência para a diminuição da frequência deste alelo em algumas raças.

Do conjunto das raças analisadas, a Alentejana foi a que mostrou valores mais diferenciados entre as duas épocas de amostragem, verificando-se tendências opostas na distribuição dos alelos nos diferentes *loci*.

Na tabela 2.24 apresentam-se os valores de variabilidade genética quantificada pelos parâmetros convencionais (heterozigotia média, número médio de alelos por *locus*, proporção de *loci* polimórficos).

**Tabela 2.24**: Variabilidade genética de algumas populações ibéricas através da análise de 4 *loci* polimórficos. N – efectivo médio estudado por *locus*, $n_a$ – número médio de alelos por *locus*, P – proporção de *loci* polimórficos, H – heterozigotia média esperada (NEI, 1978). Entre parêntesis indicam-se os valores do erro padrão.

| Raça | N | Data | $N_a$ | $P_{(0,95)}$ | H |
|---|---|---|---|---|---|
| Mirandesa | 107 | 1991† | 2,00 (0,0) | 50 | 0,159 (0,1) |
| | 52 | 1999 | 2,00 (0,0) | 25 | 0,150 (0,1) |
| Mertolenga | 147 | 1980* | 2,25 (0,2) | 100 | 0,318 (0,1) |
| | 95 | 1999 | 2,25 (0,2) | 100 | 0,288 (0,1) |
| Alentejana | 155 | 1980* | 2,25 (0,2) | 75 | 0,243 (0,1) |
| | 58 | 1999 | 2,25 (0,2) | 75 | 0,331 (0,1) |
| Cachena | 71 | 1989§ | 2,25 (0,2) | 75 | 0,279 (0,1) |
| | 27 | 1998ϕ | 2,00 (0,4) | 50 | 0,240 (0,1) |
| Caldelana | 60 | 1989§ | 2,00 (0,0) | 25 | 0,166 (0,1) |
| | 33 | 1998ϕ | 2,00 (0,0) | 50 | 0,193 (0,1) |
| Frieiresa | 33 | 1989§ | 1,75 (0,2) | 50 | 0,177 (0,1) |
| | 26 | 1998ϕ | 2,00 (0,0) | 75 | 0,261 (0,1) |
| Limiana | 39 | 1989§ | 2,00 (0,0) | 75 | 0,246 (0,1) |
| | 26 | 1998ϕ | 1,75 (0,2) | 75 | 0,206 (0,1) |
| Vianesa | 40 | 1989§ | 2,00 (0,0) | 75 | 0,249 (0,1) |
| | 31 | 1998ϕ | 2,00 (0,0) | 50 | 0,193 (0,1) |

*KIDD *et al.* (1980), § IGLESIAS (1989), ϕFERNÁNDEZ *et al.* (1998), †NOBRE (1991)

A análise da tabela 2.24 demonstra um ligeiro decréscimo na heterozigotia média de uma época para a outra nas raças Mirandesa, Mertolenga, Cachena, Limiana e Vianesa. Contudo, estas diferenças não se revelaram significativas, quando se utilizou o teste t de *Student*. A Mirandesa é a raça que apresenta menor variabilidade genética nas duas amostragens.

Os resultados aqui apresentados revelam-se importantes uma vez que mostram que estas raças autóctones retiveram uma razoável variabilidade genética ao nível de marcadores proteicos. KANTANEN *et al.* (1999) ao fazerem uma análise semelhante com raças bovinas do Norte da Europa, para períodos de amostragem que variaram de 20 a 40 anos, obtiveram o mesmo tipo de resultados.

Numa futura análise, um maior número de *locus* ou outro tipo de marcadores, nomeadamente os microssatélites, poderão ser uma ferramenta útil neste tipo de estudo.

# 3

# Estudo da variabilidade genética ao nível do DNA

## 3.1 INTRODUÇÃO

Recentemente, a descoberta de novos marcadores genéticos ao nível do DNA, muito mais polimórficos e abundantes, nomeadamente os microssatélites (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989), permitiu antecipar um avanço muito considerável no estado actual do conhecimento da história, estrutura genética e evolução das várias raças bovinas. Tal facto é demonstrado pelos resultados obtidos por diversos autores como MOAZAMI-GOUDARZI *et al.* (1994), CIAMPOLINI *et al.* (1995), ARRANZ *et al.* (1996), MACHUGH *et al.* (1997) e SCHMID *et al.*, (1999).

Os microssatélites são polimorfismos que envolvem variações detectadas ao nível de sequências nucleotídicas do DNA, sendo constituídos por pequenas repetições em tandem de 2 a 6 pares de bases.

Estes marcadores estão dispersos por todo o genoma, muitas vezes exibindo um elevado grau de polimorfismo, ou seja, substanciais variações no número de repetições. As unidades de repetição mais bem estudadas são as repetições de dinucleótidos $(CA)_n$ e $(GT)_n$, sendo também as mais abundantes no genoma dos mamíferos (MACHUGH, 1996). As diferenças no número de repetições podem ser fielmente distinguidas através da sua amplificação pela técnica da reacção em cadeia da polimerase (PCR), descoberta por KARY MULLIS em 1984. Esta técnica consiste na síntese de numerosas cópias de um fragmento específico de DNA a partir da cadeia de DNA alvo utilizando para tal a enzima polimerase do DNA e duas sequências de oligonucleotidos - iniciadores (*primers*). O PCR permite a obtenção de resultados precisos, rápidos e económicos, mesmo a partir de pequenas amostras de material biológico.

O padrão do tamanho do fragmento é bastante variável de indivíduo para indivíduo (excepto para gémeos verdadeiros), mas aparentemente estável de um tecido para o outro no mesmo indivíduo (JEFFREYS *et al.*, 1985).

A natureza do polimorfismo deste tipo de *locus* é atribuída a erros ocorridos durante o processo de replicação do DNA e que resultaram, provavelmente, de um imperfeito emparelhamento da cadeia dupla de DNA durante a fase de replicação (TAUTZ e SCHLÖTTERER, 1994).

Os microssatélites podem ser classificados como simples, compostos e complexos de acordo com a constância do motivo repetitivo. Desta forma, repetições simples contêm unidades de igual comprimento e sequência, repetições compostas compreendem duas ou mais repetições simples adjacentes, repetições complexas podem conter vários blocos repetidos com comprimentos diferentes e com maior ou menor variação das sequências intervenientes (URQUHART *et al.*, 1994).

O seu elevado polimorfismo e ubiquidade dentro do genoma tornam os microssatélites marcadores genéticos de eleição para uma variedade de propósitos, tais como mapeamento genómico, análise populacional, selecção animal assistida, controlo de parentesco e filiação individual e populacional. Neste contexto, as potencialidades técnicas e informativas associadas aos microssatélites levaram a optar pelo seu estudo no âmbito dos objectivos propostos. Os *loci* analisados foram seleccionados de uma bateria de microssatélites aprovada e recomendada pelo Programa Global da FAO preenchendo os seguintes requisitos: pertencer ao domínio público, mostrar segregação mendeliana, não estarem ligados, apresentar um mínimo de quatro alelos e permitir a comparação entre raças.

# 3.2. MATERIAL E MÉTODOS

## 3.2.1 Colheita de amostras

Para a análise DNA foram seleccionadas 50 amostras de cada raça, das amostras previamente colhidas para a análise de proteínas, de forma a obter um número equitativo de machos e fêmeas por raça e reduzir o número de indivíduos aparentados. Relativamente à raça Barrosã foram utilizadas amostras de eritrócitos em meio de glicerol, colhidas em 1993 e 1994, e que haviam sido utilizadas por LEAL (1998) para análise de polimorfismos bioquímicos.

As amostras de sangue foram colhidas em EDTA, e conservadas a 4ºC até ao seu tratamento.

## 3.2.2 Extracção de DNA

Neste trabalho foram utilizados vários métodos de extracção com vista a encontrar o mais eficaz tanto no aspecto de quantidade e pureza como também de conservação do DNA após extracção:

- extracção com a resina Chelex 100 (*Bio-Rad*), para o qual se utilizou apenas 10µl de sangue total (a descrição do protocolo encontra-se em anexo). Este método foi utilizado quando se dispunha de pouca quantidade de amostra;

-extracção através do método salino, descrito por VAN BRAGT (1996) em que se utilizou 2,5ml de sangue;

- o *Kit Puregene isolation DNA* (Gentra Systems) foi usado para uma rápida extracção, seguindo as instruções do fabricante;

- método standardizado de fenol-clorofórmio, com digestão com proteinase K. Este método encontra-se descrito em seguida, uma vez que foi o método mais utilizado.

Na realização deste protocolo foram usados 500µl de sangue total ou de eritrócitos glicerolados.

O tratamento é iniciado com adição de 300µl de tampão $Na_2$-EDTA (SE: NaCl 75mM, EDTA 25mM, SDS 2% pH 8) às amostras, que são posteriormente centrifugadas, uma ou duas vezes, a 12 000rpm durante 20 minutos. Ao sedimento obtido adicionam-se 600µl de tampão SE e 30µl de DTT 1M. Após agitação vigorosa da mistura, juntam-se 60µl de Proteinase K (5mg/ml) permanecendo as amostras a incubar durante 14 horas a 53°C. Em seguida, adicionam-se 290µl NaCl (5M) e 500µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico estabilizado (Eurobio) e colocam-se as amostras a agitar vigorosamente durante 30 minutos. Segue-se uma centrifugação a 12 000rpm durante 10 minutos. O sobrenadante, onde se encontra o DNA, é cuidadosamente retirado e lavado duas vezes em 800µl de uma mistura 1:1 de fenol saturado com Tris (pH 7,5-8) (Eurobio) e fenol/clorofórmio/álcool isoamílico durante 10 minutos a 12 000rpm. Ao sobrenadante adicionam-se 800µl de etanol absoluto frio e agitam-se ligeiramente os tubos, que posteriormente são colocados durante pelo menos 15 minutos a –20°C, para precipitação do DNA. Em seguida realiza-se uma centrifugação de 30 minutos a 13 000rpm, após a qual se pode observar um pequeno sedimento correspondente ao DNA. O sedimento é lavado duas vezes em etanol 70% durante 10 minutos a 13 000rpm, seco a 37°C e ressuspenso em 100µl de Tampão Tris-EDTA (TE: 10 mM, EDTA 1 mM pH 8), ficando 14 horas a 37°C a dissolver.

Efectuada a extracção, foi colocada uma alíquota de cada amostra num gel de agarose 1% juntamente com uma *ladder* (fragmento λ digerido pela enzima Hind III) e corrida com uma voltagem de 100V em tampão TBE 1X [89mM Tris, 89mM Ácido bórico, 2mM EDTA (1L), pH8]. A coloração foi feita com brometo de etídio e a intensidade das bandas referentes às amostras foi comparada com uma amostra de referência (cedida pelo Laboratório de Veterinária da Universidad Complutense de Madrid), através de um transiluminador com luz ultravioleta, de maneira a permitir a estimativa da concentração de DNA para cada amostra.

Para a maioria das amostras, o DNA extraído de sangue encontrava-se em concentrações adequadas de maneira a permitir a sua visualização em minigel de agarose (figura 3.1).

O método de extracção utilizado por rotina permitiu obter resultados satisfatórios quer do ponto de vista qualitativo, quer, do ponto de vista quantitativo.

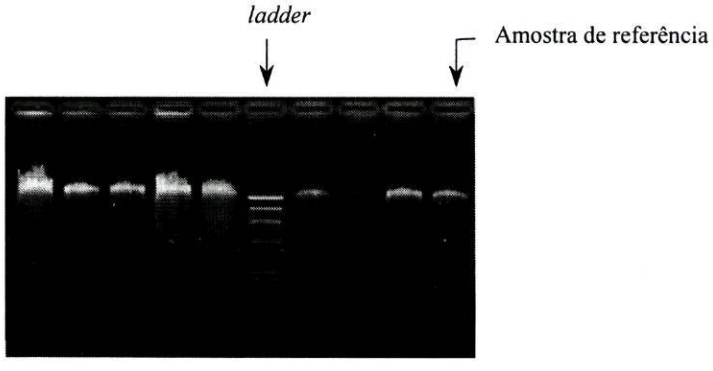



**Figura 3.1**: Concentração de DNA estimado por comparação de uma amostra já standardizada e *ladder* (fragmento λ digerido pela enzima Hind III - sucessão decrescente do peso de cada fragmento: 23,13Kpbs 9,42Kpbs, 6,56Kpbs, 4,36Kpbs, 2,32Kpbs, 2,02Kpbs, 0,56Kpbs e 0,13Kpbs).

O DNA extraído de amostras antigas de "hemolisados", através do *Kit Puregene*, resultou em baixas concentrações não permitindo a sua visualização em géis de agarose. No entanto, foi possível obter, posteriormente, uma boa amplificação através do aumento da quantidade de amostra na mistura de amplificação.

A extracção realizada com a resina Chelex 100 mostrou-se eficaz, tendo em conta a utilização de quantidades muito pequenas de amostra, o que realça a utilidade desta técnica nestas situações. Todavia, comparativamente a outros métodos, não se mostrou muito eficiente em termos de eliminação de proteínas ou outras substâncias associadas ao DNA.

A extracção através do método salino revelou-se eficaz no que se refere à quantidade e à pureza do DNA. Contudo, para períodos relativamente longos de armazenamento o DNA apresentava um certo grau de degradação.

O *Kit* de extracção mostrou-se bastante eficiente, tendo porém o inconveniente de ser bastante dispendioso. Desta forma, tentou-se encontrar um método menos oneroso que

permitisse extrair quantidades razoáveis de DNA, de acordo com o volume de amostra disponível, com um grau de pureza elevado e que permitisse a sua conservação por um longo período de tempo. O processo mais eficaz neste sentido mostrou ser o método de fenol-clorofórmio.

Conforme a concentração das amostras, procedeu-se à sua diluição para obtenção da concentração ideal para uma boa amplificação por PCR. Posteriormente, as amostras foram conservadas a –20ºC até à sua utilização.

## 3.2.3 Amplificação de DNA

O sucesso de uma boa amplificação advém da optimização das condições de amplificação para cada caso específico, uma vez que não existe um protocolo óptimo para todos os propósitos dado que a especificidade de cada PCR depende de vários factores, nomeadamente da temperatura e tempo de duração de cada uma das fases do ciclo, número de ciclos, da *Taq* polimerase, das concentrações de $MgCl_2$ e dNTPs (deoxinucleótidos trifosfato), da constituição e concentração dos *primers* e das características dos termocicladores.

Na tabela 3.1 estão indicados os microssatélites utilizados no presente estudo e os respectivos *primers* e temperaturas de hibridação para amplificação do DNA.

**Tabela 3.1**: Sequência dos *primers* utilizados na amplificação de cada um dos microssatélites, e respectivas temperaturas de hibridação.

| *LOCI* | Nº DE ACESSO | SEQUÊNCIA DE *PRIMERS* 5'→3' | Tº | REFERÊNCIA |
|---|---|---|---|---|
| **INRA005** | X63793 | p1: CAA TCT GCA TGA AGT ATA AAT AT<br>P2: CTT CAG GCA TAC CCT ACA CC | 57 | VAIMAN *et al.*, 1994 |
| **INRA023** | X67830 | p1: GAG TAG AGC TAC AAG ATA AAC TTC<br>p2: TAA CTA CAG GGT GTT AGA TGA ACT C | 58 | VAIMAN *et al.*, 1994 |
| **INRA037** | X7151 | p1: GAT CCT GCT TAT ATT TAA CCA C<br>p2: AAA ATT CCA TGG AGA GAG AAA C | 55 | VAIMAN *et al.*, 1994 |
| **HEL1** | X65202 | p1: CAA CAG CTA TTT AAC AAG GA<br>p2: AGG CTA CAG TCC ATG GGA TT | 56 | KAUKINEN e VARVIO, 1993 |
| **HEL5** | X65204 | p1: GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA<br>p2: AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC | 57 | KAUKINEN e VARVIO, 1993 |
| **HEL9** | X65214 | p1: CCC ATT CAG TCT TCA GAG GT<br>P2: CAC ATC CAT GTT CTC ACC AC | 57 | KAUKINEN e VARVIO, 1993 |
| **ETH3** | D19S2 | p1: GAA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G<br>p2: ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G | 62 | FRIES *et al.*, 1993 |

A mistura de amplificação encontra-se descrita na tabela 3.2.

**Tabela 3.2**: Solução utilizada na amplificação de DNA através da técnica PCR.

| Componentes da reacção | [ ] ou volume por amostra |
|---|---|
| Tampão (50mM KCl; 10mM Tris-HCl, pH9) | 1X |
| $MgCl_2$ | 2,0 mM |
| DNTP's | 200 µM |
| *Primer reverse* | 0,25 µM |
| *Primer forward* | 0,25 µM |
| *Taq* polimerase | 0,5 U |
| DNA | 2 µl |
| $H_2O$ | até ao vol. final de 25 µl |

A amplificação foi realizada através da técnica de reacção em cadeia da polimerase (PCR), com ajuda de dois termocicladores: *T3 Thermocycler* (BIOMETRA) e *Robocycler* (STRATAGENE). A técnica consiste, fundamentalmente, em três passos:

-Desnaturação, que permite a separação das duas cadeias de DNA;

-Hibridação, que conduz à ligação dos *primers* ao molde de DNA;

-Extensão, que corresponde à síntese de novos fragmentos de DNA pela polimerase do DNA.

Os tempos utilizados e temperaturas de cada passo estão descritos na tabela 3.3 (estes valores foram os utilizados para a maioria dos microssatélites, tendo sido modificados, em caso de necessidade, para a obtenção de um bom produto amplificado).

**Tabela 3.3**: Perfil do PCR.

| Fase do PCR | Temperatura/Tempo | | N.º de ciclos |
|---|---|---|---|
| Desnaturação inicial | 93°C | 5' | 1 ciclo |
| Desnaturação | 93°C | 30'' | 35 ciclos |
| Hibridação | 57°C* | 30'' | |
| Extensão | 72°C | 30'' | |
| Extensão Final | 72°C | 5' | 1 ciclo |

*temperaturas variáveis consoante o marcador a amplificar (de acordo com o indicado na Tabela 3.1).

Em cada amplificação foram usados um controlo positivo, com uma amostra de referência, e outro negativo, contendo água esterilizada em vez de DNA.

Para confirmação da amplificação as amostras foram corridas em géis de agarose 2% e visualizadas com brometo de etídio.

No conjunto das experiências realizadas para a optimização das condições de amplificação, obtiveram-se resultados satisfatórios. A figura 3.2 exemplifica este facto, representando uma amplificação bem sucedida do microssatélite INRA23 cujo peso molecular se situa nos 200 pb.

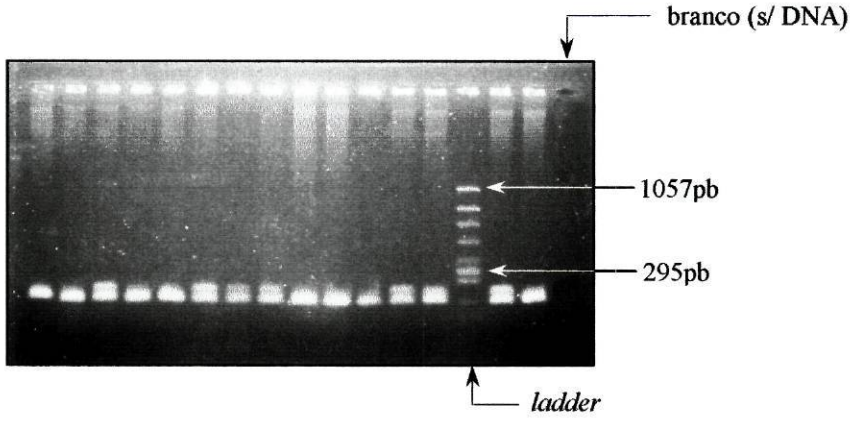



**Figura 3.2:** Electroforese dos fragmentos amplificados em matriz de agarose 2%. *Ladder* (fragmento ϕX 174 digerido pela enzima Hinc II) cuja sucessão decrescente do peso de cada fragmento é: 1057pb, 770pb, 612pb, 495pb, 340pb, 295pb, 210pb, 162pb e 79pb.

Destas experiências, é de salientar a variação no volume da amostra de DNA utilizado, desde amostras diluídas 1/1000, 1/500, 1/50 e 1/10, até 1μl, 2μl, 4μl e 6μl. Os resultados obtidos demonstraram que a concentração óptima de amplificação usada foi a de 2μl de amostra, tendo sido, por esta razão, a concentração utilizada como rotina. Um volume de 4μl revelou ser a quantidade ideal para amplificação de amostras de DNA mais degradado.

A redução da temperatura de hibridação e o aumento do número de ciclos relativamente ao considerado como óptimo traduziu-se, geralmente, no aparecimento de produtos inespecíficos. Os melhores resultados, em função da quantidade e da qualidade de DNA, foram obtidos com um número de ciclos variando entre 30 e 35, com excepção da amplificação do microssatélite INRA37, para a qual se utilizaram 40 ciclos.

Como já foi referido, para as amostras cujo DNA se encontrava um pouco degradado tornou-se necessário o ajuste das condições de amplificação, nomeadamente a quantidade de DNA, *primers*, $MgCl_2$, *Taq* polimerase, número de ciclos e abaixamento da

temperatura de hibridação, de maneira a obter, no final, um resultado que permitisse efectuar uma leitura fiável e precisa.

Após amplificação, os resultados observados para o DNA extraído de sangue total eram comparáveis aos obtidos da extracção de DNA de "hemolisados" conservados a 20°C negativos.

## 3.2.4 Separação dos fragmentos de DNA amplificados

As determinações fenotípicas foram feitas por electroforese horizontal e vertical.

Electroforese Horizontal

Na electroforese horizontal os géis constituídos por uma matriz de poliacrilamida foram aplicados sobre uma película de suporte GELFIX (SERVA) para um melhor manuseamento.

Neste sistema tentou-se encontrar um método que permitisse uma corrida electroforética que no final apresentasse resultados com bandas nítidas e com uma boa separação dos alelos, de modo a evitar erros de leitura, uma vez que a diferença entre dois produtos amplificados adjacentes era apenas de 2 pares de bases (pb). Para tal, foram testados vários tipos de malha, de tampões e de espessura do gel. Na tabela 3.4 estão indicadas as duas soluções de polimerização utilizadas.

**Tabela 3.4**: Solução de polimerização utilizados em géis horizontais.

| Componentes da solução | T8C5 | T9C5 |
|---|---|---|
| Acrilamida 40% | 2000 µl | 1603 µl |
| Bisacrilamida 2% | 1860 µl | 1687 µl |
| Tampão Tris–Sulfato 4X | 4910 µl | 3300 µl |
| Glicerol 80% | 700 µl | 375 µl |
| Persulfato 1% | 500 µl | 525 µl |
| Temed 99% | 20 µl | 15 µl |
| | 10ml v.f. | 7,5ml v.f. |

As amostras amplificadas foram aplicadas, num volume de 1µl, em pequenos poços (*slots*) previamente preparados sobre um gel de dimensões de 10cm x 14,5cm x 0,3cm

(7,5ml) ou de 10cm x 23,5cm x 0,3cm (10ml), de acordo com o tamanho do fragmento. O tampão das pontes (TBE 2X) foi embebido em tiras de papel (10cm x 1,5cm) "Whatman" (Cat. No. 3017915) que foram colocadas directamente sobre o gel.

A corrida electroforética foi processada numa placa fria a 9°C, sendo aplicada uma corrente eléctrica de 270V e 370V, durante aproximadamente 2h30min e 3h30min, para os géis com volume 7,5ml e 10ml, respectivamente. Adicionou-se corante azul de bromofenol no cátodo para a visualização da frente da corrida eléctrica.

As bandas resultantes foram comparadas umas com as outras e o tamanho das bandas determinado por comparação com duas amostras de tamanho conhecido, juntamente com uma *ladder* de 10pb.

Electroforese Vertical

A corrida das amostras em géis verticais foi realizada em condições desnaturantes, utilizando-se uma potência constante de 60W. As soluções de polimerização encontram-se descritas na tabela 3.5. A corrida processou-se a 50°C de maneira a permitir a manutenção das condições de desnaturação das amostras.

**Tabela 3.5**: Solução de polimerização de géis verticais.

| **Gel 6% desnaturante** | **Quantidade (52 ml v.f.)** |
|---|---|
| Acrilamida 40% | 10,69 ml |
| Bisacrilamida 2% | 11,25 ml |
| Água bidestilada | 25,56 ml |
| Ureia | 31,5 g |
| Tampão TBE 10X | 3,75 ml |
| Persulfato 10% | 500 µl |
| Temed 99% | 50 µl |

Após amplificação por PCR, 4µl de cada amostra foram misturados com tampão contendo formamida, desnaturados a 93°C durante 3 minutos e imediatamente conservados em gelo até ao seu carregamento no gel. O tempo de migração está dependente do tamanho dos alelos em cada microssatélite. Desta forma, para fragmentos da ordem dos 130pb as amostras correram cerca de 2h, enquanto que para tamanhos superiores o tempo de corrida estendeu-se até 2h40min. O corante azul de bromofenol aplicado juntamente com as

amostras permitiu visualizar o avanço da corrida ao migrar a uma velocidade equivalente à de um fragmento de DNA com um peso molecular de 130 pb.

### 3.2.5 Detecção por Nitrato de Prata

As colorações utilizadas nos dois sistemas, horizontal e vertical, basearam-se no método de coloração por nitrato de prata, embora com ligeiras diferenças nos dois sistemas. No primeiro caso, utilizou-se o protocolo descrito por BUDOWLE *et al.* (1991) (em anexo). Para os géis desnaturantes empregou-se um *Kit* de coloração (SILVER SEQUENCE™ DNA Staining Reagents, PROMEGA) (em anexo).

O tamanho dos alelos foi determinado com a ajuda de amostras de referência e com o uso de uma *ladder* de 10 pb aplicado lado a lado com as amostras no gel.

### 3.2.6 Análise estatística

O cálculo da variabilidade genética baseado nos microssatélites foi realizado através de um tratamento similar ao usado para as proteínas no que se refere à estimativa das frequências génicas, heterozigotias, FST e probabilidade de exclusão *a priori*.

## 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Análise dos métodos de separação

Na separação electroforética dos amplificados foram utilizados dois sistemas de modo a optimizar a leitura dos fenótipos.

Para microssatélites cujo tamanho dos alelos é da ordem dos 100-130pb, as amostras foram corridas em condições nativas, em géis horizontais de acrilamida, uma vez que são mais fáceis de manusear, guardar e de menores custos. Possuem, também, a vantagem de não apresentarem bandas espúrias (*statter bands*), que são comuns nos microssatélites com motivos de repetição dinucleotídicos e que dificultam a sua leitura. Nos géis nativos surge o aparecimento de heteroduplexes que são também artefactos, mas que, por vezes, podem ajudar na distinção dos diferentes padrões (GUSMÃO, 1996).

Para microssatélites cujo peso molecular é superior a 130pb, utilizaram-se géis de acrilamida desnaturantes verticais que devido às suas dimensões e à voltagem que lhes é aplicada permitem separar alelos de maior peso molecular, revelando diferenças até um par de bases, algo que é difícil com o sistema anterior. Todavia, para além de ser um processo moroso, a dimensão dos géis torna difícil o seu manuseamento e acondicionamento (não é aplicada nenhuma película aderente).

Em alguns casos, as amostras foram corridas nos dois sistemas de maneira a clarificar a leitura dos fenótipos.

Nas figuras 3.3 a 3.9 apresentam-se os resultados da variação encontrada nos microssatélites estudados, após as electroforeses efectuadas por rotina.

## HEL1

O microssatélite HEL1 encontra-se localizado no cromossoma 15 e foi clonado por KAUKINEN e VARVIO (1993). É constituído por uma sequência repetida de $(AC)_{16}$, tendo sido descritos 8 alelos num conjunto de raças do continente africano, asiático e europeu (MACHUGH *et al.*, 1997).

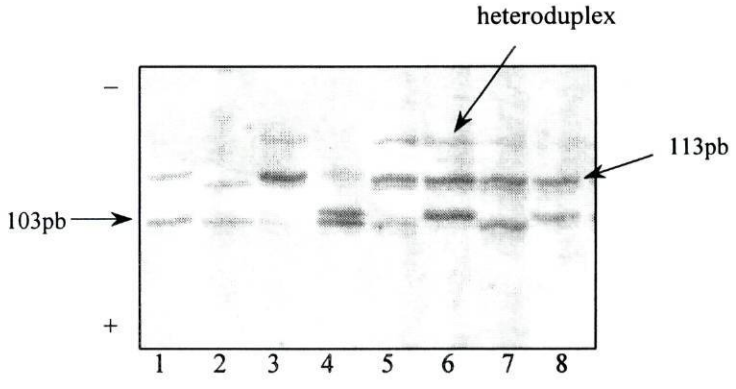



**Figura 3.3**: **HEL1**: resultados da electroforese de rotina: (1,5,7) 103-113pb; (2) 103-111pb; (3) 113pb; (4) 103-105pb; (6,8) 105-113pb.

Para a separação deste microssatélite foi utilizado o sistema horizontal nativo (figura 3.3), uma vez que permitia distinguir com clareza os diferentes alelos (103 a 115pb). No conjunto das cinco populações estudadas foram encontrados 6 alelos.

## INRA37

O microssatélite INRA37 (clonado por VAIMAN *et al.*, 1994) é constituido por uma sequência repetida de $(TG)_{12}$. Foram descritos 12 alelos para este *locus* (MOAZAMI-GOUDARZI *et al.*,1994).

Na figura 3.4 estão representados dois sistemas electroforéticos utilizados na separação dos alelos do *locus* INRA37.

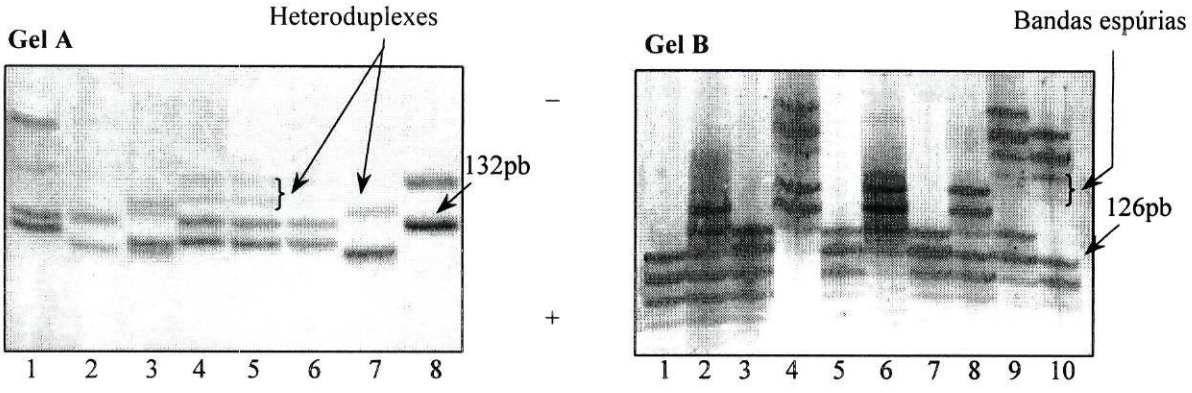



**Figura 3.4**: **INRA37**: resultados da electroforese de rotina: **Gel A**: (1) 128-132pb; (2) 124-132pb; (3) 124-126pb; (4,5,6) 126-132pb; (7) 124pb; (8) 132pb. **Gel B**: (1) 124-126pb; (2) 124-130pb; (3) 124-128pb; (4) 132-140pb; (5,7) 126-128pb; (6) 130-132pb; (8) 126-132pb; (9) 128-140pb; (10) 126-138pb.

Na separação deste microssatélite, foram usados como rotina géis de acrilamida horizontais nativos. Nos casos em que surgiram dúvidas de leitura correram-se as amostras em géis desnaturantes verticais. Contudo, como já foi referido, nestes casos surge a presença de bandas espúrias o que, por vezes, dificulta a leitura.

Como se pode observar pela figura 3.4, nos géis nativos a cada alelo corresponde uma banda e estão visíveis as bandas correspondentes aos heteroduplexes, que aparecem sempre com uma intensidade mais fraca e posição mais catódica em relação aos alelos correspondentes. Nos géis desnaturantes cada alelo aparece com duas bandas fortes de igual intensidade e duas mais fracas e mais anódicas.

Neste marcador foram encontrados, no conjunto das raças, 10 alelos, sendo a Barrosã a raça que apresentou um maior número de alelos (9). O peso molecular dos alelos variou entre 118pb e 140pb.

## INRA23

O microssatélite INRA23 (clonado por VAIMAN *et al.*, 1994) encontra-se localizado no cromossoma 3. É constituído por uma sequência repetida de $(AC)_{22}$, e o número máximo de alelos descrito é de 12 (VAIMAN *et al.*, 1994).

Na figura 3.5 está representada uma electroforese em gel desnaturante vertical.

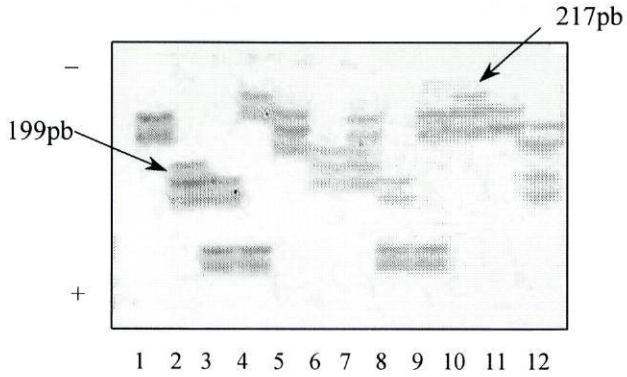



**Figura 3.5: INRA23**: resultados da electroforese de rotina: (1) 215pb; (2) 207-209pb; (3) 199-207pb; (4) 199-217pb; (5) 213-215pb; (6) 209-211pb; (7) 209-215pb; (8) 199-207pb; (9) 199-215pb; (10) 215-217pb; (11) 215pb; (12) 207-213pb.

Relativamente a este *locus*, utilizou-se apenas o sistema vertical uma vez que o tamanho elevado dos alelos não permitiu a sua separação em géis horizontais. Cada alelo é representado por duas bandas de igual intensidade (figura 3.5) e, no total das raças em estudo, foram descritos 9 alelos, oscilando o seu peso molecular entre 199 e 217pb. As raças Barrosã e a Maronesa foram as que apresentaram um maior número de alelos (7). Este microssatélite revelou-se como o mais fácil de analisar, no sentido em que nunca demonstrou ter qualquer tipo de problema a nível de amplificação e leitura dos alelos. Para além disso, como será verificado posteriormente, constitui um bom indicador em termos de análise da variabilidade genética das raças bovinas, com elevado potencial para ser utilizado em trabalhos futuros.

## ETH3

O microssatélite ETH3 (clonado por FRIES *et al.*, 1993) é constituído por uma sequência repetida de $(GT)_{26}$ e encontra-se localizado no cromossoma 19. Foram, até ao momento, encontrados oito alelos para este *locus* (FRIES *et al.*, 1993; PEELMAN *et al.*, 1998; SCHMID *et al.*,1999).

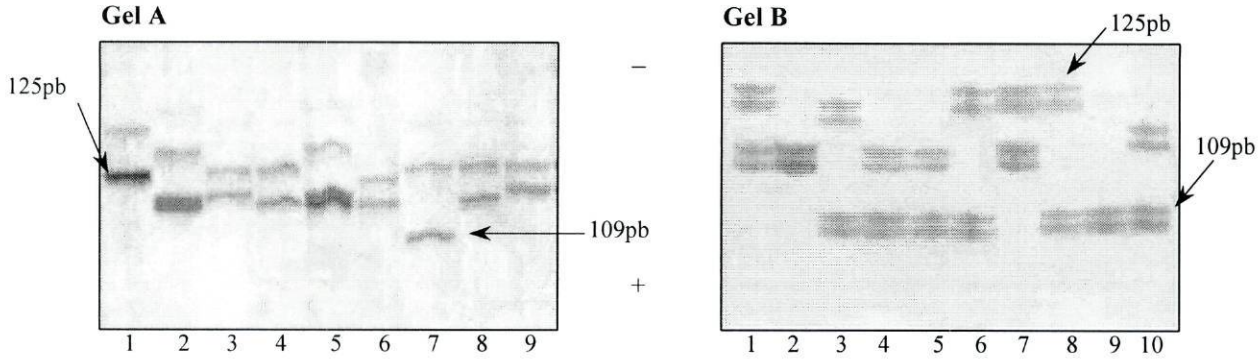



**Figura 3.6: ETH3**: resultados da electroforese de rotina: **Gel A**: (1) 125pb; (2,5) 117-119pb; (3) 119-125pb; (4) 117-125pb; (6) 117-123pb; (7) 109-125pb; (8) 117-125pb; (9) 119-125pb. **Gel B**: (1) 117-125pb; (2) 117pb; (3) 109-123pb; (4,5) 109-117pb; (6,8) 109-125pb; (7) 117-125pb; (9) 109pb; (10) 109-119pb.

Na separação electroforética, foram utilizados os dois sistemas uma vez que se obtinha um bom padrão em ambos (figura 3.6). Devido ao peso molecular dos alelos e à inexistência de bandas espúrias, ou de estas se encontrarem bastante ténues nos géis desnaturantes verticais, foi possível fazer duas aplicações sucessivas no mesmo gel, com intervalo de 1 hora, sem perda da capacidade de discriminação dos alelos.

No conjunto das cinco raças, foi detectada a existência de 11 alelos, oscilando o seu peso molecular entre 109 e 125pb.

## INRA5

O microssatélite INRA5 (clonado por VAIMAN *et al.*, 1994) encontra-se localizado no cromossoma 12 e é constituído por uma sequência repetida de $(GT)_{13}$. Encontram-se descritos quatro alelos (CIAMPOLINI *et al.*, 1995).

Na figura 3.7 estão representados os resultados obtidos após electroforese em gel de acrilamida desnaturante vertical, podendo-se observar os quatro alelos encontrados, no total das raças estudadas.

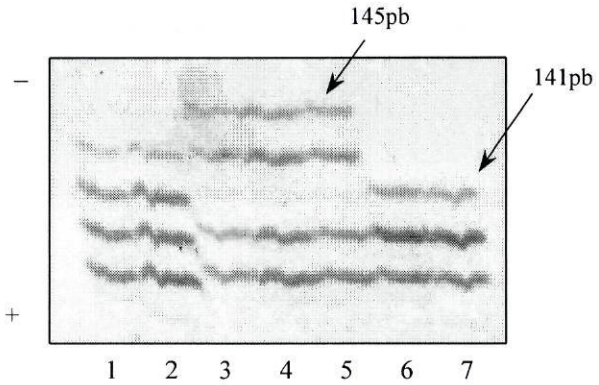



**Figura 3.7: INRA5**: resultados da electroforese de rotina: (1 e 2) 139-143pb; (3 a 5) 139-145pb; (6 e 7) 139-141pb.

O INRA5 é um dos microssatélites em estudo que apresenta um menor número de alelos, encontrando-se estes representados por 2 bandas de intensidade semelhantes nos géis desnaturantes verticais.

## HEL5

O microssatélite HEL5 (clonado por KAUKINEN e VARVIO, 1993) é constituído por uma sequência repetida de $(CA)_{22}$ e encontra-se localizado no cromossoma 21. Até ao momento foram descritos, para este *locus,* 11 alelos (MACHUGH *et al.*,1997).

Na figura 3.8 apresentam-se os fenótipos de HEL5, obtidos neste trabalho, após separação por electroforese horizontal (Gel A) e vertical (Gel B).

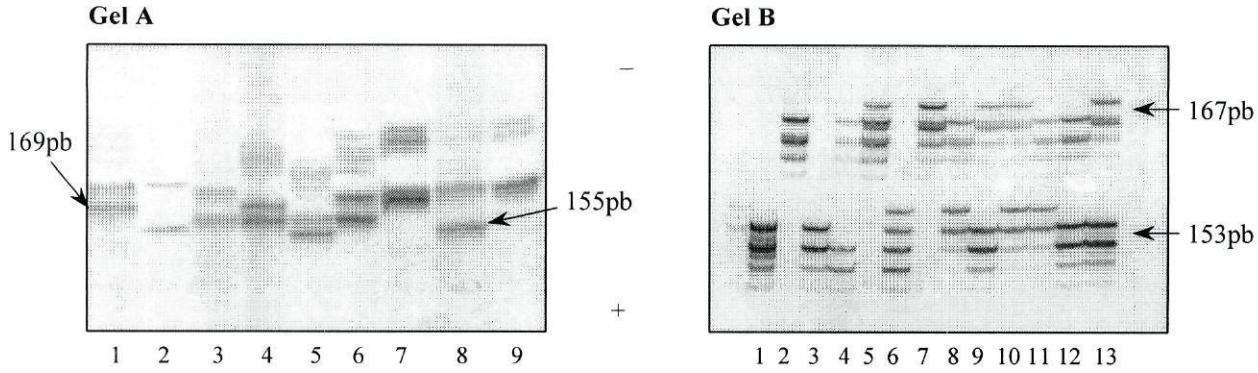



**Figura 3.8**: **HEL5**: resultados da electroforese de rotina: **Gel A**: (1) 163-169pb; (2) 155-169pb; (3) 159-167pb; (4) 159-163pb; (5) 155-159pb; (6) 159-167pb; (7) 165-167pb; (8) 155-167pb; (9) 167pb. **Gel B**: (1,3) 153pb; (2) 165pb; (4) 151-165pb; (5) 165-167pb; (6) 151-155pb; (7) 167pb; (8,11) 155-165pb; (9,13) 153-167pb; (10) 155-167pb; (12) 153-165pb.

Na separação electroforética dos alelos referentes a este marcador foram utilizados géis verticais desnaturantes. Contudo, devido ao aparecimento de bandas espúrias que provocaram dificuldades de leitura, principalmente na distinção entre indivíduos homozigóticos e heterozigóticos com produtos amplificados adjacentes, optou-se por correr estas amostras em géis horizontais nativos de dimensões 10cm x 23,5cm x 0,3 cm com uma malha de T8C5. Todavia, este sistema não foi adoptado como rotina porque nem sempre se conseguiu obter uma boa definição e separação das bandas, devido ao seu peso molecular.

Neste trabalho foram encontrados, nas cinco raças em estudo, 9 alelos, oscilando o seu peso molecular entre 151 e 169pb.

## HEL9

Na figura 3.9 apresentam-se os fenótipos de HEL9 obtidos após separação por electroforese horizontal (Gel A) e vertical (Gel B).

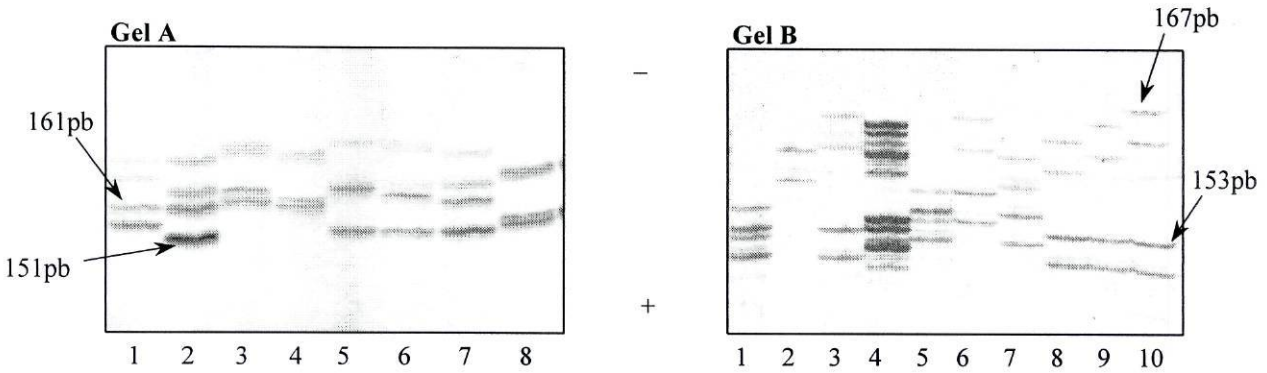



**Figura 3.9**: **HEL9**: resultados da electroforese de rotina: **Gel A**: (1) 155-161pb; (2) 151-161pb; (3) 163-167pb; (4) 161-163pb; (5) 153-167pb; (6) 153-165pb; (7) 153-163pb; (8) 155-157pb. **Gel B**: (1) 153-155pb; (2) 161pb; (3,9) 153-165pb; (4,8) 153-163pb; (5) 155-157pb; (6) 157-165pb; (7) 155-161pb; (10) 153-167pb. As amostras 5, 6, 7 e 8 no gel horizontal nativo (Gel A) correspondem às amostras 10, 9, 8 e 5 no gel vertical (Gel B), respectivamente.

O microssatélite HEL9 (clonado por KAUKINEN e VARVIO, 1993) está localizado no cromossoma 8 e é constituído por uma sequência repetida de $(GT)_{25}$. Até ao momento, estão descritos 13 alelos (SCHMID *et al.*, 1999).

Tal como aconteceu para o *locus* HEL5, foram utilizados os dois sistemas electroforéticos para facilitar a leitura dos fenótipos.

Dos marcadores estudados, o HEL9 foi aquele que apresentou o maior número de alelos (12), oscilando o seu peso molecular entre 147 e 169pb.

## 3.3.2 Análise populacional *locus* a *locus*

Nas tabelas 3.6 a 3.19 apresentam-se as frequências alélicas para cada um dos microssatélites analisados e os parâmetros indicadores do grau de variabilidade genética encontrado nas populações em estudo.

As tabelas referentes às distribuições fenotípicas observadas nas populações analisadas, para os 7 marcadores genéticos estudados, e os respectivos valores esperados de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg encontram-se em anexo. Nestas tabelas incluem-se, ainda, os valores de probabilidade correspondentes ao teste exacto (± desvio padrão) (GUO E THOMPSON, 1992).

### HEL1

Na tabela 3.6 apresentam-se as frequências alélicas das várias populações em estudo, para o *locus* HEL1.

**Tabela 3.6:** Frequências alélicas para o microssatélite HEL1 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 103 | 0,42 (±0,05) | 0,15 (±0,04) | 0,21 (±0,04) | 0,24 (±0,04) | 0,08 (±0,05) |
| 105 | 0,41 (±0,05) | 0,51 (±0,05) | 0,12 (±0,03) | 0,40 (±0,05) | 0,42 (±0,05) |
| 109 | ---- | ---- | 0,01 (±0,00) | 0,01 (±0,00) | ---- |
| 111 | ---- | 0,05 (±0,02) | 0,02 (±0,01) | 0,04 (±0,02) | 0,01 (±0,00) |
| 113 | 0,15 (±0,04) | 0,24 (±0,04) | 0,64 (±0,05) | 0,31 (±0,05) | 0,48 (±0,05) |
| 115 | 0,02 (±0,01) | 0,05 (±0,02) | ---- | ---- | 0,01 (±0,01) |

A distribuição populacional dos diferentes alelos do *locus* HEL1 evidencia a existência de uma distribuição diferenciada. Assim, verifica-se que o alelo 105pb apresenta uma frequência elevada para a maioria das raças analisadas com excepção da Mirandesa. Por outro lado, a elevada frequência do alelo 103pb na raça Barrosã assemelha-se à

encontrada nas raças taurinas do Oeste africano (0,41-0,53) (MACHUGH *et al.*, 1997) afastando-se da encontrada nas raças analisadas neste trabalho.

O alelo 115pb encontrado nas raças Barrosã, Maronesa e Alentejana não foi detectado no conjunto de 20 raças europeias, africanas e indianas (zebuínas) estudadas por MACHUGH *et al.* (1997). Torna-se, assim, importante alargar esta análise a outras raças no sentido de esclarecer se este alelo é privativo das raças portuguesas.

Em geral, o padrão das frequências alélicas das raças portuguesas assemelha-se ao encontrado nas raças europeias analisadas por MACHUGH *et al.* (1997), distanciando-se do padrão encontrado, pelos mesmos autores, em raças africanas e zebuínas. Com efeito, nas raças portuguesas e europeias a frequência dos alelos 105pb e 113pb é claramente mais elevada e, verifica-se, ainda, a ausência do alelo 117pb nas raças portuguesas e europeias encontrando-se nas raças taurinas africanas e zebuínas (MACHUGH *et al.* 1997).

Na tabela 3.7 comparam-se os valores correspondentes à análise da variabilidade genética para o *locus* HEL1, nas cinco raças em estudo.

**Tabela 3.7**: HEL1: Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | $n_a$ | $H_e$ | $H_o$ | $^{+}F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 4 | 0,6390 | 0,6400 | -0,0016 | 0,3485 |
| Maronesa | 49 | 5 | 0,6627 | 0,6531 | +0,0148 | 0,4158 |
| Mirandesa | 50 | 5 | 0,5368 | 0,6000 | -0,1191 | 0,2972 |
| Mertolenga | 50 | 5 | 0,6915 | 0,6000 | +0,1335** | 0,4144 |
| Alentejana | 50 | 5 | 0,5925 | 0,4200 | +0,2933** | 0,2991 |

$^{+}F_{IS} > 0$ deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a $^{*}P \leq 0,05$, $^{**}P \leq 0,01$.

A análise da tabela revela a existência de diferenças significativas entre os valores observados e esperados de heterozigotia para as raças Mertolenga e Alentejana, causadas por um défice de heterozigóticos.

Os resultados aqui apresentados revelam que HEL1 é um marcador de considerável utilidade na diferenciação das raças bovinas estudadas.

## INRA37

Na tabela 3.8 estão representadas as frequências alélicas do *locus* INRA37 obtidas nas cinco populações em análise.

**Tabela 3.8**: Frequências alélicas para o microssatélite INRA37 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 118 | 0,01 (±0,00) | ---- | ---- | 0,01 (±0,00) | --- |
| 120 | ---- | ---- | ---- | 0,01 (±0,00) | ---- |
| 122 | 0,02 (±0,01) | ---- | ---- | ---- | 0,03 (±0,02) |
| 124 | 0,19 (±0,04) | 0,03 (±0,02) | 0,07 (±0,03) | ---- | ---- |
| 126 | 0,18 (±0,04) | 0,12 (±0,03) | 0,54 (±0,05) | 0,34 (±0,05) | 0,19 (±0,04) |
| 128 | 0,08 (±0,03) | 0,03 (±0,02) | 0,04 (±0,02) | 0,02 (±0,01) | 0,14 (±0,03) |
| 130 | 0,13 (±0,03) | ---- | ---- | 0,03 (±0,02) | 0,10 (±0,03) |
| 132 | 0,37 (±0,05) | 0,82 (±0,04) | 0,35 (±0,05) | 0,57 (±0,05) | 0,53 (±0,05) |
| 136 | 0,01 (±0,00) | ---- | ---- | 0,02 (±0,01) | ---- |
| 138 | 0,01 (±0,00) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 140 | ---- | ---- | ---- | ---- | 0,01 (±0,00) |

A análise da tabela realça uma grande diferença no número de alelos existente nas várias raças estudadas. De facto, na raça Barrosã foram encontrados 9 alelos enquanto que apenas 4 alelos foram observados nas raças Maronesa e Mirandesa. Destes, verifica-se que o alelo 124pb só foi encontrado nas raças do Norte (Barrosã, Maronesa e Mirandesa).

O alelo 132pb é o mais frequente em todas as raças, com excepção da raça Mirandesa, resultado que se assemelha ao observado para o *locus* HEL1 em que se verifica a diferenciação desta raça em relação às restantes. Na raça Maronesa este alelo surge com uma frequência bastante elevada quando comparada com as outras raças.

A presença de alelos privativos foi observada nas raças Barrosã, Mertolenga e Alentejana, ainda que em baixa frequência.

Na tabela 3.9 apresentam-se os valores da análise da variabilidade genética para o *locus* INRA37.

**Tabela 3.9**: INRA37: Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | $n_a$ | $H_e$ | $H_o$ | $^{\cdot}F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 9 | 0,7784 | 0,7200 | +0,0757 | 0,5680 |
| Maronesa | 49 | 4 | 0,3200 | 0,2857 | +0,1082 | 0,1656 |
| Mirandesa | 50 | 4 | 0,5844 | 0,6000 | -0,0255 | 0,3035 |
| Mertolenga | 50 | 7 | 0,5564 | 0,5200 | +0,0660 | 0,2784 |
| Alentejana | 50 | 6 | 0,6693 | 0,4800 | $+0,2849^{**}$ | 0,4367 |

$^{\cdot}F_{IS}$> 0 deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a $^{*}P \leq 0,05$, $^{**}P \leq 0,01$.

Os valores de heterozigotia observados nas várias populações não demonstraram ser significativamente diferentes dos esperados, com excepção dos valores encontrados para a raça Alentejana, em resultado de um excesso de homozigóticos para o alelo 132pb ($F_{IS}$ = +0,2849).

De um modo geral, verifica-se que este *locus* é bastante informativo na identificação dos indivíduos da raça Barrosã, não se verificando o mesmo para a raça Maronesa.

**INRA23**

Na tabela 3.10 estão discriminadas as frequências alélicas obtidas para o microssatélite INRA23 nas populações estudadas. A sua análise revela a existência de determinados alelos que diferenciam as cinco raças. Neste contexto, é de salientar o alelo 211pb que só foi encontrado nas raças do Norte e o alelo 207pb que apresenta frequências superiores para as raças do Sul (Mertolenga e Alentejana). Na raça Mirandesa observa-se uma frequência mais elevada para o alelo 209pb relativamente às outras raças, verificando-se o mesmo com o alelo 217pb para as raça Barrosã e Maronesa. É de salientar, ainda, a baixa frequência do alelo 199pb nas raças Mirandesa e Maronesa.

**Tabela 3.10**: Frequências alélicas para o microssatélite INRA23 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 199 | 0,13 (±0,03) | 0,02 (± 0,01) | 0,01 (± 0,00) | 0,16 (± 0,04) | 0,21 (± 0,04) |
| 201 | 0,03 (±0,02) | --- | ---- | ---- | 0,02 (± 0,01) |
| 205 | ---- | 0,01 (± 0,01) | ---- | ---- | ---- |
| 207 | 0,17 (± 0,04) | 0,11 (± 0,03) | 0,12 (± 0,03) | 0,32 (± 0,05) | 0,39 (± 0,05) |
| 209 | 0,15 (± 0,04) | 0,21 (± 0,04) | 0,55 (± 0,05) | 0,14 (± 0,03) | 0,18 (± 0,04) |
| 211 | 0,05 (± 0,02) | 0,01 (± 0,01) | 0,01 (± 0,00) | ---- | ---- |
| 213 | 0,05 (± 0,02) | 0,05 (± 0,02) | 0,02 (± 0,01) | ---- | 0,03 (± 0,02) |
| 215 | 0,20 (± 0,04) | 0,34 (± 0,05) | 0,20 (± 0,04) | 0,33 (± 0,05) | 0,15 (± 0,04) |
| 217 | 0,22 (± 0,04) | 0,25 (± 0,04) | 0,09 (± 0,03) | 0,05 (± 0,02) | 0,02 (± 0,01) |

Na tabela 3.11 estão expressos os valores relativos à variabilidade genética das cinco raças estudadas, para o *locus* INRA23.

**Tabela 3.11**: INRA23: Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | Na | $H_e$ | $H_o$ | $F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 8 | 0,8459 | 0,8200 | +0,0309 | 0,6736 |
| Maronesa | 49 | 8 | 0,7728 | 0,5510 | +0,2891* | 0,5492 |
| Mirandesa | 50 | 7 | 0,6408 | 0,5800 | +0,0958 | 0,4070 |
| Mertolenga | 50 | 5 | 0,7485 | 0,7200 | +0,0384** | 0,5068 |
| Alentejana | 50 | 7 | 0,7547 | 0,7800 | -0.0338 | 0,5276 |

$F_{IS} > 0$ deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P ≤0,05, **P ≤0,01.

Na raça Maronesa e Mertolenga verifica-se um défice de heterozigóticos que leva a um desvio significativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Relativamente às outras raças, os valores observados e esperados de heterozigotia são semelhantes.

Pela análise dos dados obtidos verifica-se que, para este microssatélite, as raças apresentam valores elevados de heterozigotia e, consequentemente, valores altos de probabilidade de um indivíduo falsamente identificado como pai de ser excluído (Pex). Desta forma, pode-se concluir que o *locus* INRA23 é um bom marcador na análise de controlo de parentesco e identificação individual.

## ETH3

Na tabela 3.12 estão representadas as frequências alélicas relativas ao *locus* ETH3 para as raças consideradas neste trabalho.

**Tabela 3.12**: Frequências alélicas para o microssatélite ETH3 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 109 | 0,04 (± 0,02) | 0,13 (± 0,03) | 0,58 (± 0,05) | 0,05 (± 0,02) | 0,15 (± 0,04) |
| 115 | ---- | 0,02 (± 0,01) | ---- | 0,10 (± 0,03) | 0,03 (± 0,02) |
| 117 | 0,24 (± 0,04) | 0,28 (± 0,04) | 0,14 (± 0,03) | 0,42 (± 0,05) | 0,28 (± 0,04) |
| 119 | 0,17 (± 0,04) | 0,06 (± 0,02) | 0,08 (± 0,03) | 0,07 (± 0,03) | 0,17 (± 0,04) |
| 121 | 0,01 (± 0,00) | 0,01 (± 0,01) | 0,01 (± 0,00) | 0,03 (± 0,02) | ---- |
| 123 | 0,04 (± 0,02) | 0,08 (± 0,03) | 0,02 (± 0,01) | ---- | 0,01 (± 0,00) |
| 125 | 0,43 (± 0,05) | 0,36 (± 0,05) | 0,10 (± 0,03) | 0,28 (± 0,04) | 0,34 (± 0,05) |
| 127 | 0,04 (± 0,02) | 0,06 (± 0,02) | 0,06 (± 0,02) | 0,05 (± 0,02) | 0,01 (± 0,00) |
| 129 | 0,02 (± 0,01) | ---- | ---- | ---- | 0,01 (± 0,00) |
| 131 | ---- | ---- | 0,01 (± 0,00) | ---- | ---- |
| 133 | 0,01 (± 0,00) | ---- | ---- | ---- | ---- |

Dos resultados obtidos, observa-se que os alelos 117 e 125pb são os mais comuns nas raças analisadas, com excepção da raça Mirandesa que, mais uma vez, se destaca das restantes, apresentando frequências mais elevadas para o alelo 109pb. Nas raças Mirandesa e Barrosã foram observados alelos privativos em baixa frequência.

Na tabela 3.13 indicam-se os valores da análise da variabilidade genética encontrados para o *locus* em análise.

**Tabela 3.13**: ETH3: Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | $N_a$ | $H_e$ | $H_o$ | $^{+}F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 9 | 0,7305 | 0,7000 | +0,0422 | 0,5031 |
| Maronesa | 49 | 8 | 0,7721 | 0,7959 | -0,0311 | 0,5591 |
| Mirandesa | 50 | 8 | 0,6297 | 0,6600 | -0,0486 | 0,4185 |
| Mertolenga | 50 | 7 | 0,7317 | 0,5800 | +0,2090$^{*}$ | 0,5057 |
| Alentejana | 50 | 8 | 0,7610 | 0,7000 | +0,0809 | 0,5285 |

$^{+}F_{IS} > 0$ deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a $^{*}P \leq 0,05$, $^{**}P \leq 0,01$.

Com excepção da raça Mertolenga ($F_{IS}$=+0,2090) todas as raças demonstram estar em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

As raças em estudo apresentam valores elevados de heterozigotia para este *locus*, verificando-se resultados idênticos em quatro raças Belgas (H = 0,61 a 0,78) (PEELMAN *et al.*, 1998), o que confirma a utilidade deste *locus* neste tipo de estudos.

**INRA5**

Na tabela 3.14 indicam-se as frequências alélicas obtidas para o microssatélite INRA5 nas diferentes populações analisadas.

**Tabela 3.14**: Frequências alélicas para o microssatélite INRA5 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 139 | 0,39 (± 0,05) | 0,34 (± 0,05) | 0,35 (± 0,05) | 0,36 (± 0,05) | 0,39 (± 0,05) |
| 141 | 0,38 (± 0,05) | 0,41 (± 0,05) | 0,37 (± 0,05) | 0,40 (± 0,05) | 0,37 (± 0,05) |
| 143 | 0,18 (± 0,04) | 0,08 (± 0,03) | 0,28 (± 0,04) | 0,24 (± 0,04) | 0,24 (± 0,04) |
| 145 | 0,05 (± 0,02) | 0,17 (± 0,04) | ---- | ---- | ---- |

Como já foi referido anteriormente, o *locus* INRA5 é o microssatélite em estudo que apresenta um menor número de alelos. Com efeito, foram encontrados 4 alelos, dos quais o alelo 145pb apenas aparece nas raças Barrosã e Maronesa, com frequências distintas. Dos restantes alelos, os produtos génicos 139pb e 141pb são os mais frequentes nas cinco populações em estudo. O baixo número de alelos neste *locus* verifica-se, também, na maioria das raças europeias, tendo diversos autores encontrado apenas 3 alelos (CIAMPOLINI *et al.*, 1995; MOAZAMI-GOUDARZI *et al.*, 1994; PEELMAN *et al.*, 1998; SCHMID *et al.*, 1999).

A análise de variabilidade genética e a conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para o *locus* INRA5 apresentam-se na tabela 3.15.

**Tabela 3.15**: INRA5: Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | $N_a$ | $H_e$ | $H_o$ | $^{+}F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 4 | 0,6754 | 0,7200 | -0,0668 | 0,3958 |
| Maronesa | 49 | 4 | 0,6903 | 0,8980 | -0,3049$^{*}$ | 0,4198 |
| Mirandesa | 50 | 3 | 0,6689 | 0,7400 | -0,1075 | 0,3667 |
| Mertolenga | 50 | 3 | 0,6594 | 0,7400 | -0,1240 | 0,3588 |
| Alentejana | 50 | 3 | 0,6600 | 0,7000 | -0,0613 | 0,3592 |

$^{+}F_{IS}$> 0 deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a $^{*}P \leq 0,05$, $^{**}P \leq 0,01$.

A não conformidade com o formalismo de Hardy-Weinberg apenas se observa na raça Maronesa. Este facto deve-se a um excesso de heterozigóticos provocado pelo elevado número de indivíduos possuidores do fenótipo 139/141pb.

## HEL5

Na tabela 3.16 comparam-se as frequências alélicas estimadas em cada uma das populações, para o *locus* HEL5.

**Tabela 3.16**: Frequências alélicas para o microssatélite HEL5 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 151 | ---- | 0,09 (± 0,03) | ---- | ---- | ---- |
| 153 | 0,46 (± 0,05) | 0,26 (± 0,04) | 0,36 (± 0,05) | 0,39 (± 0,05) | 0,10 (± 0,03) |
| 155 | 0,06 (± 0,02) | 0,05 (± 0,02) | 0,01 (± 0,00) | 0,23 (± 0,04) | 0,11 (± 0,03) |
| 157 | ---- | ---- | 0,07 (± 0,03) | 0,01 (± 0,00) | 0,03 (± 0,02) |
| 159 | 0,01 (± 0,00) | ---- | 0,30 (± 0,05) | 0,01 (± 0,00) | 0,17 (± 0,04) |
| 163 | 0,03 (± 0,02) | 0,02 (± 0,01) | 0,04 (± 0,02) | 0,01 (± 0,00) | 0,11 (± 0,03) |
| 165 | 0,28 (± 0,04) | 0,12 (± 0,03) | ---- | 0,04 (± 0,02) | 0,17 (± 0,04) |
| 167 | 0,16 (± 0,04) | 0,46 (± 0,05) | 0,22 (± 0,04) | 0,31 (± 0,05) | 0,23 (± 0,04) |
| 169 | ---- | ---- | ---- | ---- | 0,08 (± 0,03) |

A análise da tabela permite verificar que cada população apresenta um padrão distinto. Desta forma, verifica-se que a raça Alentejana possui o maior número de alelos

apresentando-se estes com frequências relativamente semelhantes, o mesmo já não se verifica para as outras populações em que ocorre sempre a presença de um ou dois alelos com frequências superiores a 0,30. Além disso, o alelo 159pb apresenta uma frequência razoável nas raças Mirandesa e Alentejana, estando praticamente ausente nas outras raças analisadas. Há a salientar, também, a ausência do alelo 165pb na raça Mirandesa. As raças Alentejana e a Maronesa possuem alelos que não foram encontrados nas outras populações analisadas, mas que se encontram em baixa frequência nalgumas raças europeias (MACHUGH *et al.*,1997).

Ao comparar estes dados com os obtidos por MACHUGH *et al.* (1997) para este microssatélite, verifica-se, igualmente, que não há um padrão uniforme das frequências alélicas nas raças europeias. Contudo, tanto o conjunto das raças europeias, incluindo as deste trabalho, como as taurinas africanas e as zebuínas apresentam um número máximo de dez alelos, com excepção das raças do Norte da Índia, que apenas possuem seis alelos (MACHUGH *et al.*, 1997). Estes resultados contradizem em parte os obtidos através de marcadores proteicos apresentados por BRAEND (1971) e CECHINI e NIJS (1986) que verificaram um maior número de alelos nas raças africanas e zebuínas. De facto, seria de esperar que as raças europeias por terem estado sujeitas a uma maior pressão selectiva por parte do Homem, principalmente no último século, apresentassem um menor número de alelos relativamente aos outros grupos raciais. A não conformidade deste pressuposto com os resultados aqui apresentados e os resultados obtidos por MACHUGH *et al.* (1997) poderá estar inerente ao tipo de amostragem efectuado ou, simplesmente, de este resultado se verificar apenas para este *locus*. Desta forma, seria importante aumentar o número de *loci* analisados nos vários grupos raciais, no sentido de se esclarecer esta questão.

Na tabela 3.17 estão representados os valores correspondentes à variabilidade genética das populações em análise.

**Tabela 3.17**: HEL5: Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | $n_a$ | $H_e$ | $H_o$ | $^{+}F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 6 | 0,6867 | 0,7600 | -0,1080 | 0,4328 |
| Maronesa | 49 | 6 | 0,7040 | 0,6200 | +0,1033 | 0,4673 |
| Mirandesa | 50 | 6 | 0,7327 | 0,7600 | -0,0376 | 0,4820 |
| Mertolenga | 50 | 7 | 0,8564 | 0,7800 | +0,1204 | 0,4366 |
| Alentejana | 50 | 8 | 0,7048 | 0,6327 | +0,0900 | 0,6943 |

$^{+}F_{IS} > 0$ deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a $^{*}P \leq 0,05$, $^{**}P \leq 0,01$.

Não se observaram desvios significativos entre os valores observados e os esperados segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg nas várias populações analisadas, verificando-se para todas elas elevados valores de heterozigotia. O mesmo resultado encontrou MACHUGH e seus colaboradores (1997) em 20 raças estudadas.

**HEL9**

As frequências alélicas relativas ao *locus* HEL9, para as raças analisadas encontram-se descritas na tabela 3.18. A sua análise revela a elevada diversidade genética deste microssatélite, encontrando-se descritos 12 alelos distintos, quase todos representados na raça Barrosã. Destes alelos, o 153pb, 155pb, 159pb, 161pb e 163pb estão presentes na totalidade das populações estudadas e evidenciam uma clara diferenciação entre elas. De facto, não só a raça Mirandesa se distingue das restantes raças, como também são perceptíveis diferenças entre os grupos Barrosã/Maronesa e Mertolenga/Alentejana. Além disso, a raça Maronesa para os alelos 153pb e 167pb mostra padrões inversos aos das outras raças, e o alelo 157pb apresenta na raça Alentejana valores de frequência apreciáveis, estando quase ausente nas outras raças.

**Tabela 3.18**: Frequências alélicas para o microssatélite HEL9 em 5 raças bovinas autóctones Portuguesas.

| Alelos (pb) | Barrosã (N=50) | Maronesa (N=49) | Mirandesa (N=50) | Mertolenga (N=50) | Alentejana (N=50) |
|---|---|---|---|---|---|
| 147 | 0,02 (± 0,01) | ---- | ---- | 0,04 (± 0,02) | ---- |
| 149 | 0,01 (± 0,00) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 151 | 0,01 (± 0,00) | ---- | ---- | ---- | ---- |
| 153 | 0,18 (± 0,04) | 0,02 (± 0,01) | 0,28 (± 0,04) | 0,36 (± 0,05) | 0,16 (± 0,04) |
| 155 | 0,09 (± 0,03) | 0,07 (± 0,03) | 0,03 (± 0,02) | 0,16 (± 0,04) | 0,10 (± 0,03) |
| 157 | 0,01 (± 0,00) | ---- | 0,01 (± 0,00) | ---- | 0,23 (± 0,04) |
| 159 | 0,06 (± 0,02) | 0,01 (± 0,01) | 0,02 (± 0,01) | 0,03 (± 0,02) | 0,01 (± 0,00) |
| 161 | 0,30 (± 0,05) | 0,39 (± 0,05) | 0,09 (± 0,03) | 0,21 (± 0,04) | 0,28 (± 0,04) |
| 163 | 0,29 (± 0,05) | 0,22 (± 0,04) | 0,56 (± 0,05) | 0,17 (± 0,04) | 0,14 (± 0,03) |
| 165 | 0,02 (± 0,01) | ---- | ---- | ---- | 0,08 (± 0,03) |
| 167 | 0,01 (± 0,00) | 0,29 (± 0,05) | 0,01 (± 0,00) | 0,01 (± 0,00) | ---- |
| 169 | ---- | ---- | ---- | 0,02 (± 0,01) | ---- |

Na tabela 3.19 estão representados os valores da variabilidade genética encontrados nas cinco raças em estudo para o *locus* HEL9.

**Tabela 3.19**: HEL9. Análise da variabilidade genética. N – número de indivíduos; $n_a$ – número de alelos; $H_e$ – heterozigotia esperada, $H_o$ – heterozigotia observada, $F_{IS}$ – coeficiente da deficiência de heterozigóticos; Pex – probabilidade de exclusão *a priori*.

| População | N | $n_a$ | $H_e$ | $H_o$ | $^{+}F_{IS}$ | Pex |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50 | 11 | 0,7885 | 0,7400 | +0,0621 | 0,5780 |
| Maronesa | 49 | 6 | 0,7193 | 0,6327 | +0,1216 | 0,4620 |
| Mirandesa | 50 | 7 | 0,6044 | 0,6600 | -0,0929 | 0,3595 |
| Mertolenga | 50 | 8 | 0,7766 | 0,7000 | +0,0995$^{*}$ | 0,5612 |
| Alentejana | 50 | 7 | 0,8152 | 0,8800 | -0,0804 | 0,6192 |

$^{+}F_{IS} > 0$ deficiência de heterozigóticos. Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a $^{*}P \leq 0,05$, $^{**}P \leq 0,01$.

A deficiência de indivíduos heterozigóticos observada na população Mertolenga permite rejeitar a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($F_{IS}$=+0,0995) nesta população. Os valores de heterozigotia revelam um elevado poder informativo deste microssatélite, à semelhança dos outros microssatélites analisados neste trabalho.

## 3.3.3 Análise populacional conjunta

### 3.3.3.1 Variabilidade genética

Num total de 249 indivíduos analisados para os sete microssatélites foram detectados 61 alelos.

Na tabela 3.20 estão representados alguns parâmetros indicadores da variabilidade genética das cinco populações em estudo.

O número médio de alelos por *locus* é superior na raça Barrosã (7,29), sendo esta a raça que apresenta o maior número de alelos em todos os microssatélites com excepção do *locus* HEL9. Pelo contrário, a raça Mirandesa apresenta o menor número de alelos com uma média de 5,71 por *locus*, obtendo, também, a mais baixa heterozigotia média, o que poderá ser explicado pela redução acentuada do efectivo populacional que ocorreu nos últimos anos nesta raça. Este resultado verifica-se, igualmente, na análise proteica. Segundo CORNUET e LUIKART (1996) quando uma população experimenta uma redução do efectivo desenvolve, geralmente, um excesso de indivíduos heterozigóticos que persiste durante um certo número de gerações até que um novo equilíbrio seja estabelecido. Na raça Mirandesa este excesso é, ainda, perceptível na análise de microssatélites, embora não se revele significativo.

**Tabela 3.20**: Variabilidade genética das cinco populações em estudo da análise de 7 *loci* de microssatélites. N – efectivo médio estudado por *locus*, $n_a$ – número médio de alelos por *locus*, H – heterozigotia média (Nei, 1978); Pex – probabilidade de exclusão *a priori*. Entre parêntesis indicam-se os valores do erro padrão.

| População | N | $n_a$ | H | Pex |
|---|---|---|---|---|
| Barrosã | 50,0 (0,0) | 7,29 | 0,735 (0,1) | 0,993 |
| Maronesa | 49,0 (0,0) | 5,86 | 0,663 (0,2) | 0,984 |
| Mirandesa | 50,0 (0,0) | 5,71 | 0,628 (0,1) | 0,965 |
| Mertolenga | 50,0 (0,0) | 5,86 | 0,695 (0,1) | 0,984 |
| Alentejana | 50,0 (0,0) | 6,29 | 0,730 (0,1) | 0,993 |

Na figura 3.10 apresentam-se as heterozigotias médias encontradas para as cinco raças em estudo. A sua análise revela valores semelhantes entre as várias populações. No entanto, a raça Barrosã e Alentejana apresentam valores ligeiramente superiores. O

resultado obtido para a raça Alentejana aproxima-se do encontrado para os marcadores proteicos. Relativamente à raça Barrosã, das amostras analisadas para os *loci* proteicos (LEAL, 1998), realizou-se uma selecção de 50 amostras para análise de microssatélites, de forma a obter uma amostra representativa da população e não enviesada por indivíduos aparentados. Tal facto poderá ter conduzido à obtenção de valores mais altos de heterozigotia nesta raça relativamente às restantes.

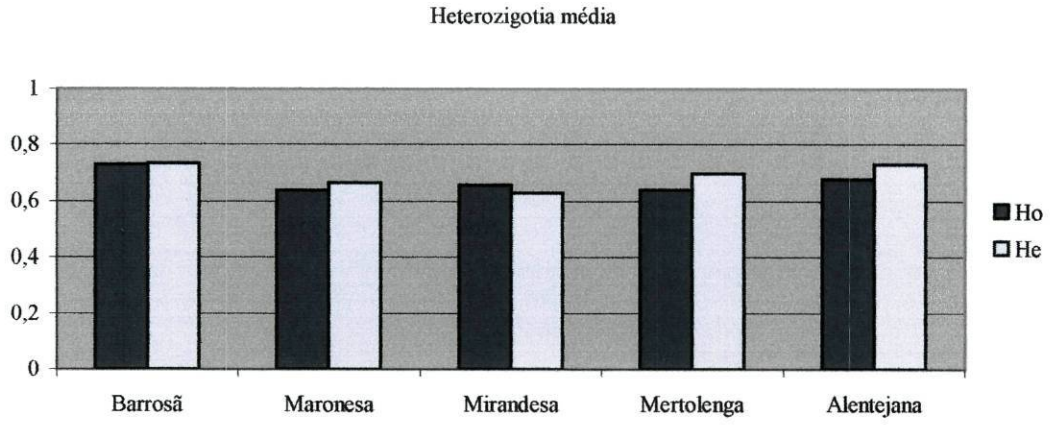



**Figura 3.10** - Representação da variabilidade genética através da heterozigotia observada e esperada nas populações estudadas.

Na maior parte dos microssatélites analisados, foram observados desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg estando, provavelmente, associados a uma deficiência de heterozigóticos. Este desvio é particularmente evidente na raça Mertolenga, onde ocorrem diferenças significativas entre os valores observados e esperados em 4 dos microssatélites analisados. Estes dados são similares aos obtidos para os *loci* proteicos. A perturbação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg existente nesta população poderá estar relacionada com uma maior percentagem de indivíduos aparentados presentes na amostra ou devido à existência de subestruturação.

Os valores altos da probabilidade de exclusão *a priori*, verificados para todas as populações com apenas sete microssatélites, demonstram o elevado potencial informativo destes marcadores em análises de controlo de parentesco.

O número de alelos privativos encontrados nas cinco raças em análise variou de 1 (raça Mirandesa) e 4 (raça Barrosã). Contudo, somente alguns destes alelos apresentam frequências superiores a 0,02.

Tal como seria de esperar, os microssatélites revelam valores bastante superiores de heterozigotia (compreendidos entre 0,628 e 0,735) comparativamente aos obtidos através de *loci* proteicos (compreendidos entre 0,150 e 0,331). O número de alelos por *locus* e o poder de exclusão *a priori* são também claramente superiores neste tipo de marcadores.

Ao confrontar o grau de variação genética encontrado nas cinco raças autóctones portuguesas com o obtido para outras raças bovinas europeias é indispensável ter presente as limitações comparativas para este tipo de informação, devido à sensibilidade dos parâmetros de diversidade genética face ao número e tipo de *loci* incluídos na análise. Com efeito, os dados disponíveis na literatura são referentes a uma grande variedade de *loci* limitando o estudo da diversidade genética existente e, consequentemente, o cálculo das distâncias genéticas. Desta forma, a FAO criou uma lista de microssatélites, para raças bovinas, com o intuito de ser utilizada como standard. No entanto, este procedimento não foi ainda completamente implementado subsistindo, assim, dificuldades de comparação dos resultados obtidos. Todavia, e de uma forma geral, é possível concluir que os dados aqui apresentados são coerentes com os dados bibliográficos (MOAZAMI-GOUDARZI *et al.*, 1997; MACHUGH *et al.*, 1998; PEELMAN *et al.*, 1998; SCHMID *et al.*, 1999) verificando-se que populações com um menor efectivo populacional apresentam um menor número de alelos e, quase sempre, valores de heterozigotia mais baixos. Este aspecto faz realçar a importância de estudos de diversidade genética de raças em estado crítico ou em perigo, uma vez que podem ser usados como ferramenta no processo de conservação "*in situ*".

# 4

# Estrutura e Diferenciação Populacional

## 4.1 INTRODUÇÃO

A diversidade genética é a base das modificações evolutivas em todas as espécies e está dependente de quatro forças: deriva genética, mutação, selecção e migração.

Os modelos matemáticos utilizados para calcular a divergência entre duas populações descendentes de um ancestral comum assumem uma evolução independente de cada população, não considerando, portanto, a migração. Este pressuposto torna-se demasiado excessivo quando são consideradas raças bovinas, uma vez que se verifica um certo fluxo génico entre elas. Adicionalmente, a selecção não tem efeito nas alterações das frequências génicas no sentido em que se assume que os *loci* utilizados são selectivamente neutros. A diversidade genética depende, assim, de dois parâmetros: deriva genética e, por longos períodos de tempo, mutação. Contudo, na análise de raças bovinas europeias, muitas das quais divergiram há relativamente pouco tempo (aproximadamente 200 anos), o efeito de mutação pode ser ignorado.

Nos últimos anos a diversidade genética tem sido estudada numa grande variedade de raças bovinas, incluindo raças europeias, africanas e asiáticas. Estes estudos permitiram verificar a existência de dois processos de domesticação que terão dado origem às espécies (ou subespécies) *B. taurus* e *B. indicus* (LOFTUS *et al.*, 1994b; MACHUGH *et al.*, 1997; QUEVAL *et al.*, 1998). Além disso, foi possível observar a existência de uma grande divergência entre o *B. taurus* europeu e africano que levou a pressupor um terceiro processo de domesticação (BRADLEY *et al.*, 1996; MACHUGH *et al.*, 1997). Contudo, há que ter em consideração que, numa análise mais restrita em termos geográficos, nomeadamente ao estudo das raças bovinas europeias, as árvores baseadas nas distâncias genéticas não reflectem a história evolutiva das populações, uma vez que existem diferenças no efectivo populacional e consideráveis migrações entre as raças o que provoca distorções na topologia das mesmas. Estas árvores mostram, sobretudo, as relações entre as raças e a singularidade de cada uma, ou seja, a capacidade de uma raça se distinguir

relativamente às restantes. Esta característica é um dos critérios considerados para a conservação das raças autóctones uma vez que as raças com um padrão genético distinto têm uma maior probabilidade de possuírem diferentes alelos ou combinações de genes que afectam um considerável número de características que podem ser importantes na adaptação e selecção nas gerações futuras.

O conhecimento da estrutura das populações é, assim, um factor importante que contribui, por um lado, para elaboração de programas de conservação e para o estabelecimento de prioridades de acordo com a preservação das raças e, por outro, para a compreensão da história das populações domésticas, tal como das populações humanas e das suas rotas migratórias.

Neste capítulo pretendeu-se caracterizar a variação genética entre as várias populações analisadas e a sua relação com outras raças europeias. Neste contexto, foram utilizados alguns métodos estatísticos que se encontram descritos de seguida.

## 4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da estrutura das populações foram utilizados os seguintes métodos estatísticos:

i) cálculo das estimativas do grau de diferenciação genética (FIS, FIT FST) segundo WEIR e COCKERHAM (1984), utilizando o programa GENEPOP versão 3.1b (RAYMOND e ROUSSET, 1995).

ii) cálculo das distâncias genéticas de acordo com CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967), visto estas serem as mais apropriadas no estudo de populações relativamente próximas (TAKEZAKI e NEI, 1996). As árvores filogenéticas foram obtidas a partir das distâncias genéticas utilizando o programa PHYLIP versão 3.5 (FELSENSTEIN, 1983).

iii) para a verificação da correlação entre as distâncias genéticas calculadas com base em *loci* proteicos e microssatélites foi aplicado o teste Mantel utilizando o programa RT 2.0 (MANLY, 1996).

iv) a análise factorial de correspondência foi realizada no programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 1996-1998) e a representação gráfica no programa STATSFOT (1994).

v) para o cálculo das distâncias genéticas baseado nos genótipos dos indivíduos, (proporção dos alelos partilhados - (1-Ps)), utilizou-se o programa MICROSAT (MINCH *et al.*, 1995).

## 4.3 Estrutura das Populações

### Distribuição da diversidade genética

Na tabela 4.1 apresentam-se as estimativas $F_{IS}$, $F_{IT}$ e $F_{ST}$ (Weir e Cockerham, 1984) para as cinco populações estudadas, bem como as estimativas da heterozigotia total ($H_T$) e a heterozigotia média ($H_S$) das populações, de acordo com os *loci* proteicos e microssatélites.

**Tabela 4.1:** Distribuição relativa da diversidade genética nas cinco populações bovinas analisadas através da análise de 5 *loci* proteicos e 7 microssatélites.

| *Locus* | $H_S$ | $H_T$ | $F_{IS}$ | $F_{IT}$ | $F_{ST}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| ***Proteínas*** | | | | | |
| **HBB** | 0,045 | 0,045 | -0,040 | -0,015 | 0,024 |
| **CAII** | 0,307 | 0,335 | 0,009 | 0,105 | 0,096 |
| **ALB** | 0,182 | 0,202 | 0,242 | 0,344 | 0,135 |
| **TF** | 0,554 | 0,607 | -0,003 | 0,069 | 0,071 |
| **GC** | 0,374 | 0,453 | 0,183 | 0,322 | 0,170 |
| **Média** | 0,292 | 0,328 | 0,072 | 0,173 | 0,109 |
| ***Microssatélites*** | | | | | |
| **HEL1** | 0,625 | 0,682 | 0,068 | 0,163 | 0,102 |
| **INRA37** | 0,582 | 0,639 | 0,105 | 0,201 | 0,107 |
| **INRA23** | 0,753 | 0,804 | 0,083 | 0,154 | 0,078 |
| **ETH3** | 0,725 | 0,785 | 0,053 | 0,141 | 0,093 |
| **INRA5** | 0,700 | 0,675 | -0,133 | -0,122 | 0,010 |
| **HEL5** | 0,737 | 0,791 | 0,036 | 0,117 | 0,084 |
| **HEL9** | 0,741 | 0,805 | 0,024 | 0,119 | 0,097 |
| **Média** | 0,671 | 0,740 | 0,033 | 0,113 | 0,082 |

Os valores de $F_{IS}$ para os *loci* proteicos, apresentados na tabela 4.1, indicam a existência de uma acentuada deficiência de heterozigóticos nos *loci* ALB e GC e um ligeiro excesso no *locus* HBB. A média ponderada de $F_{IS}$ mostra uma deficiência de heterozigóticos de 0,072. Para os microssatélites verifica-se a existência de um ligeiro défice de heterozigóticos na maioria dos *loci* e um ligeiro excesso no *locus* INRA5 o que

leva a que a média ponderada de $F_{IS}$ mostre uma deficiência de heterozigóticos de 0,033 no total das populações.

Os marcadores que mais contribuem para a diferenciação entre as populações analisadas são os *loci* ALB ($F_{ST}$ = 0,135) e GC ($F_{ST}$ = 0,170), nos polimorfismos proteicos, e os *loci* INRA37 ($F_{ST}$ = 0,107) e HEL1 ($F_{ST}$ = 0,102), nos microssatélites. Pelo contrário, os *loci* HBB e INRA5, por terem um padrão semelhante na distribuição dos alelos nas diferentes raças, são os que contribuem menos para a diferenciação ($F_{ST}$ = 0,024 e $F_{ST}$ = 0,010, respectivamente).

É de realçar a grande variabilidade que os valores de $F_{ST}$ por *locus* podem assumir evidenciando a importância da análise de um grande número de *loci* para uma correcta estimativa da diferenciação genética inter e intrapopulacional.

A proporção da variação genética devida a diferenças entre as raças é de 0,109, pela análise dos *loci* proteicos, e de 0,082, pela análise de microssatélites. Esta baixa diferenciação populacional resulta de pequenas alterações das suas frequências génicas, provavelmente causadas pelo baixo número de animais destinados à reprodução e pelos cruzamentos dirigidos em cada raça. Como se pode constatar, a maior parte da diversidade genética é devida a diferenças intrapopulacionais.

Estes resultados são comparáveis aos obtidos por outros autores. Com efeito, MEDJURAC (comunicação pessoal *in* MACHUGH, 1996) ao analisar 62 raças europeias através de 20 marcadores proteicos obteve valores de GST (equivalente ao FST) de 0,084. MACHUGH *et al.* (1998), investigando 7 raças europeias, através de 20 microssatélites encontraram valores semelhantes (0,105). Os baixos valores obtidos explicam-se, para além das razões já mencionadas, pelo facto de a maior parte das raças analisadas se encontrar geograficamente próxima, possibilitando uma ocorrência apreciável de fluxo génico, e consequentemente, uma maior tendência para apresentar um menor grau de subestruturação.

## Análise da diferenciação populacional

Em populações relativamente próximas, a divergência genética resulta essencialmente da deriva genética. TAKEZAKI e NEI (1996) verificaram que para estas populações as distâncias que melhor inferem a correcta topologia, tanto a nível proteico como a nível de microssatélites, são as propostas por CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) e NEI *et al.* (1983). Esta situação deve-se essencialmente ao baixo coeficiente de variação e à aceitação da linearidade com o tempo destas distâncias clássicas, quando curtos períodos de tempo são considerados.

Neste trabalho apresentam-se as matrizes de distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) e não as de NEI *et al.* (1983) uma vez que as primeiras revelaram uma melhor resolução dos agrupamentos.

Na construção das árvores representativas das relações genéticas das raças foram usados os métodos de agrupamento NJ (*Neighbor-joining*, SAITOU e NEI, 1987) e UPGMA (*Unweighted Pair-group arithmetic average*; SNEATH e SOKAL, 1973). A consistência dos padrões de agrupamento, em ambas as árvores, foi determinada através de um teste de reamostragem do tipo *bootstrap* (100 réplicas).

Na tabela 4.2 apresentam-se as distâncias genéticas calculadas para as raças em estudo com base na análise de 4 *loci* proteicos. A existência de ligação factorial entre os *loci* ALB e GC levou à exclusão deste último no cálculo das distâncias genéticas, uma vez que se encontram disponíveis mais dados sobre o *locus* ALB.

**Tabela 4.2**: Matriz de distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) para as cinco raças bovinas autóctones portuguesas baseada na análise de 4 *loci* proteicos.

| População | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) Barrosã | - | | | | |
| (2) Maronesa | 0,065 | - | | | |
| (3) Mirandesa | 0,083 | 0,115 | - | | |
| (4) Mertolenga | 0,101 | 0,088 | 0,088 | - | |
| (5) Alentejana | 0,098 | 0,113 | 0,146 | 0,037 | - |

Estes resultados devem ser interpretados com prudência uma vez que estas distâncias genéticas são baseadas num número reduzido de *loci,* podendo não revelar o que ocorre na realidade, tendo em conta o genoma completo. Pela análise da tabela pode-se

observar que os valores estimados estão compreendidos num intervalo muito pequeno de 0,037 (Mertolenga/Alentejana) a 0,146 (Alentejana/Mirandesa) evidenciando uma divergência genética não muito elevada.

Na figura 4.1 e 4.2 estão representadas as árvores obtidas pelos métodos de agrupamento NJ e UPGMA, respectivamente.

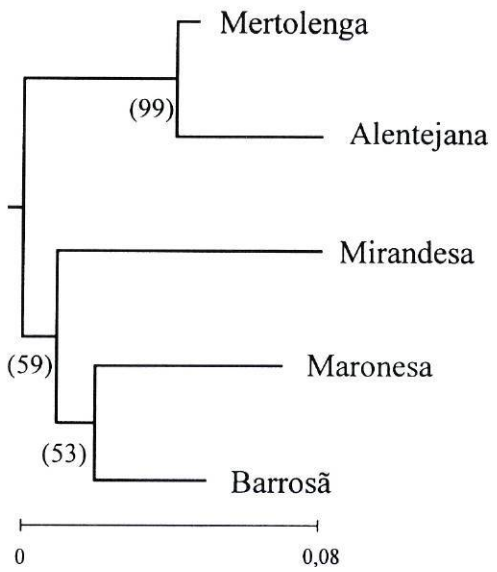



**Figura 4.1:** Árvore filogenética das cinco populações analisadas neste trabalho, obtida através do método de agrupamento NJ a partir da matriz de distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) (4 *loci*: HBB, CAII, ALB e TF). Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento obtidos através de um teste *bootstrap* estão indicados entre parêntesis (%).

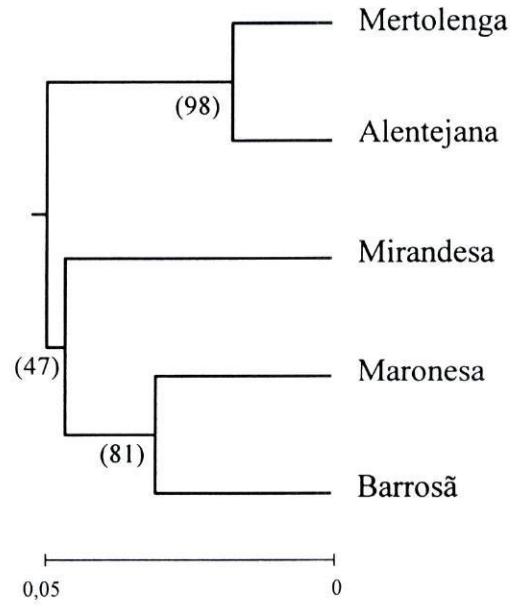



**Figura 4.2:** Árvore filogenética das cinco populações analisadas neste trabalho, obtida através do método de agrupamento UPGMA a partir da matriz de distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) (4 *loci*: HBB, CAII, ALB e TF). Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento obtidos através de um teste *bootstrap* estão indicados entre parêntesis (%).

Pela análise das figuras 4.1 e 4.2 verifica-se que o padrão dos agrupamentos em ambas as árvores é idêntico o que revela uma certa consistência dos mesmos. Estes agrupamentos fazem sobressair uma separação entre as raças do Sul e as do Norte, o que está de acordo com os resultados obtidos por CYMBRON *et al.* (1999) no estudo da molécula de DNA mitocondrial referente a algumas destas raças.

Os valores de *bootstrap* elevados nos dois tipos de dendrogramas, no agrupamento da raça Mertolenga com a Alentejana, indicam que estas raças, apesar de apresentarem uma estrutura morfológica ligeiramente diferente, nomeadamente na cor do pêlo e na estatura, são muito semelhantes ao nível de polimorfismos bioquímicos. Este resultado permite pressupor que, provavelmente, tiveram uma origem comum e que, ao longo do seu processo evolutivo, não se diferenciaram o suficiente para se terem criado identidades genéticas distintas.

Alguns dados morfológicos e citogenéticos sugerem que a raça Maronesa terá resultado do cruzamento das raças Barrosã e Mirandesa (MIRANDA DO VALE, 1949; RANGEL-FIGUEIREDO e IANNUZI, 1993). Os resultados da análise genética das variantes proteicas apontam, contudo, para uma maior aproximação desta raça à raça Barrosã.

Na tabela 4.3 indicam-se os valores das distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967), baseados na análise de 7 microssatélites.

**Tabela 4.3**: Matriz de distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) para as cinco raças bovinas autóctones portuguesas, baseada na análise de 7 *loci* de microssatélites.

| População | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) Barrosã | - | | | | |
| (2) Maronesa | 0,052 | - | | | |
| (3) Mirandesa | 0,085 | 0,091 | - | | |
| (4) Mertolenga | 0,049 | 0,061 | 0,070 | - | |
| (5) Alentejana | 0,057 | 0,083 | 0,078 | 0,051 | - |

A análise das distâncias genéticas entre as cinco populações bovinas portuguesas obtidas com microssatélites revela a existência de valores mais baixos, variando de 0,049 a 0,091, do que os encontrados com dados proteicos, principalmente para o agrupamento Mertolenga/Barrosã.

Na figura 4.3 e 4.4 estão representadas as árvores obtidas pelos métodos de agrupamentos NJ e UPGMA, respectivamente.

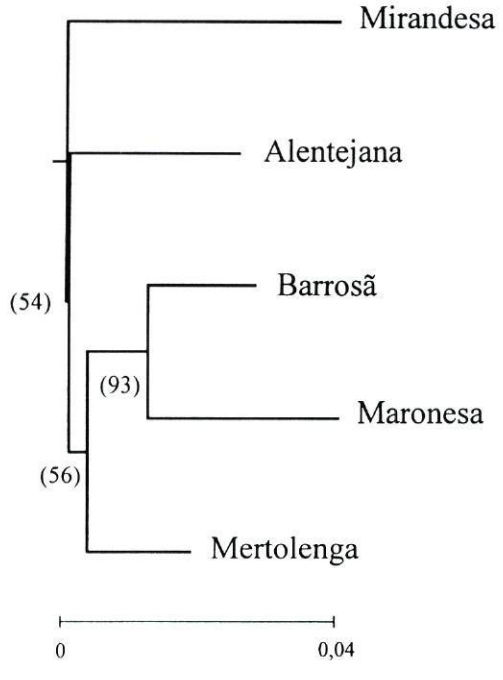



**Figura 4.3** - Árvore filogenética obtida pelo método NJ com base na matriz de distâncias de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967), calculadas com base em 7 microssatélites. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento obtidos através de um teste de *bootstrap* estão indicados entre parêntesis (%).

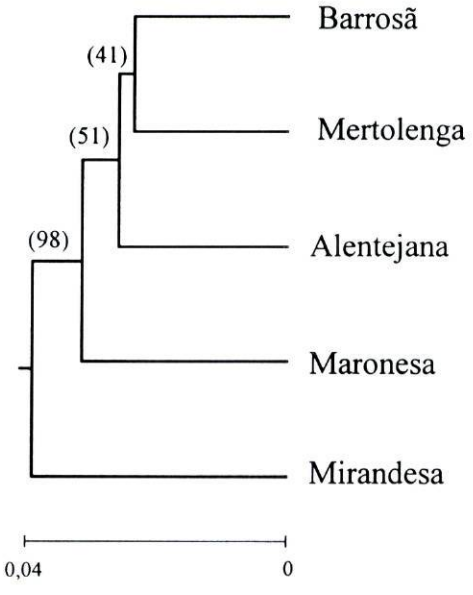



**Figura 4.4** - Árvore filogenética obtida pelo método UPGMA com base na matriz de distâncias de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967), calculadas com base em 7 microssatélites. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento obtidos através de um teste de *bootstrap* estão indicados entre parêntesis (%).

Os dendrogramas resultantes do poder discriminativo dos sete microssatélites estudados demonstram falta de robustez, relativamente aos obtidos com *loci* proteicos. No entanto, é consistente uma maior diferenciação da raça Mirandesa relativamente às outras raças.

A averiguação de correlação entre as matrizes de distâncias genéticas construídas com base nos dois diferentes marcadores genéticos foi realizada através do teste Mantel utilizando o programa RT 2.0 (MANLY, 1996). Os resultados obtidos demonstraram a existência de correlação (p=0,052).

Com base na análise conjunta de *loci* proteicos e de microssatélites calcularam-se as distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) que se apresentam na tabela 4.4.

**Tabela 4.4**: Matriz de distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) para as cinco raças bovinas autóctones portuguesas.

| População | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) Barrosã | - | | | | |
| (2) Maronesa | 0,053 | - | | | |
| (3) Mirandesa | 0,083 | 0,092 | - | | |
| (4) Mertolenga | 0,054 | 0,061 | 0,069 | - | |
| (5) Alentejana | 0,062 | 0,086 | 0,086 | 0,050 | - |

Pela análise da matriz de distâncias verifica-se que os valores são semelhantes aos observados com base unicamente em microssatélites.

De acordo com as distâncias genéticas calculadas obteve-se uma árvore representativa das relações genéticas das populações bovinas analisadas neste trabalho, de onde se pode observar com mais clareza a diferenciação existente entre elas (figura 4.5). Assim, verifica-se que a raça Maronesa se situa próxima da raça Barrosã, apresentando um valor de *bootstrap* bastante significativo (96%). As raças Mertolenga e Alentejana mostram a distância genética mais baixa na análise conjunta de marcadores (0,050), apesar da percentagem de ocorrência deste agrupamento ser reduzida (43%). A raça Mirandesa situa-se numa posição mais afastada em relação às outras raças analisadas, o que está de acordo com o descrito por TAKEZAKI e NEI (1996) que observaram, através de uma simulação por computador, o aumento das distâncias genéticas quando ocorre redução do efectivo.

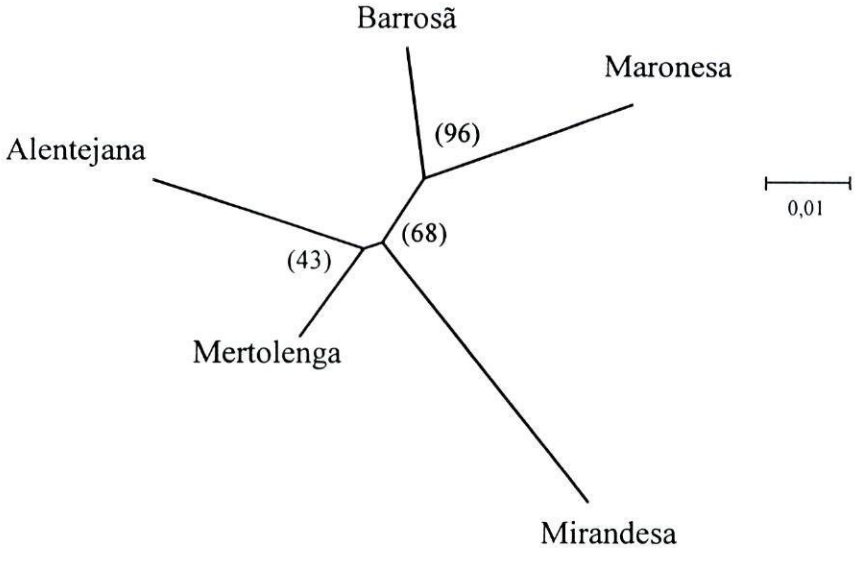



**Figura 4.5**: Rede ilustrativa da diferenciação genética das populações bovinas analisadas neste trabalho, obtido pelo método de agrupamento NJ a partir das distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) utilizando conjuntamente 4 marcadores proteicos e 7 microssatélites. Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento obtidos através de um teste de *bootstrap* (100 réplicas) estão indicados entre parêntesis.

Face aos resultados expostos até ao momento, é possível verificar a presença de três grupos distintos, que são compatíveis com os troncos sugeridos por MIRANDA do VALE (1949). Assim, reconhece-se o Tronco Aquitânico, que engloba as raças Mertolenga e Alentejana, o Tronco Ibérico, constituído apenas pela raça Mirandesa e o Tronco Mauritânico constituído pela raça Barrosã, e, por afinidade, a raça Maronesa. No entanto, algumas questões ficam, ainda, por esclarecer, no que se refere às verdadeiras origens destas raças, principalmente da raça Barrosã. Com efeito, torna-se difícil de relacionar a raça Barrosã com outros bovinos conhecidos (com excepção da Maronesa e Cachena espanhola), tanto no aspecto morfológico, salientado por MIRANDA do VALE (1949), como ao nível de polimorfismos genéticos. Além disso, não foi possível comprovar a relação desta raça com raças africanas, verificando-se apenas que, para o *locus* HEL1, apresenta alguns alelos com frequências que poderão indicar alguma ligação a estas raças. Num estudo realizado ao nível da molécula de DNA mitocondrial, que incluía cinco indivíduos desta raça, também não foi detectado qualquer haplótipo característico das raças africanas, mas sim das raças europeias, o que levou os autores a enquadrarem a Barrosã neste grupo (CYMBRON *et al.*, 1999). Por outro lado, estes investigadores revelaram a existência de

influências africanas nas raças Mertolenga e Alentejana, considerando como explicação mais plausível para a observação desta introgressão a introdução de bovinos na Península Ibérica em consequência das invasões de povos oriundos do Norte de África, principalmente Mouros (711d.C). Porém, estes autores não consideraram a hipótese de esta influência se poder dever a cruzamentos relativamente recentes com outras raças. RALO *et al.* (1980) realizaram um estudo assinalando a presença de raças bovinas exóticas existentes em Portugal, e afirmaram ter havido cruzamentos das raças Alentejana e Mertolenga com indivíduos pertencentes às raças Hereford, Salers e Sta. Gertrudis e algumas raças espanholas na segunda metade deste século, embora considerem que essa influência se tenha diluído ao longo do tempo e já não tenha expressão aparente. Os resultados apresentados neste trabalho referentes aos *loci* HBB e ALB sugerem a existência de influências de raças com características zebuínas. Todavia, a pouca evidência destes resultados torna-os inconclusivos. Sendo assim, torna-se necessário o alargamento deste estudo no sentido de esclarecer a origem destas raças.

Relativamente à raça Maronesa, esta possui, em termos de polimorfismos genéticos, uma maior semelhança com a raça Barrosã do que com a Mirandesa, o que não invalida a hipótese colocada por MIRANDA DO VALE (1949) e RANGEL-FIGUEIREDO e IANNUZI (1993) de se tratar de um produto resultante do cruzamento destas duas raças. É preciso ter presente que o facto de a árvore mostrar a relação entre as raças, não evidencia a história evolutiva das populações uma vez que elas não estiveram completamente isoladas desde a sua formação.

## 4.4 Análise factorial de correspondência

A análise factorial de correspondência (AFC) é um método de análise multidimensional, análogo à análise de componentes principais, e especialmente adaptado ao estudo de tabelas de contingência e de frequências. É uma análise que permite uma representação simultânea das observações e das variáveis, que neste caso representam as raças e os alelos e, além disso, tem a vantagem de identificar os alelos mais discriminantes.

O resultado da AFC relativamente às raças em estudo está representado na figura 4.6 num plano definido pelos dois eixos principais. Esta análise foi realizada apenas com base em microssatélites.

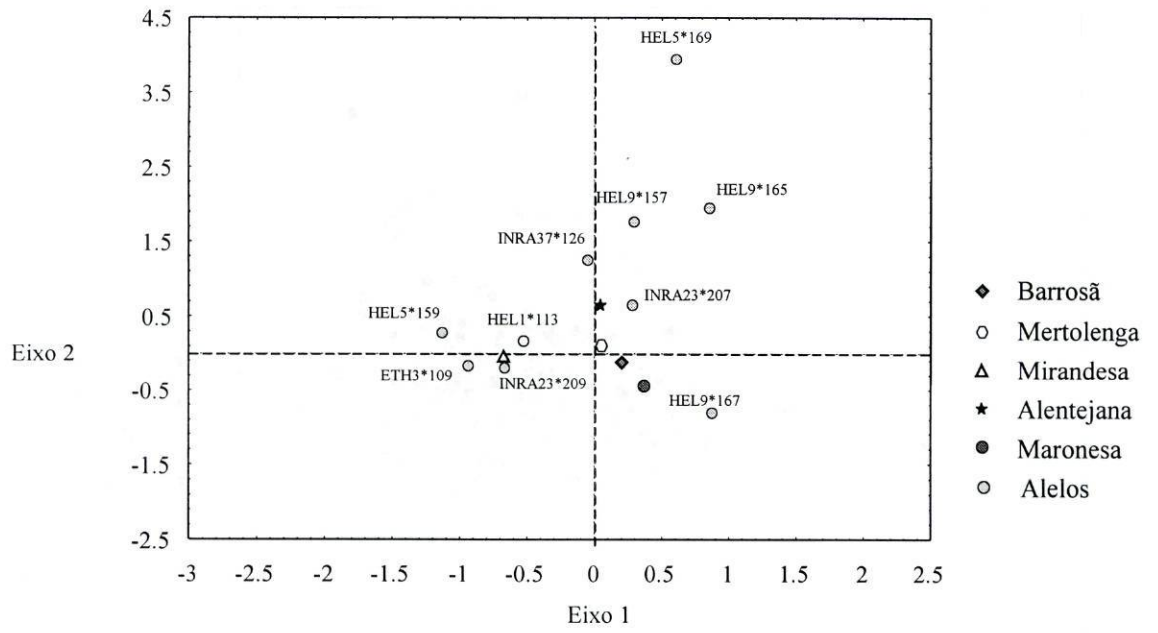



**Figura 4.6**: Análise factorial de correspondências: projecção num plano definido pelos dois eixos principais das cinco populações em análise e dos alelos mais discriminantes. O eixo 1 e 2 correspondem a 5,1% e 4,5% da variação total, respectivamente.

O primeiro eixo da análise representa 5,1% da variação total e distingue a Mirandesa das restantes raças analisadas. Os alelos que contribuem principalmente para a construção deste eixo são ETH3*109, INRA37*126, INRA23*209, HEL5*159, HEL1*113 e explicam respectivamente 11%, 10%, 9%, 8% e 7% da inércia do eixo. O segundo eixo compreende 4,5% da variação total e separa as populações a Norte e a Sul de

Portugal. Para este distanciamento contribuem essencialmente os alelos HEL5*169, HEL9*157, INRA23*207, HEL9*167 e HEL9*165 com 19%, 12%, 7%, 6% e 5,7%, respectivamente, para a inércia desse eixo. O terceiro e quarto eixo (não representados) explicam respectivamente 3,7% e 3,5% da variação total. Os baixos valores de variação em cada eixo devem-se essencialmente ao grande número de variáveis utilizadas e, principalmente, à grande proximidade das populações.

Os alelos privativos, devido à sua baixa frequência, não são muito relevantes na separação das raças.

Na figura 4.7 está indicada uma análise similar à da figura 4.6 mas com todos os indivíduos analisados. As elipses representam intervalos de confiança de 0,95 e baseiam-se numa distribuição normal.

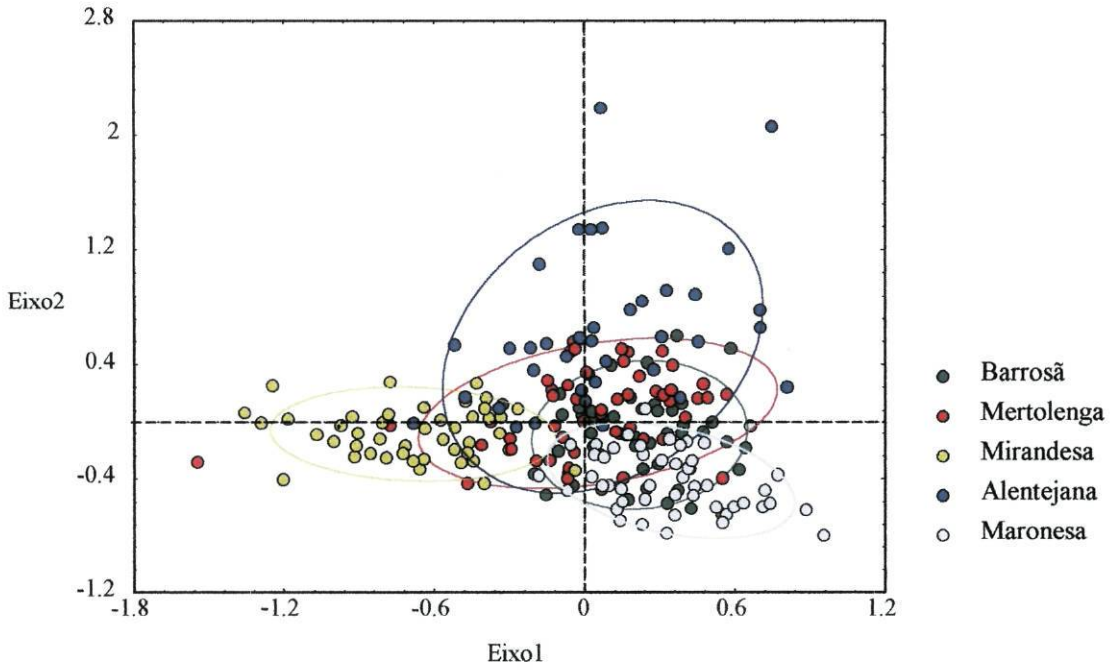



**Figura 4.7**: Análise factorial de correspondência: projecção num plano definido pelos dois eixos principais dos indivíduos pertencentes às cinco populações em análise.

Desta análise pode-se constatar a baixa diferenciação existente entre as raças. No entanto, há a salientar um maior distanciamento da raça Mirandesa em relação às restantes. As raças Mertolenga e Alentejana possuem indivíduos que se afastam razoavelmente do ponto médio o que poderá ser consequência da introdução de genes provenientes de outras raças mais distanciadas.

## 4.5 Análise filogenética de indivíduos

A grande informação obtida através dos microssatélites leva por si só à análise das relações a nível individual. Os microssatélites, ao contrário das aloenzimas, possuem elevados níveis de heterozigotia, um grande número de alelos por *locus* e, portanto, cada indivíduo pode ser interpretado como uma entidade própria. Desta forma, é possível utilizar os indivíduos como unidades taxonómicas operativas (OTU's - *operational taxonomic units*) na reconstrução de árvores filogenéticas.

BOWCOCK *et al.* (1994) foram os pioneiros neste tipo de análise, ao estudar as relações de indivíduos de 14 populações humanas espalhadas por todo o globo, utilizando genótipos de 30 microssatélites. Estes investigadores obtiveram uma árvore filogenética com 87,8% de indivíduos agrupados de acordo com a sua "raça" e origem geográfica. Metodologia idêntica foi usada por MACHUGH *et al.* (1998) para investigar a estruturação de algumas raças bovinas europeias, tendo conseguido uma melhor visualização do agrupamento específico das raças. Com o objectivo de obter os mesmos resultados, fez-se uma análise semelhante para as cinco raças analisadas neste trabalho tendo-se utilizado 20 indivíduos de cada uma.

A figura 4.8 mostra um árvore filogenética NJ construída a partir das distâncias genéticas "proporção de alelos partilhados - (1-Ps)". Através da sua análise, constata-se que o agrupamento dos indivíduos por raça não se encontra bem definido como o encontrado nas análises realizadas pelos autores referidos anteriormente. Com efeito, das raças analisadas neste estudo, a Maronesa, a Mirandesa e a Mertolenga formam agrupamentos apenas com um máximo de 7, 8 e 10 indivíduos, respectivamente. O elevado grau de heterogeneidade dos alelos observado nos indivíduos das raças Barrosã e Alentejana contribui para uma maior fragmentação da estrutura genética revelada na presente análise.

A subestruturação pouco definida das raças em estudo é um reflexo do fluxo génico que terá ocorrido entre as raças europeias antes da criação dos livros genealógicos, que no caso das raças portuguesas só muito recentemente é que foram elaborados, ao contrário, das raças estudadas por MACHUGH *et al.* (1998) cujos registos datam do século XIX. Além disso, 4 das 7 raças estudadas por estes autores situam-se nas ilhas Britânicas, onde provavelmente terá ocorrido um menor fluxo génico, devido à sua situação geográfica particular.

A continuação deste trabalho, através, nomeadamente, do aumento do número de *loci* analisados e da extensão da análise a outras populações portuguesas e europeias, torna-se assim de maior importância, no sentido de esclarecer se a falta de agrupamento é patente apenas nas raças portuguesas, de modo a ser possível a tomada de medidas adequadas na aplicação de programas de selecção e conservação das raças.

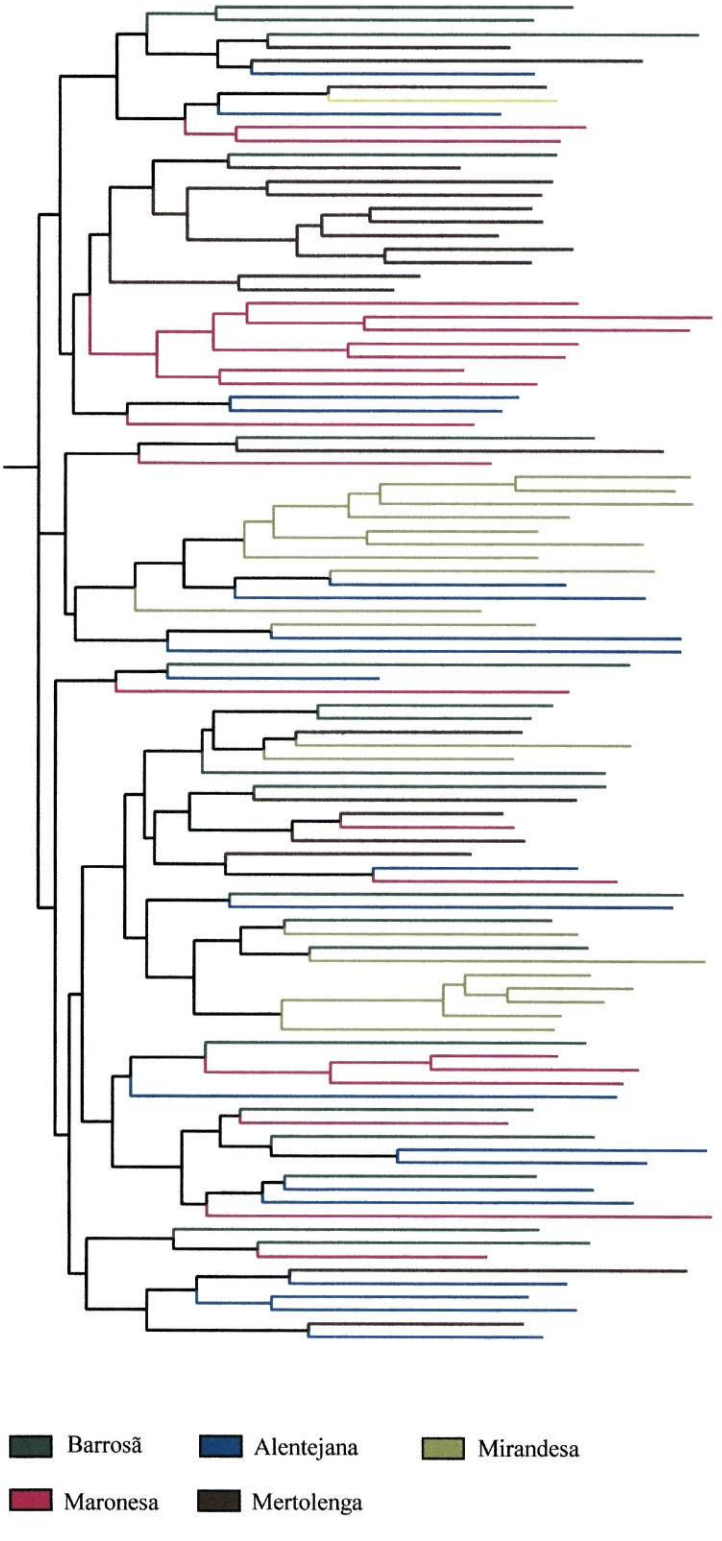



**Figura 4.8** - Dendrograma obtido com o método de agrupamento NJ a partir da matriz de distâncias (1-Ps) para 20 indivíduos de cada uma das cinco raças bovinas analisadas.

## 4.6 Comparação das populações da Península Ibérica

Os resultados obtidos para as cinco raças analisadas neste trabalho, de acordo com os *loci* HBB, CAII, ALB e TF, foram comparados com os já publicados para outras raças da Península Ibérica.

Os valores das distâncias genéticas (em anexo) revelam uma elevada proximidade genética entre as raças.

Na figura 4.9 está representada uma árvore filogenética obtida pelo método de agrupamento UPGMA. Da sua análise constata-se que, os agrupamentos das raças Mertolenga/Alentejana e Barrosã/Maronesa continuam a manter-se, quando comparadas com outras raças ibéricas. É de salientar, também, o agrupamento da raça Mirandesa com algumas das raças que, segundo SANCHEZ-BELDA (1984) pertencem ao Tronco Cantábrico (sinónimo de Tronco Ibérico, designado por MIRANDA DO VALE, 1949) e que se encontram geograficamente mais próximas.

Um outro aspecto a referir é a considerável diferenciação entre a raça Alentejana e a raça Retinta já que, de acordo com SANCHEZ BELDA (1984), ambas têm a mesma origem e, além disso, ocorreram vários cruzamentos entre estas duas raças. No entanto, há que ter em consideração que as amostras destas duas raças analisadas neste trabalho correspondem a duas épocas distintas e os dados aqui apresentados não são, de modo algum, conclusivos, uma vez que são baseados num número reduzido de *loci*.

O agrupamento das raças Barrosã/Maronesa surge como mais uma evidência da estreita relação entre estas duas raças. Para além disso, o facto de a raça Cachena espanhola se juntar a este grupo parece corroborar a ideia de as raças Barrosã e Cachena espanhola constituírem uma só raça cujo distanciamento geográfico terá contribuído para uma ligeira diferenciação genética. Contudo, revela-se necessário o aumento do número de *loci* estudados, como do número de indivíduos amostrados, para o total esclarecimento destas questões, uma vez que os valores das distâncias genéticas são muito baixos.

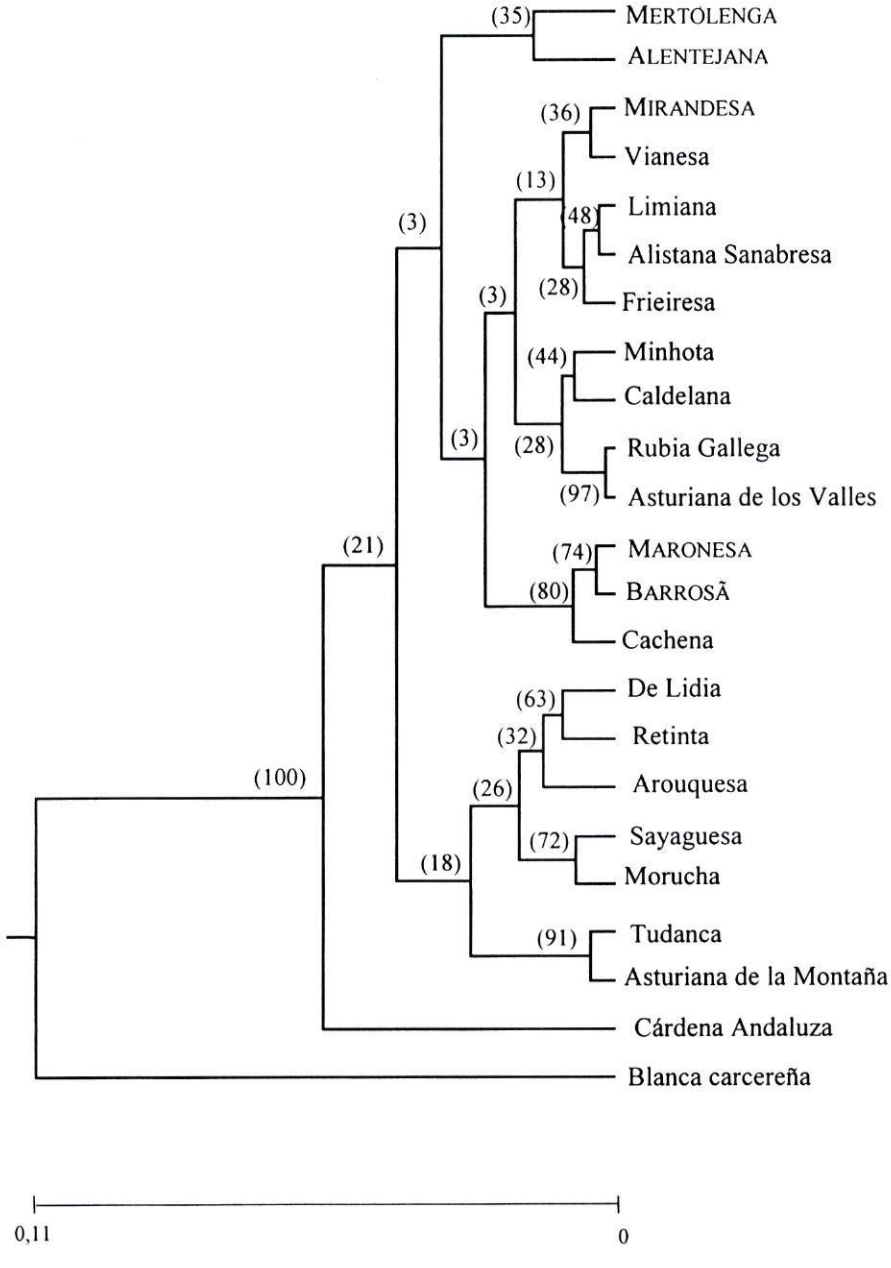



**Figura 4.9:** Árvore filogenética obtida através do método de agrupamento UPGMA a partir da matriz de distâncias genéticas de CAVALI-SFORZA e EDWARDS (1967) entre 23 raças bovinas (4 *loci*: HBB, CAII, ALB e TF). Os valores de probabilidade de ocorrência de cada agrupamento obtidos através de um teste *bootstrap* estão indicados entre parêntesis (%).

# 5

# Considerações finais

O presente estudo permitiu aprofundar o conhecimento da estrutura genética das raças bovinas autóctones Barrosã, Maronesa, Mirandesa, Mertolenga e Alentejana, recorrendo à análise de polimorfismos proteicos e microssatélites. Esta análise permitiu demonstrar o apreciável poder informativo dos microssatélites e a sua particular utilidade em análises de parentesco e identificação individual. Por outro lado, as proteínas, apesar de menos polimórficas, permitiram verificar o grau de diferenciação entre as raças analisadas e algumas raças ibéricas, para além de averiguar a existência de flutuações nas frequências génicas entre dois períodos de amostragem. Desta forma, foi demonstrada a grande utilidade deste tipo de marcadores no estudo da variabilidade genética das raças bovinas domésticas.

Assim, pode-se concluir que as raças portuguesas analisadas neste trabalho apresentam uma razoável diversidade genética à semelhança das restantes raças europeias, com excepção das raças cujo efectivo sofreu uma considerável redução. A raça Mirandesa é uma das raças ibéricas que apresenta menor diversidade genética, tendo-se verificado uma redução desta diversidade nos últimos anos, o que poderá a médio e longo prazo comprometer o futuro da raça se não forem tomadas medidas de gestão adequadas. A raça Alentejana, pelo contrário, apresenta uma maior variação genética relativamente às outras raças, para ambos os marcadores analisados, verificando-se, também, um aumento desta diversidade nos últimos anos. No entanto, será necessário o aumento do número de *loci* analisados para confirmar o nível de variabilidade genética existente.

Para além do contributo no esclarecimento da estrutura genética destas raças, este trabalho permitiu averiguar o grau de diferenciação existente entre as raças analisadas. Os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com o postulado por MIRANDA DO VALE (1949). Deste modo, verifica-se a existência de três grupos: Barrosã/Maronesa, Mertolenga/Alentejana e Mirandesa, que se apresenta geneticamente mais diferenciada em relação às outras raças. O padrão genético desta última raça, determinado através da análise das variantes proteicas, assemelha-se mais ao de algumas raças espanholas que se situam geograficamente mais próximas e, que segundo alguns autores, pertencem ao

mesmo tronco evolutivo (MIRANDA DO VALE, 1949; SANCHEZ BELDA, 1984). Os grupos Barrosã/Maronesa e Mertolenga/Alentejana mantêm-se quando comparadas com outras populações ibéricas.

A baixa diferenciação encontrada entre as raças em estudo quando comparadas entre si e com outras raças ibéricas, deve-se provavelmente à proximidade geográfica, o que terá possibilitado a ocorrência de um certo fluxo génico durante o seu percurso evolutivo. A reforçar esta hipótese está o resultado obtido através da análise da árvore da relação dos indivíduos utilizados como unidades taxonómicas operativas em que não é visível um agrupamento bem definido das raças.

A análise da estrutura genética das raças Mertolenga, Alentejana e Barrosã sugere que ao longo da sua história sofreram alguma influência de raças africanas taurinas ou zebuínas. Todavia, essa influência não é muito aparente uma vez que todas as populações analisadas se inserem claramente no conjunto das raças europeias.

Em face do exposto, seria desejável uma extensão do estudo agora iniciado, quer ao nível da amostragem, quer metodológico, integrando nomeadamente outras técnicas de análise da variabilidade genética. No que se refere ao primeiro aspecto, seria importante um incremento do número de indivíduos amostrados, bem como a inclusão das restantes raças autóctones portuguesas. Adicionalmente, a análise da estrutura genética de raças africanas poderia contribuir para o esclarecimento de uma eventual ligação às raças portuguesas. Paralelamente, a análise de dados arqueológicos constituiria uma fonte de informação suplementar que permitiria verificar uma continuidade biológica entre os bovinos domésticos primitivos e os actualmente existentes. Outro aspecto interessante seria a avaliação do grau de miscegenação ocorrido nas raças Mertolenga e Alentejana, de modo a facilitar o esclarecimento da origem destas raças. Quanto ao segundo aspecto, de carácter metodológico, seria desejável o alargamento da bateria de sistemas genéticos polimórficos detectados em proteínas do sangue e do leite e o aumento do número de microssatélites, se possível associados a algumas das proteínas polimórficas já descritas. Por outro lado, o estudo da sequência de DNA mitocondrial e a análise de *loci* do cromossoma-Y, que se encontra neste momento em progresso (CYMBRON, comunicação pessoal), permitirá a obtenção de resultados mais completos.

No seu conjunto, estes instrumentos de análise poderão contribuir decisivamente para o esclarecimento da história evolutiva das raças bovinas domésticas e ajudar na

elaboração de programas de conservação e selecção de importância vital para a conservação dos recursos biológicos que sustentam a civilização humana.

# 6

# Referências bibliográficas

**ARRANZ, J.J.; BAYÓN, Y.; SAN PRIMITIVO, F.** (1996). Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics.* **27**: 415-419.

**BELKHIR K.; BORSA P.; GOUDET J.; CHIKHI L.; BONHOMME F.** (1996-1998). GENETIX, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

**BERNOCO, D.** (1970). Electrophoretic variants of carbonic anhydrases in rabbit red cells. *Atti. Ass. Genet. Ital.* **XV**: 227.

**BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; SUNDEN, S.L.F.; HAWKINS, G.A.; TOLDO, S.S.; FRIES, R.; GROSZ, M.D.; YOO J.; BEATTIE, C.W.** (1994). A genetic Linkage Map for Cattle. *Genetics*. **136**: 619-639.

**BLOTT, S.C.; WILLIAMS, J.L.; HALEY, C.S.** (1998a). Genetic variation within the Hereford breed of cattle. *Animal Genetics*. **29**: 202-211.

**BLOTT, S.C.; WILLIAMS, J.L.; HALEY, C.S.** (1998b). Genetic relationships among European Cattle Breeds. *Animal Genetics*. **29**: 273-282.

**BOUQUET, Y.; VAN DE VEGHE, A.; VAN ZEVEREN, A.; VAREWYCK** (1986). Evolutionary conservation of the linkage between the structural loci for serum albumin and vitamin D binding protein (GC) in cattle. *Animal Genetics*. **17**: 175-182.

**BOWCOCK, A.M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L.**. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*. **368**: 455-457.

**BOWLING, A.T.; CLARK, R.S.** (1988). Excess of heterozygotes at albumin locus in American Standard bred horses. *Animal Genetics*. **19**: 331-341.

**BOWLING, A.T.; GORDON, L.; PENEDO, M.C.T.; WICTUM, E.; BEEBOUT, J.** (1990). A single gel for determining genetic of equine erythrocyte carbonic anhydrase (CA) and catalase (Cat). *Animal Genetics*. **21**: 191-197.

**BRADLEY, D.G.; MACHUGH, D.E.; LOFTUS, R.T.; SOW, R.S.; HOSTE, C.H.; CUNNINGHAM, P.** (1994). Zebu-taurine variation in Y chromosomal DNA: a sensitive assay for genetic introgression in West African trypanotolerant cattle populations. *Animal Genetics*. **25**: 7-12.

**BRADLEY, D.G.; MACHUGH, D.E.; CUNNINGHAM, P.; LOFTUS, R.T.** (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 5131-5135.

**BRAEND, M.** (1971). Studies on the relationships between cattle breeds in Africa Asia and Europe: Evidence obtained by studies of blood groups and protein polymorphisms. *World Review of Animal Production*, **VIII (1)**: 10-14.

**BRAEND, M.** (1988). Haemoglobin polymorphism in Norwegian Red Cattle. *Animal Genetics*. **19**: 59-62.

**BRAUN, A.; BICHLMAIER, R.; CLEVE, H.** (1992). Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types. *Human Genetics*. **89**: 401-406.

**BUDOWLE, B.; CHAKRABORTY, R.; GIUSTI A.M.; EISENBERG A.J.; ALLEN R.C.** (1991). Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am. J. Hum. Genet*. **48**: 137-144.

**CARTER, D.C.; HE, X.M.; MUNSON, S.H.; TWIGG, P.D.; GERNERT, K.M.; BROOM, M.B.; MILLER, T.Y.** (1989). Three dimensional structure of human serum albumin. *Science*. **244**: 1195-1198.

**CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F.** (1967). Phylogenetic analysis models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*. **19**: 233.

**CECCHINI, G.; NIJS, M.D.** (1986). Literature review on cattle blood polymorphisms and preliminary results of analysis in East African Zebu in Ethiopia. *Agric. subtrop. e tropicale*. **3 (80)**: 433-463.

**CHEN, Y.; WANG, Y.; CAO, H.; PANG, Z.** (1989). A study on some blood protein polymorphism in six Chinese local cattle breeds. *Animal Genetics*. **20** (suppl, 1): 56-57.

**CIAMPOLINI, R.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; VAIMAN, D.; DILLMANN, C.; MAZZANTI, E.; FOULLEY, J.L.; LEVÉZIEL, H.; CIANCI, D.** (1995). Individual Multilocus Genotypes Using Microsatellite Polymorphisms to Permit the Analysis of the Genetic Variability Within and Between Italian Beef Cattle Breeds. *J. Anim. Sci.*. **73**: 3259-3268.

**CLARKE, S.W.; TUCKER, E.M.; OSTERHOFF, D.R.** (1989). Blood groups and biochemical polymorphism in the Namaqua sheep breed. *Animal Genetics.* **20**: 279-286.

**CORNUET, J.M.; LUIKART, G.** (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics.* **144**: 2001-2014.

**CUNHA, L.M.** (1994). *Caracterização Morfo-Funcional e Genética da Raça Bovina Alentejana.* Trabalho de fim de curso apresentado à Escola Superior Agrária de Beja.

**CYMBRON, T.; LOFTUS, R.T.; MALHEIRO, M.I.; BRADLEY, D.G.** (1999). Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proc. R. Soc. Lond.* B. **266**: 597-603.

**EPSTEIN, H.** (1971). *The origin of the Domestic Animals of Africa.* (1st ed.). New York: *Africana.* (vol **1**).

**EPSTEIN, H.; MASON, I.L.** (1984). Cattle. In: *Evolution of domesticaded animals.* (1st ed.) (**MASON I.L.**, ed.) London: *Longman, pp.* 6-27.

**ERHARDT, G.** (1986). Transferrin variants in sheep: separation and characterization by polyacrylamide gel electrophoresis and isoelectric focusing. *Animal Genetics.* **17**: 343-352.

**ERHARDT, G.; SIMIANER, H.** (1993). Linkage between the loci for serum albumin and vitamin D binding protein (GC) in sheep. *Animal Genetics.* **24**: 301-303.

**EVANS, R.W.; WILLIAMS, J.** (1980). The electrophoresis of transferrins in urea/polyacrylamide gels. *Biochem. J.* **189**: 541-546.

**FAO** (1994). Domestic Animal Diversity Information System. Available: http://dad.fao.org/cgi-dad/.

**FELSENSTEIN, J.** (1993). PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5 Distributed by the autor. Seattle: University of Washington.

**FERNANDES, M.T.S.** (1996). Raças de bovinos autóctones. Um importante recurso genético animal português a preservar e a defender. *Veterinária Técnica.* **12**: 10-15.

**FERNÁNDEZ, A.J.L.; VIANA, A.; IGLESIAS, A.; SÁNCHEZ, L.** (1998). Genetic Variability and Phylogenetic Relationships Between Ten Native Cattle Breeds from Galicia and the North of Portugal. *Arch. Zootec.* **47**: 61-71.

**FERRAND, N.** (1995). *Variação genética de proteínas em populações de coelho (Oryctolagus cuniculus) - Análise da diferenciação subespecífica, subestruturação, expansão geográfica e domesticação.* Dissertação de Doutoramento em Biologia apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

**FERRAND, N.; CARVALHO, G.; AMORIM, A.** (1988). Transferrin (Tf) polymorphism in wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Animal Genetics*. **19**: 295-300.

**FERRAND, N.; ROCHA, J.** (1992). Demonstration of serum albumin (ALB) polymorphism in wild rabbit (Oryctolagus *cuniculus*) by means of isoelectric focusing. *Animal Genetics*. **23**: 275-278.

**FLETCHER, J.; HUEHNS, E.R.** (1968). Function of transferrin. *Nature*. **218**: 1211-1214.

**FRIES, R.; EGGEN A.; WOMACK, J.E.** (1993). The bovine genome map. *Mamm. Genome*, **4**: 405-428.

**GARCIA, M.L.G.** (1964). A Raça Bovina Barrosã. *Boletim Pecuário n º 1*, Ano XXXII, D.G.S.P., Lisboa. 103-172.

**GARCIA, M.; ROSÁRIO, J.; ANTUNES, M.** (1981). *Bovinos em Portugal*. Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V.. Lisboa. 44-78.

**GAHNE, B.** (1963). Inherited variation in the post-albumin of cattle serum. *Hereditas*. **50**:126-135.

**GAHNE, B.; JUNEJA, R.K.; GROLMUS, J.** (1977). Horizontal polyacrylamine gel electrophoresis for the simultaneous phenotyping of transferrin, post-transferrin, albumin and post-albumin in the blood plasma of cattle. Anim. Bld. Grps. *Biochem. Genet.* **8**:127-137.

**GONZALEZ, P.; TUÑON, M.J.; VALLEJO, M.** (1987). Genetic relationships between Spanish native breeds of cattle. *Animal Genetics*. **18**: 249-256.

**GUO, S.W.; THOMPSON E.A.** (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*. **48**: 361-372.

**GUSMÃO, L.** (1996). *Genética molecular, formal e populacional de STRs (Short Tandem Repeats) humanos. Desenvolvimento de técnicas de análise e aplicação à investigação de parentescos*. Dissertação de Doutoramento em Biologia apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

**HALL, S.J.G.; BRADLEY, D.G.** (1995). Conserving livestock breed biodiversity. *Trends Ecol. Evol.*. **10** (7): 267-270.

**IGLESIAS, A. B.** (1989). *Estrutura y relaciones geneticas de razas bovinas mediante marcadores geneticos (Polimorfismos Bioquimicos)*. Dissertação de Doutoramento em Biologia apresentada à Faculdade de Biologia da Universidade de Santiago.

**JAMIESON, A.** (1994). The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Animal Genetics*. **25** (suppl, 1): 37-44.

**JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L.** (1985). Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*. **314**: 67-73.

**KALÁB, P.; STRATIL, A.; GLASNÁK, V.** (1990). Genetic polymorphism of serum vitamin D-binding protein (GC) in sheep and mouflon. *Animal Genetics*. **21**: 317-321.

**KANTANEN, J.; OLSAKER, I.; ADALSTEINSSON, S.; SANDBERG, K.; EYTHORSDOTTIR, E.; PIRHONEN, K.; HOLM, L-E.** (1999). Temporal changes in genetic variation of North European cattle breeds. *Animal Genetics*. **30**: 16-27.

**KAUKINEN, J.; VARVIO, S-L.** (1993). Eight polymorphic bovine microsatellites. *Animal Genetics*. **24**: 148.

**KIDD, K.K.; STONE, W.H.; CRIMELLA, C.; CARENZI, C.; CASATI, M.; ROGNONI, G.** (1980). Immunogenetic and population genetic analyses of Iberian cattle. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.* **11**: 21-38.

**KILGOUR, L.; DIXON, S.C.; TUCKER, E.M.** (1990). Two new sheep haemoglobins, one of which is replaced by haemoglobin C in anaemia. *Animal Genetics*. **21**: 115-121.

**KRISTJANSSON, F.K.; HICKMAN, C.G.** (1965). Subdivision of the allele Tf D for transferrins in Holstein and Ayrshire cattle. *Genetics*. **52**: 627-630.

**LEAL, C.** (1995). *Apreciação Fenotípica de um Núcleo de Bovinos de Raça Barrosã e Amostragem Para sua Caracterização Genética*. Relatório de estágio de licenciatura em Biologia - Ramo Científico Tecnológico em Ecologia e Recursos Zoológicos. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

**LEAL, C.** (1998). *Caracterização genética da raça bovina Barrosã – Estudos de genética bioquimica, familiar e populacional*. Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

**LEITÃO** (1981a). *Bovinos em Portugal.* Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V., Lisboa.: 77-99.

**LEITÃO** (1981b). *Bovinos em Portugal.* Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V., Lisboa.: 101-127.

**LITT, M.; LUTY, J.A.** (1989). A hipervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*. **44**: 397-401.

**LOFTUS, R.T.; MACHUGH, D.E.; NGERE, L.O.; BALAIN, D.S.; BADI, A.M.; BRADLEY, D.G.; CUNNINGHAM, E. P.** (1994a). Mitochondrial genetic variation in European, African and Indian cattle populations. *Animal Genetics.* **25**: 265-271.

**LOFTUS, R.T.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P.M.; CUNNINGHAM, P.** (1994b). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2757-2761.

**MACHUGH, D.E.** (1996). *Molecular Biogeography and Genetic Structure of Domesticated Cattle.* (Ph. D. thesis). University of Dublin.

**MACHUGH, D.E.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G.** (1998). Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics.* **29**: 333-340.

**MACHUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G.** (1997). Microsatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*).*Genetics.* **146**: 1071-1086.

**MANLY, B.F.J.** (1996) *RT – A program for randomization testing*, Version 2.0. Centre for applications of statistics and mathematics (CASM). University of Otago. New Zealand."

**MARTIN-BURRIEL, I.; GARCIA-MURO, E.; ZARAGOZA, P.** (1999). Genetic diversity analyses of six Spanish native breeds using microssatellites. *Animal genetics.* **30**: 177-182.

**MARTINS, R.** (1982). *Conservação e melhoramento dos bovinos de raça Barrosã.* Relatório de estágio de licenciatura em Produção Animal. Instituto Universitário de Trás-os-Montes e Alto Douro.

**MEDJURAC, I.; KUSTERMANN, W.; LAZAR, P.; RUSS, I.; PIRCHNER, F.** (1994). Marker-derived phylogeny of European cattle supports demic expansion of agriculture. *Animal Genetics.* **25**: 19-27.

**MINCH, E.; RUIZ-LINARES, A.; GOLDSTEIN D.B.; FELDMAN, M.W.; CAVALLI-SFORZA L.L.** (1995). MICROSAT (version 1.4): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. WWW: http: //lotka.stanford.edu/research/distance.html.

**MIRANDA DO VALE, J.** (1949). *Gado Bissulco*. Livraria Sá da Costa. Lisboa.

**MOAZAMI-GOUDARZI, K.; LALOE, D.; FURET, J.P.; GROSCLAUDE, F.** (1997). Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites. *Animal Genetics*. **28**: 338-345.

**MOAZAMI-GOUDARZI, K.; VAIMAN, D.; MERCIER, D.; GROHS, C.; FURET, J.P.; LEVÉZIEL, H.; MARTIN, P.** (1994). Emploi de microssatellites pour l'ánalyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers résultats. *Genet. Sel. Evol.*. **26**: 155-165.

**MONTEIRO, P.; BETTENCOURT, J.; PEREIRA, R.** (1981). *Bovinos em Portugal*. Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V., Lisboa. 197-216.

**MONTEIRO, I.** (1986). *Raça Bovina Mertolenga*. Curso de Mestrado em produção animal. Estação de Selecção e Reprodução Animal do Baixo Alentejo.

**NEI, M.** (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**: 583-590.

**NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y.** (1983). Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.*. **19**: 153-170.

**NEI, M.** (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.

**NOBRE, J. M.** (1991). *Caracterização genética da raça bovina Mirandesa*. Trabalho de fim de curso efectuado na Estação Nacional de Selecção e Reprodução Animal. Curso de Engenharia Zootécnica da Universidade de Évora.

**OLDENBROEK, J.K.** (1999). *Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources*. DLO Institute for Animal Science and Health, Netherlands.

**PEELMAN, L.J.; MORTIAUX, F.; VAN ZEVEREN, A.; DANSERCOER, A.; MOMMENS, G.; COOPMAN, F.; BOUQUET, Y.; BURNY, A.; RENAVILLE, R.; PORTETELLE, D.** (1998). Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microssatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics*. **29**: 161-167.

**PENHALLOW, R.C.; MASON, A.B.; WOODWORTH, R.C.** (1991). Electrophoretic characterization of human, equine and bovine transferrins. *Comp. Biochem. Physiol.* **98B**: 41-45.

**PIEDRAFITA, J.; TEJEDOR, M.T.; ZARAGAZA, I.** (1984). Post-Albuminas y Post-Transferrinas en poblaciones bovinas Españolas: Frisona y De Lidia. Comunicación Presentada A La 34° Reunión Anual De La Federación Europea de Zootecnia. 114-121.

**QUEVAL, R.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; LALOË, D.; MÉRIAUX, J.C.; GROSCLAUDE, F.** (1998). Relations génétiques entre populations de taurins ou zébus d'Afrique de l'Ouest et taurins européens. *Genet. Sel. Evol.* **30**: 367-383.

**RALO, J.A.C.; SOBRAL, M; CLÁUDIO, D.** (1980). Raças bovinas exóticas - Evolução e posição no País - 1979. *Boletim Pecuário*, Ano XLVI, D.G.S.P., Lisboa. 55-78.

**RANGEL-FIGUEIREDO, T.; IANNUZI, L.** (1993).Frequency and distribution of rob (1;29) in three Portuguese cattle breeds. *Hereditas*. **119** (3): 233-237.

**RAYMOND, M.; ROUSSET, F.** (1995) GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.* **86**: 248-249.

**ROCHA, J.; KÖMPF, J.; FERRAND, N.; AMORIM, A.; RITTER, H.** (1991). Separation of human albumin variants by isoelectric focusing. *Electrophoresis*. **12**: 313-314.

**RODRIGUES, A.B.** (1981). *Bovinos em Portugal*. Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V., Lisboa.

**ROSADO, J; ALMEIDA, M.; GOUVEIA, M.; SOBRAL, M.; LOBO, S.**. (1981). *Bovinos em Portugal*. Direcção dos Serviços Veterinários - D.G.S.V., Lisboa. 175-195.

**SAITOU, N.; NEI, M.** (1987). The Neighbor-Joining Method: A new Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Bio. Evol.* **4**: 406-425.

**SANCHEZ-BELDA** (1984). *Razas bovinas españolas*. Publicaciones de extensión agraria.

**SANDBERG, K.; JUNEJA, R.K.** (1978). Close linkage of plasma albumin and Gc in horse . *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*.9: 169-173.

**SARTORE, G.; STORMONT, C.; MORRIS, B.G.; GRUNDER, A.A.** (1969). Multiple electrophoretic forms of Carbonic Anhydrase in red cells of domestic cattle (*Bos taurus*) and American buffalo (*Bison bison*). *Genetics*. **61**: 823-831.

**SCHNEIDER, H.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, B.T.F.; SALZANO, F.M.** (1990). Transferrin and albumin polymorphisms in buffaloes from Brazil. *Animal Genetics*. **21**: 335-337.

**SCHMID, M.; SAITBEKOVA, N.; GAILLARD, C.; DOLF, G.** (1999). Genetic diversity in Swiss cattle breeds. *J. Anim. Breed. Genet.* **116**: 1-8.

**SHIMIZU, K.; TAKENAKA, O.** (1991). DNA Polymorphisms in the and –Globin Gene Regions in Asian Macaques. *Biochemical Genetics*. **29**: 189-202.

**SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R.** (1973). *Numeric Taxonomy*. W. H. Freeman & Co., San Francisco.

**STORMONT, C.; SUZUKI, Y.** (1963). Genetic control of albumin phenotypes in horses. *Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine* **144**: 673-675.

**TAKEZAKI, N.; NEI, M.** (1996). Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. *Genetics*. **144**: 389-399.

**TASHIAN, R.E.** (1989). The carbonic anhydrases: widening perspectives on their evolution, expression and function. *BioEssays*. **10**: 186-192.

**TASHIAN, R.E.; CARTER, N.D.** (1976). Biochemical Genetics of Carbonic Anhydrase. In: Harris, H. (ed.) *Advances in Human Genetics*. **7:** 1-56. Plenum.

**TAUTZ, D.; SHLÖTTERER, C.** (1994). Simple sequences. *Curr. Opin. Genet. Dev.*. **4**: 832-837.

**TSUJI, S.; SAOAMITSU, Y.; GOTO, N.** (1989). Ultrathin-leyer isoelectric focusing for bovine serum transferrin phenotyping. *Biochem. Genet.* **27**: 425-429.

**URQUHART, A.; KIMPTON, C.P.; DOWNES, T.J.; GILL, P.** (1994). Variation in Short Tandem Repeat sequences – a survey of microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int. J. Med.* **107**: 13-20.

**VAIMAN, D.; MERCIER, D.; MOAZAMI-GOUDARZI, K.; EGGEN, A.; CIAMPOLINI, R.; LÉPINGLE, A.; VELMATA, R.; KAUKINEN, J.; VARVIO, S-L.; MARTIN, P.; LEVÉZIEL, H.; GUÉRIN, G.** (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mamm. Genome*. **5**: 288-297.

**VAN BRAGT, P.H.** (1996). *Molecular biological techniques, In Vitro DNA manipulations including PCR and In Situ hybridisation*. International Postgraduate Course 5-12. Porto, *pp.* 55-64.

**VAN DE WEGHE, A.; VAN ZEVEREN, A.; BOUQUET, Y.** (1982). The vitamin D binding protein in domestic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**: 977-982.

**VICENTE, M.V.** (1978). Razas vacunas autóctonas en vías de extinción (Aportaciones al estudio genético). Fundación Juan March. *Serie Universitaria*. **LXIX**: 10-51.

**VILLENA, A.A.; LASO., J.M.; GARCIA, J.A.** (1999). Iberia: Population Genetics, Anthropology, and Linguistics. *Human Biology*, **71**: 725-743.

**WANG, S.; FOOTE, W.C.; BUNCH, T.D.** (1990). Transferrin and haemoglobin polymorphism in domesticated goats in the USA. *Animal genetics*. **21**: 91-94.

**WEBER, J.L.; MAY, P.E.** (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*. **44**: 388-396.

**WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C.** (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. **38**: 1358-1370.

**WELCH, S.** (1990). A comparison of the structure and properties of serum transferrin from 17 animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* **97B (3)**: 417-427.

**ZAJC, I.** (1996). *Repetitive DNA sequences in different breeds of domestic dogs*. (Ph.D thesis). Jubljana.

# Anexos

## EXTRACÇÃO

Extracção com a resina Chelex 100

-adição de 200µl de uma solução de Chelex, 5% (100-200 *mesh, sodium form, biotechnology grade, Bio-Rad*);

-incubação a 56ºC, durante 30';

-incubação a 100ºC, durante 8';

-centrifugação a 12 000g, durante 4', desprezando o sedimento. Após a extracção, as amostras foram conservadas por congelação a –20ºC, para posterior amplificação

## COLORAÇÃO

Géis horizontais

1. Mergulho do gel em etanol (10%) durante 10';
2. Passagem do gel por ácido nítrico (1%) durante 5';
3. Duas lavagens em água ultrapura durante 30'', cada;
4. Colocação do gel em nitrato de prata (2g/250ml) durante 20', em agitação no escuro;
5. Duas lavagens em água ultrapura durante 30'' cada;
6. Mergulho do gel numa solução de carbonato de sódio (0,28M) e de formaldeído (0,02%) em agitação, até as bandas aparecerem definidas;
7. Ácido acético (10%) durante 2';
8. Lavagem com água ultrapura.

Géis verticais

1. Mergulho do gel numa solução de ácido acético (10%) durante 20' em agitação;
2. Três lavagens do gel em água ultrapura durante 2' cada;
3. Colocação do gel na solução de prata (2g nitrato de prata e 3ml de formaldeído em 2L de água ultrapura) durante 30', em agitação e no escuro;
4. Uma lavagem do gel durante 5 a 10'';

9. Mergulho do gel na solução de revelação (60g carbonato de sódio, em 2L de água ultrapura, 3ml 37% formaldeído e triosulfato de sódio, 400µl 10mg/ml) em agitação, até as bandas aparecerem definidas;
10. Colocação do gel numa solução de ácido acético (10%), durante 2';
11. Lavagem do gel durante 2' em água ultrapura.

**Tabela A.1:** Distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) entre 23 raças bovinas da Península Ibérica, considerando 4 *loci* (HB, CAII, ALB e TF)

| | População | (1) | (2) | (3) | (4) | (5) | (6) | (7) | (8) | (9) | (10) | (11) | (12) | (13) | (14) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1) | Mertolenga | - | | | | | | | | | | | | | |
| (2) | Mirandesa | 0,058 | - | | | | | | | | | | | | |
| (3) | Maronesa | 0.055 | 0.081 | - | | | | | | | | | | | |
| (4) | Alentejana | 0.033 | 0.152 | 0.067 | - | | | | | | | | | | |
| (5) | Barrosã | 0.076 | 0.080 | 0.008 | 0.105 | - | | | | | | | | | |
| (6) | Minhota | 0.086 | 0.065 | 0.068 | 0.118 | 0.061 | - | | | | | | | | |
| (7) | Cachena | 0.058 | 0.092 | 0.014 | 0.064 | 0.019 | 0.047 | - | | | | | | | |
| (8) | Caldelana | 0.051 | 0.033 | 0.040 | 0.087 | 0.046 | 0.016 | 0.030 | - | | | | | | |
| (9) | Limiana | 0.037 | 0.026 | 0.053 | 0.086 | 0.069 | 0.071 | 0.060 | 0.025 | - | | | | | |
| (10) | Frieiresa | 0.025 | 0.035 | 0.028 | 0.055 | 0.046 | 0.052 | 0.044 | 0.019 | 0.015 | - | | | | |
| (11) | Vianesa | 0.044 | 0.010 | 0.040 | 0.110 | 0.044 | 0.055 | 0.059 | 0.022 | 0.018 | 0.012 | - | | | |
| (12) | De Lidia | 0.124 | 0.180 | 0.107 | 0.153 | 0.094 | 0.120 | 0.098 | 0.138 | 0.216 | 0.150 | 0.152 | - | | |
| (13) | Arouquesa | 0.068 | 0.085 | 0.065 | 0.122 | 0.052 | 0.060 | 0.048 | 0.062 | 0.115 | 0.085 | 0.075 | 0.026 | - | |
| (14) | Rubia Gallega | 0.040 | 0.036 | 0.053 | 0.091 | 0.053 | 0.024 | 0.039 | 0.015 | 0.050 | 0.034 | 0.032 | 0.084 | 0.027 | - |
| (15) | Retinta | 0.078 | 0.118 | 0.074 | 0.124 | 0.069 | 0.115 | 0.093 | 0.111 | 0.152 | 0.093 | 0.090 | 0.021 | 0.031 | 0.067 |
| (16) | Tudanca | 0.122 | 0.143 | 0.143 | 0.149 | 0.142 | 0.061 | 0.120 | 0.089 | 0.180 | 0.120 | 0.132 | 0.065 | 0.062 | 0.057 |
| (17) | Sayaguesa | 0.046 | 0.073 | 0.052 | 0.079 | 0.058 | 0.054 | 0.064 | 0.050 | 0.090 | 0.039 | 0.049 | 0.050 | 0.036 | 0.029 |
| (18) | Morucha | 0.029 | 0.111 | 0.059 | 0.039 | 0.075 | 0.084 | 0.061 | 0.074 | 0.104 | 0.054 | 0.081 | 0.048 | 0.043 | 0.046 |
| (19) | Alistana Sanabresa | 0.017 | 0.021 | 0.038 | 0.066 | 0.051 | 0.057 | 0.043 | 0.019 | 0.006 | 0.009 | 0.012 | 0.154 | 0.072 | 0.028 |
| (20) | Blanca Cacereña | 0.163 | 0.210 | 0.225 | 0.212 | 0.253 | 0.311 | 0.310 | 0.267 | 0.228 | 0.162 | 0.176 | 0.270 | 0.271 | 0.243 |
| (21) | Asturiana de los Valles | 0.035 | 0.041 | 0.050 | 0.084 | 0.050 | 0.026 | 0.038 | 0.020 | 0.057 | 0.035 | 0.034 | 0.065 | 0.018 | 0.004 |
| (22) | Asturiana de la Montanã | 0.081 | 0.116 | 0.097 | 0.091 | 0.106 | 0.036 | 0.074 | 0.052 | 0.125 | 0.076 | 0.098 | 0.072 | 0.054 | 0.035 |
| (23) | Cárdena Andaluza | 0.114 | 0.017 | 0.146 | 0.236 | 0.133 | 0.084 | 0.139 | 0.062 | 0.068 | 0.093 | 0.049 | 0.219 | 0.107 | 0.059 |

**Tabela A.1:** Distâncias genéticas de CAVALLI-SFORZA e EDWARDS (1967) entre 23 raças bovinas da Península Ibérica, considerando 4 loci (HB, CAII, ALB e TF). (continuação)

| | População | (15) | (16) | (17) | (18) | (19) | (20) | (21) | (22) | (23) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| (1) | Mertolenga | | | | | | | | | |
| (2) | Mirandesa | | | | | | | | | |
| (3) | Maronesa | | | | | | | | | |
| (4) | Alentejana | | | | | | | | | |
| (5) | Barrosã | | | | | | | | | |
| (6) | Minhota | | | | | | | | | |
| (7) | Cachena | | | | | | | | | |
| (8) | Caldelana | | | | | | | | | |
| (9) | Limiana | | | | | | | | | |
| (10) | Frieiresa | | | | | | | | | |
| (11) | Vianesa | | | | | | | | | |
| (12) | De Lidia | | | | | | | | | |
| (13) | Arouquesa | | | | | | | | | |
| (14) | Rubia Gallega | | | | | | | | | |
| (15) | Retinta | - | | | | | | | | |
| (16) | Tudanca | 0.079 | - | | | | | | | |
| (17) | Sayaguesa | 0.022 | 0.039 | - | | | | | | |
| (18) | Morucha | 0.030 | 0.061 | 0.016 | - | | | | | |
| (19) | Alistana Sanabresa | 0.101 | 0.135 | 0.055 | 0.063 | - | | | | |
| (20) | Blanca Cacereña | 0.152 | 0.277 | 0.144 | 0.160 | 0.198 | - | | | |
| (21) | Asturiana de los Valles | 0.050 | 0.046 | 0.019 | 0.033 | 0.030 | 0.226 | - | | |
| (22) | Asturiana de la Montanã | 0.079 | 0.010 | 0.029 | 0.040 | 0.091 | 0.266 | 0.028 | - | |
| (23) | Cárdena Andaluza | 0.172 | 0.164 | 0.123 | 0.174 | 0.063 | 0.314 | 0.066 | 0.147 | - |

**Tabela A.2:** Distribuições genotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* HEL1. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 103-103 | 9 (8,7) | 1 (1,1) | 0 (2,1) | 8 (2,8) | 1 (0,3) |
| 105-103 | 16 (17,4) | 8 (7,7) | 2 (2,5) | 4 (9,7) | 6 (3,4) |
| 105-105 | 9 (8,3) | 12 (12,6) | 1 (0,7) | 9 (7,9) | 11 (8,7) |
| 109-103 | - | - | 1 (0,2) | 0 (0,2) | - |
| 111-103 | - | 0 (0,8) | 1 (0,4) | 0 (1,0) | 0 (0,1) |
| 111-105 | - | 4 (2,6) | 0 (0,2) | 1 (1,6) | 0 (0,4) |
| 113-103 | 7 (6,4) | 5 (3,6) | 17 (13,6) | 4 (7,5) | 0 (3,9) |
| 113-105 | 7 (6,2) | 9 (11,8) | 8 (7,8) | 17 (12,5) | 13 (20,3) |
| 113-109 | - | - | 0 (0,6) | 1 (0,3) | - |
| 113-111 | - | 1 (1,2) | 1 (1,3) | 3 (1,3) | 1 (0,5) |
| 113-113 | 0 (1,1) | 4 (2,6) | 19 (20,4) | 3 (4,7) | 17 (11,4) |
| 115-103 | 1 (0,8) | 0 (0,8) | - | - | 0 (0,1) |
| 115-105 | 0 (0,8) | 5 (2,6) | - | - | 1 (0,4) |
| 115-113 | 1 (0,3) | 0 (1,2) | - | - | 0 (0,5) |
| Outros | 0 (0,0) | 0 (0,4) | 0 (0,2) | 0 (0,5) | 0 (0,0) |
| Total | 50 (50,0) | 49 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,632 | 0,671 | 0,250 | 0,002** | 0,002** |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P< 0,05 e **P< 0,01

**Tabela A.3:** Distribuições genotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* INRA37. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 122-122 | 0 (0,0) | - | - | - | 1 (0,0) |
| 124-118 | 1 (0,2) | - | - | - | - |
| 124-122 | 1 (0,4) | - | - | - | - |
| 124-124 | 2 (1,7) | 0 (0,0) | 1 (0,2) | - | - |
| 126-124 | 5 (3,5) | 0(0,3) | 1 (3,8) | - | - |
| 126-126 | 2 (1,5) | 2 (0,7) | 15 (14,5) | 6 (6,0) | 4 (1,7) |
| 128-124 | 3 (1,5) | 0 (0,1) | 0 (0,3) | - | - |
| 128-126 | 1 (1,5) | 0 (0,4) | 2 (2,2) | 2 (0,7) | 3 (2,7) |
| 128-128 | 0 (0,3) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 3 (0,9) |
| 130-124 | 1 (2,5) | - | - | - | - |
| 130-126 | 0 (2,4) | - | - | 1 (1,1) | 0 (1,9) |
| 130-128 | 1 (1,0) | - | - | 0 (0,1) | 0 (1,4) |
| 130-130 | 2 (0,8) | - | - | 0 (0,0) | 2 (0,5) |
| 132-118 | 0 (0,4) | - | - | 1 (0,6) | - |
| 132-122 | 1 (0,7) | - | - | - | 1 (1,6) |
| 132-124 | 3 (7,1) | 3 (2,5) | 4 (2,5) | - | - |
| 132-126 | 7 (6,7) | 8 (9,9) | 21 (19,1) | 20 (20,2) | 8 (10,0) |
| 132-128 | 3 (3,0) | 3 (2,5) | 2 (1,4) | 0 (1,1) | 4 (7,4) |
| 132-130 | 7 (4,9) | - | - | 2 (1,7) | 6 (5,2) |
| 132-132 | 8 (6,7) | 33 (32,6) | 4 (6,0) | 17 (16,1) | 16 (13,4) |
| 136-124 | 1 (0,2) | - | - | - | - |
| 136-136 | 0 (0,0) | - | - | 1 (0,0) | - |
| 138-126 | 1 (0,2) | - | - | - | - |
| 140-128 | - | - | - | - | 1 (0,3) |
| 140-132 | - | - | - | - | 1 (1,0) |
| Outros | 0 (2,8) | - | - | 0 (2,4) | 0 (2,0) |
| Total | 50 (50,0) | 40 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,287 | 0,397 | 0,191 | 0,066 | 0,005** |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P< 0,05 e **P< 0,01

**Tabela A.4:** Distribuições genotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* INRA23. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 199-199 | 1 (0,8) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 4 (1,2) | 0 (2,1) |
| 207-199 | 1 (2,2) | - | 0 (0,1) | 4 (5,2) | 8 (8,3) |
| 207-201 | 2 (0,5) | - | - | - | 1 (0,8) |
| 207-207 | 1 (1,4) | 2 (0,6) | 0 (0,7) | 6 (5,0) | 9 (7,5) |
| 209-199 | 1 (2,0) | 0 (0,4) | 0 (0,6) | 0 (2,3) | 8 (3,8) |
| 209-201 | 0 (0,4) | - | - | - | 1 (0,4) |
| 209-205 | - | 1 (0,2) | - | - | - |
| 209-207 | 2 (2,6) | 2 (2,4) | 8 (6,7) | 1 (4,5) | 5 (7,1) |
| 209-209 | 1 (1,1) | 3 (2,2) | 17 (15,0) | 2 (0,9) | 0 (1,5) |
| 211-207 | 1 (0,9) | 0 (0,1) | 0 (0,1) | - | - |
| 211-209 | 2 (0,8) | 0 (0,2) | 0 (0,6) | - | - |
| 213-199 | 1 (0,7) | 0 (0,1) | 0 (0,0) | - | 2 (0,6) |
| 213-207 | 0 (0,9) | 1 (0,6) | 0 (0,2) | - | 0 (1,2) |
| 213-209 | 1 (0,8) | 1 (1,1) | 1 (1,1) | - | 1 (0,5) |
| 213-213 | 1 (0,1) | 1 (0,1) | 0 (0,0) | - | 0 (0,0) |
| 215-199 | 4 (2,6) | 2 (0,7) | 1 (0,2) | 3 (5,3) | 3 (3,2) |
| 215-207 | 6 (3,4) | 2 (3,7) | 4 (2,4) | 14 (10,7) | 7 (5,9) |
| 215-209 | 4 (3,0) | 6 (7,1) | 5 (11,1) | 9 (4,7) | 3 (2,7) |
| 215-211 | 0 (1,0) | 1 (0,3) | 1 (0,2) | - | - |
| 215-213 | 0 (1,0) | 1 (1,7) | 0 (0,4) | - | 0 (0,5) |
| 215-215 | 2 (1,9) | 9 (5,4) | 4 (1,9) | 2 (5,3) | 1 (1,1) |
| 217-199 | 4 (2,9) | 0 (0,5) | 0 (0,1) | 1 (0,8) | 0 (0,4) |
| 217-201 | 1 (0,7) | - | - | - | 0 (0,0) |
| 217-207 | 3 (3,8) | 2 (2,7) | 0 (1,1) | 1 (1,6) | 0 (0,8) |
| 217-209 | 3 (3,3) | 5 (5,2) | 7 (5,0) | 0 (0,7) | 0 (0,4) |
| 217-211 | 2 (1,1) | 0 (0,3) | 0 (0,1) | - | - |
| 217-213 | 1 (1,1) | 0 (1,2) | 1 (0,2) | - | 0 (0,1) |
| 217-215 | 2 (4,4) | 3 (8,2) | 1(1,8) | 3 (1,7) | 0 (0,3) |
| 217-217 | 3 (2,3) | 7 (2,9) | 0 (0,4) | 0 (0,1) | 1 (0,0) |
| Outros | 0 (2,3) | 0 (1,1) | 0 (0,0) | - | 0 (0,8) |
| Total | 50 (50,0) | 49 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,655 | 0,017* | 0,064 | 0,004** | 0,050 |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P< 0,05 e **P< 0,01

**Tabela A.5**: Distribuições genotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* ETH3. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 109-109 | 0 (0,1) | 0 (0,8) | 15 (16,7) | 0 (0,1) | 1 (1,1) |
| 115—109 | - | 1 (0,3) | - | 0 (0,5) | 2 (0,5) |
| 115-115 | - | 0 (0,0) | - | 1 (0,5) | 0 (0,0) |
| 117-109 | 1 (1,0) | 3 (3,6) | 9 (8,2) | 3 (2,1) | 5 (4,2) |
| 117-115 | - | 0 (0,6) | - | 4 (4,2) | 0 (0,8) |
| 117-117 | 4 (2,8) | 3 (3,6) | 1 (0,9) | 12 (8,7) | 4 (3,8) |
| 119-109 | 0 (0,7) | 1 (0,8) | 5 (4,7) | 1 (0,3) | 3 (2,6) |
| 119-117 | 3 (4,1) | 0 (1,7) | 1 (1,1) | 2 (3,0) | 3 (4,8) |
| 119-119 | 1 (1,4) | 0 (0,1) | 0 (0,3) | 1 (0,2) | 3 (1,4) |
| 121-109 | 0 (0,0) | 0 (0,1) | 1 (0,6) | 0 (0,2) | - |
| 121-117 | 0 (0,2) | 0 (0,3) | 0 (0,1) | 1 (1,3) | - |
| 121-119 | 1 (0,2) | 0 (0,1) | 0 (0,1) | 0 (0,2) | - |
| 121-121 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 1 (0,0) | - |
| 123-109 | 0 (0,2) | 0 (1,1) | 1 (1,2) | - | 0 (0,2) |
| 123-117 | 0 (1,0) | 4 (2,2) | 0 (0,3) | - | 1 (0,3) |
| 123-119 | 2 (0,7) | 0 (0,5) | 1 (0,2) | - | 0 (0,2) |
| 123-121 | 0 (0,0) | 1 (0,1) | 0 (0,0) | - | - |
| 123-123 | 1 (0,1) | 1 (0,3) | 0 (0,0) | - | 0 (0,0) |
| 125-109 | 2 (1,7) | 6 (4,7) | 7 (5,9) | 0 (1,4) | 3 (5,2) |
| 125-115 | - | 1 (0,7) | - | 4 (2,8) | 1 (1,0) |
| 125-117 | 11 (10,4) | 13 (9,7) | 2 (1,4) | 8 (11,9) | 10 (9,6) |
| 125-119 | 9 (7,4) | 4 (2,2) | 1 (0,8) | 1 (2,0) | 5 (5,8) |
| 125-123 | 0 (1,7) | 1 (2,9) | 0 (0,2) | - | 0 (0,3) |
| 125-125 | 9 (9,1) | 5 (6,1) | 0 (0,5) | 6 (3,8) | 7 (5,7) |
| 127-109 | 0 (0,2) | 2 (0,8) | 4 (3,5) | 1 (0,3) | 0 (0,2) |
| 127-117 | 0 (1,0) | 1 (1,7) | 0 (0,8) | 0 (2,1) | 1 (0,3) |
| 127-119 | 0 (0,7) | 1 (0,4) | 0 (0,5) | 1 (0,4) | 0 (0,2) |
| 127-125 | 3 (1,7) | 0 (2,2) | 0 (0,6) | 3 (1,4) | 0 (0,3) |
| 127-127 | 0 (0,1) | 1 (0,1) | 1 (0,1) | 0 (0,1) | 0 (0,0) |
| 129-109 | 1 (0,1) | - | - | - | 0 (0,1) |
| 129-117 | 1 (0,5) | - | - | - | 0 (0,3) |
| 129-125 | 0 (0,9) | - | - | - | 1 (0,3) |
| 131-109 | - | - | 1 (0,6) | - | - |
| 133-127 | 1 (0,0) | - | - | - | - |
| Outros | 0 (2,0) | 0 (1,3) | 0 (0,7) | 0 (2,5) | 0 (0,8) |
| Total | 50 (50,0) | 49 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,053 | 0,050 | 0,919 | 0,024* | 0,632 |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P> 0,05 e **P> 0,01

**Tabela A.6:** Distribuições fenotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* INRA5. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 139-139 | 7 (7,5) | 1 (5,5) | 4 (6,0) | 3 (6,4) | 5 (7,5) |
| 141-139 | 18 (15,0) | 19 (13,6) | 13 (13,1) | 21 (14,5) | 17 (14,6) |
| 141-141 | 6 (7,1) | 4 (8,0) | 7 (6,7) | 6 (7,9) | 7 (6,7) |
| 143-139 | 7 (7,1) | 5 (2,7) | 14 (9,9) | 9 (8,7) | 12 (9,4) |
| 143-141 | 6 (6,9) | 3 (3,3) | 10 (10,5) | 7 (9,7) | 6 (9,0) |
| 143-143 | 1 (1,5) | 0 (0,3) | 2 (3,8) | 4 (2,8) | 3 (2,8) |
| 145-139 | 0 (2,0) | 7 (5,8) | - | - | - |
| 145-141 | 2 (1,9) | 10 (7,0) | - | - | - |
| 145-143 | 3 (0,9) | 0 (1,4) | - | - | - |
| Outros | 0 (0,1) | 0 (1,4) | - | - | - |
| Total | 50 (50,0) | 49 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,279 | 0,015* | 0,395 | 0,096 | 0,392 |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P< 0,05 e **P< 0,01

**Tabela A.7:** Distribuições genotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* HEL5. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 151-151 | - | 1 (0,4) | - | - | - |
| 153-151 | - | 2 (2,3) | - | - | - |
| 153-153 | 8 (10,5) | 4 (3,1) | 5 (6,4) | 9 (7,5) | 1 (0,4) |
| 155-153 | 4 (2,8) | 3 (1,3) | 1 (0,4) | 8 (9,1) | 0 (1,1) |
| 155-155 | 0 (0,1) | 0 (0,1) | 0 (0,0) | 3 (2,6) | 1 (0,5) |
| 157-153 | - | - | 1 (2,5) | 1 (0,4) | 0 (0,3) |
| 157-157 | - | - | 1 (0,2) | - | - |
| 159-153 | 0 (0,5) | - | 15 (10,9) | 1 (0,4) | 2 (1,7) |
| 159-155 | 0 (0,1) | - | 0 (0,3) | 0 (0,2) | 2 (1,9) |
| 159-157 | - | - | 3 (2,1) | 0 (0,0) | 0 (0,5) |
| 159-159 | 0 (0,0) | - | 3 (4,4) | 0 (0,0) | 1 (1,4) |
| 163-153 | 1 (1,4) | 0 (0,5) | 1 (1,4) | 0 (0,4) | 1 (1,1) |
| 163-155 | 0 (0,2) | 0 (0,1) | 0 (0,0) | 0 (0,2) | 1 (1,2) |
| 163-157 | - | - | 0 (0,3) | 0 (0,0) | 1 (0,3) |
| 163-159 | 0 (0,0) | - | 1 (1,2) | 0 (0,0) | 3 (1,9) |
| 163-163 | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0 (0,1) | 0 (0,0) | 1 (0,6) |
| 165-151 | - | 1 (1,1) | - | - | - |
| 165-153 | 14 (13,0) | 3 (3,1) | - | 3 (1,6) | 1 (1,7) |
| 165-155 | 2 (1,7) | 1 (0,6) | - | 1 (1,0)) | 3 (1,9) |
| 165-157 | - | - | - | 0 (0,0) | 1 (0,5) |
| 165-159 | 1 (0,3) | - | - | 0 (0,0) | 2 (2,9) |
| 165-163 | 2 (0,8) | 0 (0,2) | - | 0 (0,0) | 0 (1,9) |
| 165-165 | 3 (3,8) | 1 (0,7) | - | 0 (0,1) | 3 (1,4) |
| 167-151 | - | 4 (4,2) | - | - | - |
| 167-153 | 11 (7,4) | 9 (11,6) | 8 (8,0) | 8 (12,2) | 4 (2,3) |
| 167-155 | 0 (1,0) | 1 (2,3) | 0 (0,2) | 8 (7,2) | 2 (2,6) |
| 167-157 | - | - | 1 (1,6) | 0 (0,3) | 1 (0,7) |
| 167-159 | 0 (0,2) | - | 5 (6,7) | 0 (0,3) | 5 (3,9) |
| 167-163 | 0 (0,5) | 2 (0,9) | 2 (0,9) | 1 (0,3) | 2 (2,6) |
| 167-165 | 3 (4,5) | 5 (5,6) | - | 0 (1,3) | 4 (3,9) |
| 167-167 | 1 (1,2) | 12 (10,2) | 3 (2,3) | 7 (4,7) | 2 (2,6) |
| 169-155 | - | - | - | - | 1 (0,9) |
| 169-159 | - | - | - | - | 1 (1,4) |
| 169-163 | - | - | - | - | 1 (0,9) |
| 169-167 | - | - | - | - | 1 (1,9) |
| 169-169 | - | - | - | - | 2 (0,3) |
| Outros | - | 0 (0,7) | 0 (0,1) | 0 (0,2) | 0 (2,8) |
| Total | 50 (50,0) | 49 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,717 | 0,778 | 0,534 | 0,536 | 0,620 |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P< 0,05 e **P< 0,01

**Tabela A.8:** Distribuições genotípicas nas amostras de 5 raças bovinas autóctones Portuguesas. P-teste exacto de conformidade ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (H-W) para o *locus* HEL9. Os valores esperados de acordo com o equilíbrio H-W encontram-se entre parêntesis.

| Genótipos | Barrosã | Maronesa | Mirandesa | Mertolenga | Alentejana |
|---|---|---|---|---|---|
| 153-147 | 1 (0,4) | - | - | 0 (1,5) | - |
| 153-153 | 2 (1,5) | 0 (0,0) | 2 (3,8) | 10 (6,4) | 0 (1,2) |
| 155-153 | 0 (1,6) | 0 (0,1) | 0 (0,8) | 5 (5,8) | 2 (1,6) |
| 155-155 | 0 (0,4) | 0 (0,2) | 0 (0,0) | 2 (1,2) | 0 (0,5) |
| 157-153 | 0 (0,2) | - | 1 (0,3) | - | 4 (3,7) |
| 157-155 | 0 (0,1) | - | 0 (0,0) | - | 2 (2,3) |
| 157-157 | 0 (0,0) | - | 0 (0,0) | - | 1 (2,6) |
| 159-147 | 0 (0,1) | - | - | 1 (0,1) | - |
| 159-153 | 2 (1,1) | 0 (0,0) | 1 (0,6) | 0 (1,1) | 0 (0,2) |
| 159-155 | 0 (0,5) | 1 (0,1) | 0 (0,1) | 1 (0,5) | 1 (0,1) |
| 161-151 | 1 (0,3) | - | - | - | - |
| 161-153 | 9 (5,4) | 2 (0,8) | 2 (2,5) | 8 (7,6) | 6 (4,5) |
| 161-155 | 6 (2,7) | 4 (2,7) | 1 (0,3) | 5 (3,4) | 3 (2,8) |
| 161-157 | 0 (0,3) | - | 0 (0,1) | - | 6 (6,5) |
| 161-159 | 1 (1,8) | 0 (0,4) | 0 (0,2) | 0 (0,6) | 0 (0,3) |
| 161-161 | 4 (4,4) | 9 (7,2) | 1 (0,4) | 1 (2,1) | 4 (3,8) |
| 163-147 | 1 (0,6) | - | - | 2 (0,7) | - |
| 163-153 | 1 (5,3) | 0 (0,5) | 20 (15,8) | 3 (6,2) | 2 (2,3) |
| 163-155 | 3 (2,6) | 2 (1,6) | 2 (1,7) | 1 (2,7) | 2 (1,4) |
| 163-157 | 1 (0,3) | - | 0 (0,6) | - | 6 (3,2) |
| 163-159 | 3 (1,8) | 0 (0,2) | 1 (1,1) | 1 (0,5) | 0 (0,1) |
| 163-161 | 5 (8,8) | 4 (8,6) | 4 (5,1) | 5 (3,6) | 2 (4,0) |
| 163-163 | 7 (4,1) | 4 (2,4) | 14 (15,6) | 2 (1,4) | 1 (0,9) |
| 165-149 | 1 (0,0) | - | - | - | - |
| 165-153 | 1 (0,4) | - | - | - | 2 (1,3) |
| 165-157 | 0 (0,0) | - | - | - | 3 (1,9) |
| 165-161 | 0 (0,6) | - | - | - | 3 (2,3) |
| 167-147 | 0 (0,0) | - | - | 1 (0,0) | - |
| 167-161 | 0 (0,3) | 10 (11,0) | 0 (0,1) | 0 (0,2) | - |
| 167-163 | 1 (0,3) | 8 (6,3) | 1 (0,6) | 0 (0,2) | - |
| 167-167 | 0 (0,0) | 5 (4,0) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | - |
| 169-161 | - | - | - | 1 (0,4) | - |
| 169-163 | - | - | - | 1 (0,3) | - |
| Outros | 0 (3,9) | 0 (2,9)- | 0 (0,3) | 0 (3,5) | 0 (2,5) |
| Total | 50 (50,0) | 49 (49,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) | 50 (50,0) |
| P* | 0,056 | 0,082 | 0,470 | 0,012* | 0,795 |

* Equilíbrio de Hardy-Weinberg rejeitado a *P< 0,05 e **P< 0,01