CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA BOVINA RAMO GRANDE ATRAVÉS DE MICROSSATÉLITES

Catarina Ginja
Investigadora responsável

Dezembro, 2013

Este relatório foi elaborado por solicitação da DRADR, ao abrigo da colaboração estabelecida com o Centro de Biologia Ambiental, por intermédio da Fundação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, e visa dar cumprimento aos objectivos previstos no Programa de Conservação Melhoramento da raça bovina Ramo Grande.

Sumário

A caracterização dos recursos genéticos locais é extremamente importante para se desenvolverem programas de conservação em função das especificidades de cada raça autóctone. O principal objectivo consiste em fazer uma caracterização genética detalhada da raça bovina Ramo Grande, com um conjunto de 25 microssatélites recomendados pela FAO para estudos de diversidade e conservação. Amostraram-se 49 animais da raça Ramo Grande, 17 machos e 32 fêmeas, distribuidos por 6 ilhas do Arquipélago Açoreano. A raça Ramo Grande apresenta níveis de diversidade genética idênticos aos das restantes raças autóctones Portuguesas, nomeadamente valores de heterozigotia média observada e esperada para este conjunto de *loci* de 0,690±0,117 e 0,711±0,104, respectivamente, um número médio de alelos de 7,16±1.91 e uma riqueza alélica de 6,83±1,73. O coeficiente de consanguinidade médio é de 0,031, significativamente superior a zero para $P \leq 0,05$ e é mais acentuado na população de S. Jorge. O grau de parentesco médio dos animais em cada ilha é relativamente elevado (≥30%). Mas, é necessário considerar um número mais representativo de animais inscritos no Livro (LG) para determinar os coeficientes de parentesco de forma fiável. A proximidade genética entre a raça Ramo Grande e a Frísia confirma-se no dendrograma obtido a partir de distâncias genéticas (confiança de 94%), bem como na dificuldade em separar estas raças em dois grupos independentes nas análises de estrutura genética (i.e. no Structure). A heterogeneidade genética da raça Ramo Grande reflecte-se na percentagem relativamente baixa (60 a 82%) de animais classificados nesta raça com um valor de probabilidade do genótipo individual superior a 95% (com informação *a priori* sobre a origem dos animais). Em consonância com estes resultados, identificaram-se 25 animais da raça Ramo Grande com pelo menos 10% do genótipo atribuído noutra raça (nomeadamente nas raças Frísia, Limousine e Charolesa). Os resultados deste relatório de caracterização genética são úteis na gestão do LG da Ramo Grande, pois permitem excluir do programa de reprodução animais que derivam de cruzamentos com raças comerciais importadas. E, ainda, definir medidas de conservação que minimizem o grau de parentesco entre os animais e que assegurem a diversidade genética da raça bovina Ramo Grande.

I. Introdução

A caracterização dos recursos genéticos locais é extremamente importante para se poderem desenvolver e implementar programas de conservação atendendo às especificidades de cada uma das raças autóctones de animais domésticos. Mas é, também, relevante para se estabelecerem comparações dos índices de biodiversidade à escala global. Os programas de conservação têm, necessariamente, que considerar a variabilidade existente (genética, morfológica e produtiva), a perda de diversidade eminente, bem como aspectos culturais e económicos. A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) tem encorajado uma série de medidas de monitorização e conservação dos recursos genéticos com o objectivo de prevenir perdas irreversíveis da diversidade das espécies de animais domésticos (Ajmone Marsan *et al.*, 2010, Groeneveld *et al.*, 2010).

Em Portugal existem 15 raças de bovinos autóctones que são mantidas em regiões geográficas específicas e cujas características estão descritas no Livro Genealógico (LG) de cada raça. A importação, nas décadas de 60 a 80 do século XX, de raças comerciais como a Frísia, Charolesa e Limousine traduziu-se numa forte ameaça aos recursos genéticos autóctones através de diluição por cruzamento (Ralo and Guerreiro, 1981). O número de animais reprodutores sofreu um declínio acentuado na maioria das raças autóctones, que estão classificadas como ameaçadas (Gama *et al.*, 2004). No caso particular da raça Ramo Grande e de acordo com os censos de 2012, existiam aproximadamente 1340 fêmeas e 60 machos reprodutores registados no LG, distribuídos por menos de 300 criadores (Dgav, 2013). Por outro lado, os resultados de um estudo genético recente indicam que a raça Ramo Grande sofreu uma influência significativa de animais da raça Frísia (Ginja *et al.*, 2010).

Os microssatélites são marcadores moleculares muito informativos e úteis para caracterizar a diversidade e a estrutura genética das raças de animais domésticos (Groeneveld *et al.*, 2010). No que respeita às raças bovinas autóctones Portuguesas, a análise com base em microssatélites das relações genéticas e do grau de cruzamento entre estas raças e outras congéneres Europeias foi publicada recentemente (Ginja *et al.*, 2010).

O principal objectivo deste relatório consiste em fazer uma caracterização genética detalhada da raça bovina Ramo Grande, com um conjunto de 25 microssatélites recomendados pela FAO para estudos de diversidade e conservação. Para este efeito, estimaram-se parâmetros de diversidade genética na raça Ramo Grande, analisou-se a sua variação desde 2004 e a sua distribuição pelas populações das várias ilhas.

É, também, um objectivo deste trabalho determinar o grau de parentesco 'molecular' dos animais da raça Ramo Grande nas diversas ilhas e entre ilhas. Por outro lado, a análise da estrutura genética da raça Ramo Grande e a avaliação do grau de cruzamento com raças comerciais, nomeadamente com a Frísia, é de suma importância para se definirem prioridades de melhoramento e conservação desta raça autóctone.

II. Material e métodos

2.1. Amostragem

Neste relatório, foram considerados um total de 49 animais da raça bovina Ramo Grande, dos quais 17 machos e 32 fêmeas. Tendo por base os registos genealógicos foram seleccionados, tanto quanto possível, animais não relacionados entre si até à primeira geração de forma a obter uma amostragem representativa da diversidade genética desta raça. Foram analisados animais de 6 ilhas, de acordo com o seguinte: 6 Faial (4 explorações), 1 Graciosa, 5 Pico (3 explorações), 15 São Jorge (12 explorações), 1 S. Miguel e 21 Terceira (8 explorações). A amostragem foi coordenada pela Engenheira Ana Luísa Pavão, da DRADR, tendo sido recolhido sémen e/ou raízes de pêlos de cada animal de acordo com os protocolos recomendados. Foram seguidas as regulamentações Nacionais e Europeias relativamente à experimentação e ao bem-estar Animal.

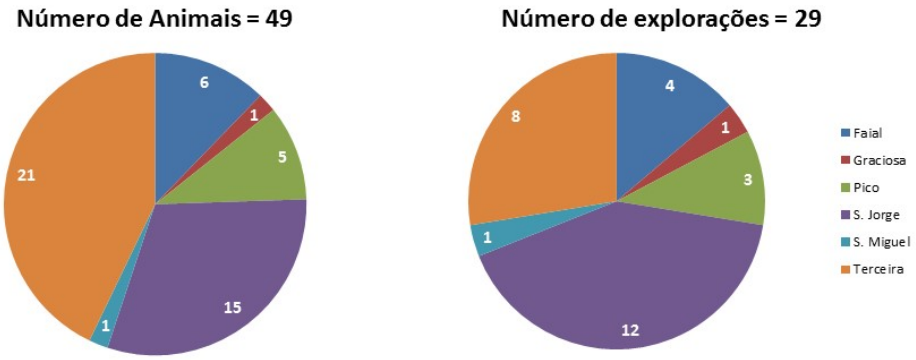


Figura 1. Distribuição do número de animais amostrados e do número de explorações pelas diferentes ilhas.

2.2. Análise de microssatélites

Analisaram-se 25 microssatélites autossómicos distribuídos por 22 cromossomas bovinos: *BM1818, BM1824, BM2113, CSRM060, CSSM036, CSSM042, CSSM066, ETH003, ETH010, ETH152, ETH185, ETH225, HAUT027, HEL009, ILSTS006, INRA023, INRA032, INRA063, MGTG4B, MM012E6, SPS115, TGLA053, TGLA122, TGLA126, TGLA227*. Este painel de marcadores moleculares já tinha sido validado (ausência de alelos nulos) e foi seleccionado com o objectivo de estabelecer comparações com uma base de dados genéticos pré-existente para 13 raças bovinas autóctones, incluindo animais da raça Ramo Grande amostrados em 2004, e 3 raças comerciais (Ginja *et al.*, 2010). A genotipagem dos microssatélites foi realizada através de aquisição de serviços ao

laboratório de genética molecular – Xenética Fontao S.A., no Lugo, Espanha (http://www.xeneticafontao.com/esp/laboratorio.php). Sendo que a extracção de ADN ficou igualmente a cargo deste laboratório. Os alelos foram codificados com base em amostras de referência do Teste de Comparação Internacional de 2011-2012 para análises de paternidade da *International Society for Animal Genetics* – ISAG.

2.3. Análise estatística

As frequências alélicas para cada *locus* e raça, bem como o número de alelos específicos de cada população (*PA*, alelos 'privados'), foram determinados com o programa GenAlex v. 6.5 (Peakall and Smouse, 2006, 2012). O programa Genetix v. 4.05 (Belkhir *et al.*, 1996-2004) foi utilizado para estimar parâmetros de diversidade genética em cada raça, nomeadamente: as heterozigotias observada (H_o) e esperada não-enviesada (H_e); e o número médio de alelos (*NMA*). A riqueza alélica (R_t) por *locus* ponderada para o tamanho de cada população foi estimada com o programa Fstat v. 2.9.3 (Goudet, 2001). Este programa foi, também, utilizado para calcular *F-statistics* de Weir e Cockerham (1984), nomeadamente os coeficientes de consanguinidade (F_{is}) de cada população e o coeficiente de diferenciação genética entre populações (F_{st}), com base em 1000 permutações.

Os desvios da situação de Equilibrio Hardy-Weinberg foram determinados com o programa Genepop v. 4.2.1 (Raymond and Rousset, 2003). Fizeram-se testes globais para todas as populações e todos os *loci*, bem como testes por *locus* e por população de acordo com o método de Guo e Thompson (1992). Os valores de *P* foram determinados por cálculo de cadeias de Markov utilizando as definições seguintes: 10000 *dememorization steps*, 500 *batches*, 5000 *iterations*.

Os coeficientes de parentesco entre indivíduos (f_m, '*average molecular coancestry*') foram estimados com o programa Molkin v.3 (Gutierrez *et al.*, 2005) a partir das frequências alélicas, bem como o parentesco médio entre indivíduos na Raça Ramo Grande e nas populações de cada ilha (f_{ii}). A matriz de coeficientes de parentesco médio estimados em cada ilha e entre as populações das várias ilhas (f_{ij}) foi utilizada para construir 'gráficos de contorno' com o programa MATLAB® (The MathWorks, Inc., USA).

As distâncias genéticas D_A entre populações (Nei *et al.*, 1983) e entre indivíduos com base na partilha de alelos (*DAS*) foram calculadas com o programa Populations v. 1.2.28 (Langella, 1999-2002). Os dendrogramas *Neighbor-Net* e *Neighbor-Joining* obtidos a partir destas distâncias foram visualizados e editados no programa SplitsTree4 v. 4.10 (Huson and Bryant, 2006).

O programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para analisar a estrutura genética e o grau de cruzamento entre raças por métodos *Bayesianos*. O número mais provável de populações (*K*) foi determinado para 1≤*K*≤18, com 5 repetições independentes para cada valor de *K*, 50000 iterações de *burn-in* e 100000 iterações nas simulações de Monte Carlo via cadeias de Markov (MCMC). Utilizou-se um modelo com cruzamento ('*admixture'*) e frequências alélicas correlacionadas (Falush *et al.*, 2003). O método de Evanno et al. (2005) foi utilizado para identificar o *K* mais provável através da distribuição do *ΔK*. Esta análise com o STRUCTURE foi repetida para subconjuntos de dados para detectar subestrutura populacional. Depois de determinar o número de partições inerente a este conjunto de dados, realizou-se uma nova análise com o programa Structure para classificação dos animais nas populações de origem e identificar animais cruzados. Nesta análise utilizou-se o mesmo modelo, mas prolongaram-se os cálculos de MCMC (100000 iterações de *burn-in* e 1000000 de iterações MCMC).

A classificação dos indivíduos nas populações de origem foi feita com o STRUCTURE e os mesmos parâmetros MCMC, mas definindo *à priori* as raças em que foram amostrados. Neste caso, estimou-se a proporção do genótipo de cada indivíduo em cada raça (*q*) e a probabilidade de terem ascendentes de outras raças até à segunda geração. Calculou-se, também, a percentagem de indivíduos correctamente classificados em cada raça com um valor de *q*≥0,8.

III. Resultados

3.1. Diversidade genética

Os índices de diversidade genética estimados para a raça Ramo Grande (RGD e RGL), bem como para as 12 raças autóctones e as 3 raças comerciais, estão sumariados na Tabela 1. A raça Ramo Grande (RGL) apresenta níveis de diversidade genética idênticos aos das restantes raças autóctones Portuguesas, nomeadamente valores de heterozigotia média observada e esperada para este conjunto de *loci* de 0,690±0,117 e 0,711±0,104, um número médio de alelos de 7,16±1.91, uma riqueza alélica de 6,83±1,73 e 2 alelos 'privados'. Nesta população observaram-se 3 *loci* com défice de heterozigotia e um coeficiente de consanguinidade médio de 0,031, significativamente superior a zero para *P*≤0,05. Não se observaram diferenças significativas entre os valores médios de diversidade genética obtidos para a população Ramo Grande amostrada em 2004 e a do presente estudo, sendo que o valor de H_e diminuiu ligeiramente (Figura 2). Os 2 alelos 'privados' da população RGL foram observados nos *loci HAUT027* (animais registados no livro genealógico: PT915364695, PT697097169 e PT797097413) e *TGLA227* (PT714680421) em frequências inferiores a 5%.

Tabela 1. Heterozigotia observada (H_o) e esperada não-enviesada (H_e), número médio de alelos (*NMA*), riqueza alélica (R_t), alelos 'privados', coeficiente de consanguinidade (F_{is}) e número de *loci* com défice de heterozigotia (*HWEd*) estimados com base em 25 microssatélites para a raça Ramo Grande, 12 raças autóctones Portuguesas e 3 raças comerciais importadas.

Raça	*N*	H_o±*DP*	H_e±*DP*	*NMA*±*DP*	R_t±*DP*	*PA*	F_{is}	*HWEd*
Ramo Grande 2004 (RGD)	41	0,696±0,087	0,727±0,084	7,60±2,22	7,47±2,12	0	0,042**	5
Ramo Grande 2013 (RGL)	49	0,690±0,117	0,711±0,104	7,16±1,91	6,83±1,73	2	0,031*	3
Alentejana (ALT)	38	0,646±0,143	0,683±0,136	5,84±1,34	5,82±1,34	0	0,055**	3
Arouquesa (ARO)	70	0,714±0,122	0,739±0,095	8,04±2,47	7,33±2,01	4	0,034**	7
Barrosã (BAR)	69	0,693±0,151	0,700±0,134	6,68±1,65	6,28±1,49	0	0,010	0
Brava de Lide (BRA)	43	0,554±0,158	0,613±0,163	5,36±1,70	5,26±1,63	1	0,098***	8
Cachena (CAC)	51	0,729±0,147	0,727±0,132	7,56±1,87	7,27±1,69	2	-0,002	2
Garvonesa (GAR)	39	0,673±0,149	0,659±0,143	6,04±1,67	6,00±1,65	0	-0,022	2
Marinhoa (MRI)	46	0,683±0,148	0,693±0,136	6,16±1,68	6,03±1,62	0	0,014	1
Maronesa (MRO)	47	0,668±0,130	0,691±0,103	6,56±1,78	6,36±1,63	0	0,033*	7
Mertolenga (MER)	64	0,652±0,120	0,727±0,114	7,80±2,24	7,29±1,95	1	0,103***	10
Minhota (MIN)	50	0,761±0,116	0,724±0,097	7,68±2,12	7,37±1,96	4	-0,052	1
Mirandesa (MIR)	54	0,626±0,113	0,643±0,109	5,64±0,99	5,29±0,88	2	0,028	3
Preta (PRE)	60	0,651±0,136	0,674±0,139	7,00±2,40	6,58±2,07	2	0,035**	3
Charolês (CHA)	58	0,685±0,140	0,705±0,129	6,84±1,91	6,52±1,79	1	0,028*	3
Frísia (FRI)	51	0,724±0,118	0,715±0,102	6,88±2,28	6,59±1,93	6	-0,012	2
Limousine (LIM)	47	0,725±0,079	0,727±0,084	6,72±1,95	6,57±1,86	1	0,003	1
Média		**0,680±0,048**	**0,697±0,034**	**6,80±0,80**	**6,52±0,70**		**0,025**	**61**

N: tamanho da amostra. *DP*: desvio padrão. Níveis de significância: *(P≤0,05), **(P≤0,01) e ***(P≤0,001).

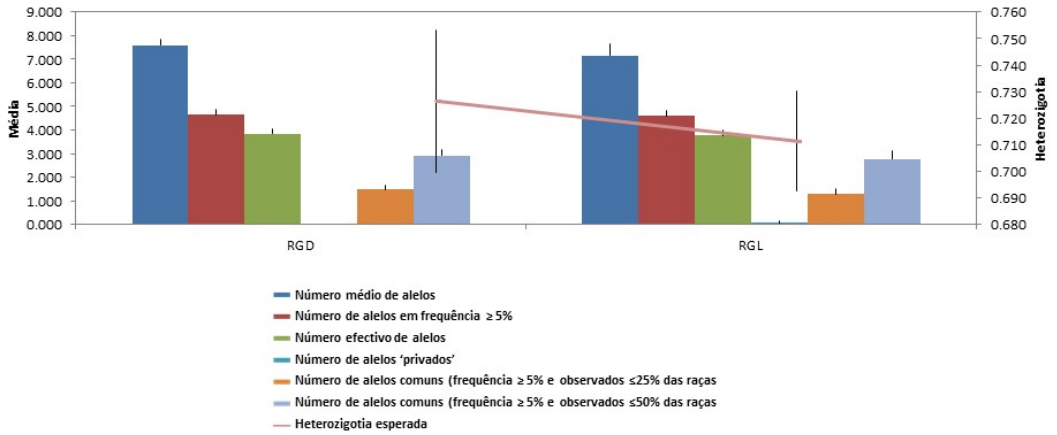


Figura 2. Comparação da diversidade genética entre a população Ramo Grande amostrada em 2004 (RGD) e a de 2013 (RGL).

A distribuição da diversidade genética pelas diversas ilhas está sumariada na Tabela 2. A população de Ramo Grande da ilha de S. Jorge aparenta ser a que contém maior diversidade genética (H_e±*DP*=0,730±0,087 e *NMA*±*DP*= 5,80±1,47). No entanto, é imprescindível considerar o número de animais amostrados em cada ilha pelo que, a julgar pela riqueza alélica (média R_t=4,05±0,21) e pelo número efectivo de alelos (Figura 2), não se verificam diferenças muito significativas entre ilhas. A população de S. Jorge apresenta 3 *loci* com défice de heterozigotia e um coeficiente de consanguinidade médio de 0,071, significativamente superior a zero para *P*≤0,01.

Tabela 2. Heterozigotia observada (H_o) e esperada não-enviesada (H_e), número médio de alelos (*NMA*), riqueza alélica (R_t), coeficiente de consanguinidade (F_{is}) e número de *loci* com défice de heterozigotia (*HWEd*) estimados para a raça Ramo Grande em 4 ilhas: Faial, Pico, S. Jorge e Terceira com base em 25 microssatélites.

População	*N*	H_o±*DP*	H_e±*DP*	*NMA*±*DP*	R_t±*DP*	F_{is}	*HWEd*
Faial (RGF)	6	0,773±0,254	0,729±0,172	4,52±1,45	4,26±1,31	-0,068	0
Pico (RGP)	5	0,744±0,212	0,696±0,131	3,92±1,15	3,92±1,15	-0,078	0
São Jorge (RGS)	15	0,680±0,153	0,730±0,087	5,80±1,47	4,19±0,78	0,071**	3
Terceira (RGT)	21	0,651±0,151	0,676±0,148	5,20±1,71	3,82±0,92	0,038	1
Média		0,712±0,056	0,708±0,026	4,86±0,82	4,05±0,21	**0,024**	**4**

N: tamanho da amostra. *DP*: desvio padrão. Níveis de significância: *(*P*≤0,05), **(*P*≤0,01) e ***(*P*≤0,001).
As ilhas da Graciosa e de S. Miguel não foram consideradas, N=1.

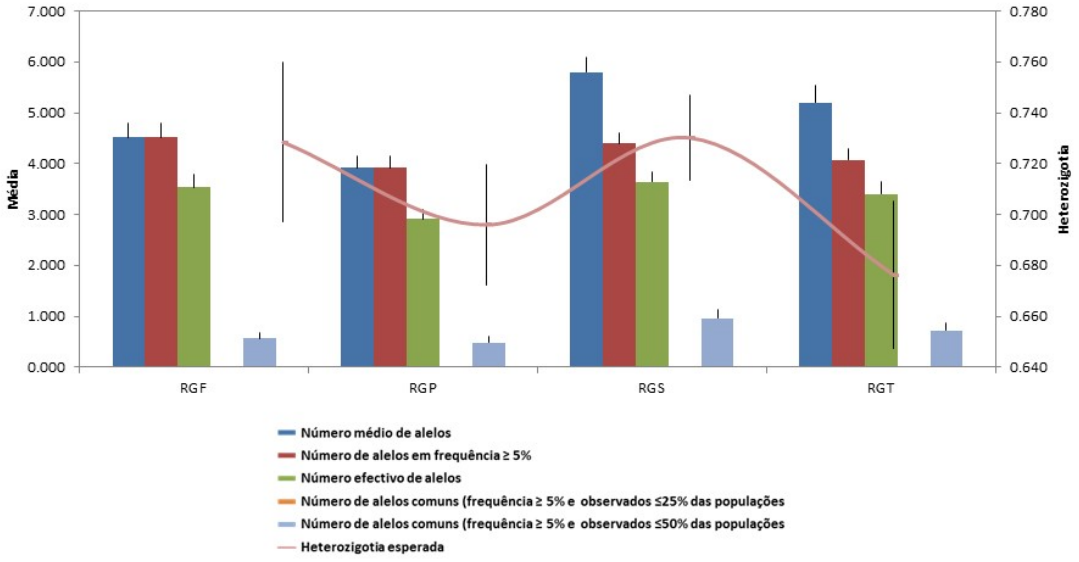


Figura 3. Comparação da diversidade genética entre as populações Ramo Grande de 4 ilhas: Faial, Pico, S. Jorge e Terceira.

Os coeficientes de parentesco médio entre indivíduos em cada ilha (f_{ii}) e entre ilhas (f_{ij}) estão representados no gráfico de contorno da Figura 4. As cores quentes (vermelho, laranja e amarelo) e as cores frias (tons de azul) diferenciam entre graus de parentesco mais elevados e mais reduzidos, respectivamente. O grau de parentesco médio em cada ilha é relativamente elevado, mas é necessário considerar que foram amostradas um número reduzido de explorações (particularmente no Faial e no Pico), provavelmente com índices de consanguinidade altos (ver relatório de análise demográfica), o que resulta num grau de parentesco entre indivíduos igualmente elevado.

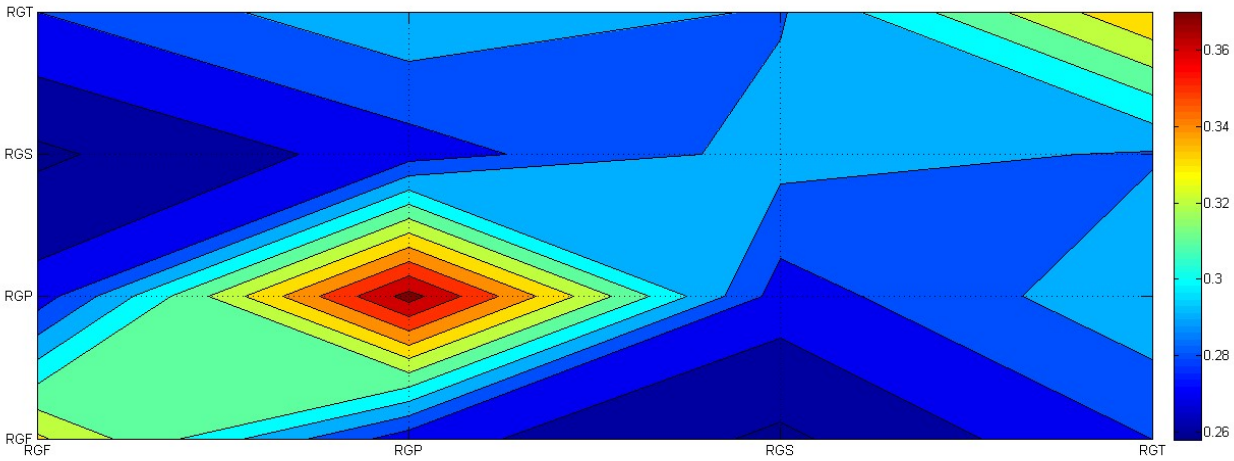


Figura 4. Gráfico de contorno obtido a partir da matriz de coeficientes de parentesco médio estimados em cada ilha (f_{ii}) e entre ilhas (f_{ij}).

A população da ilha do Pico foi a que registou o nível mais alto de parentesco médio entre animais (f_{ii}=0,374). Relativamente aos coeficientes de parentesco médio entre ilhas, o valor mais baixo foi obtido entre a população do Faial e a de S. Jorge (f_{ij}=0,258) e o mais alto entre a população do Pico e a da Terceira (f_{ij}=0,298).

3.2. Relações filogenéticas

As relações genéticas entre a raça Ramo Grande (RGD 2004 e RGL 2013), as restantes 12 raças autóctones Portuguesas e as 3 raças comerciais incluídas neste estudo estão ilustradas na Figura 5. A proximidade genética evidente entre a raça Ramo Grande e a raça Frísia é validada pelo elevado grau de confiança obtido para este ramo do dendrograma (valor de '*bootstrap*' = 94%). No entanto, nota-se uma evolução positiva uma vez que a população Ramo Grande amostrada em 2013 (RGD) está um pouco mais distante da raça Frísia do que a sua congénere de 2004 (RGD).

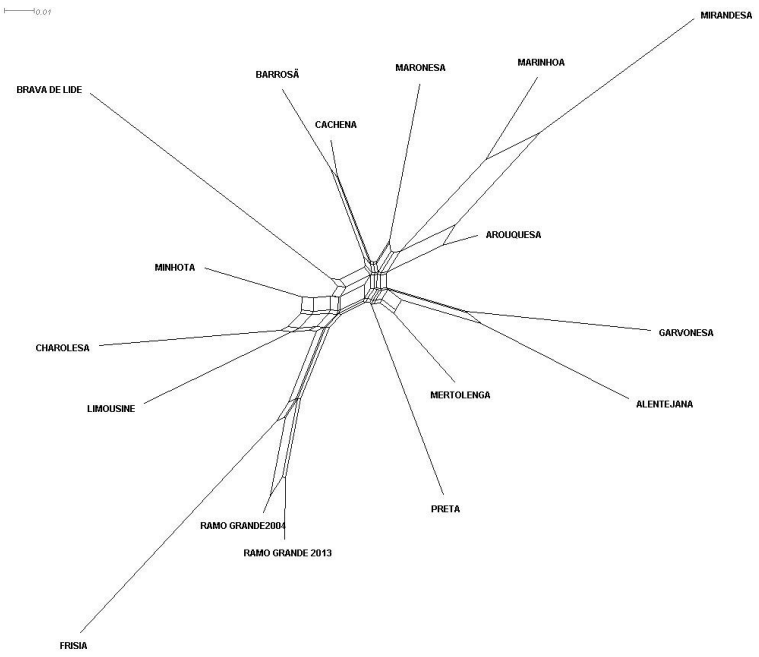


Figura 5. Dendrograma *Neighbor-Net* obtido a partir da matriz de distâncias genéticas D_A entre 2 populações da raça Ramo Grande (RGD 2004 e RGL 2013), 12 raças autóctones Portuguesas e 3 raças comerciais.

Com base nos valores de F_{st} (Tabela 3), todas as raças autóctones Portuguesas são geneticamente diferenciadas entre si ($P \leq 0,05$), incluindo a raça Barrosã e Cachena cujo valor de F_{st} é baixo (F_{st} =0,013, Tabela 3). Como seria de esperar, este não é o caso das populações RGD e RGL e que apresentaram um valor de F_{st}=0,005 mínimo e não significativo ($P \leq 0,05$). Sendo que os valores de médios das populações RGD e RGL (F_{st}=0,073±0,030 e F_{st}=0,084±0,033, respectivamente) foram intermédios relativamente aos estimados nas outras raças.

Tabela 3. Valores de F_{st} médios estimados para o conjunto de 25 microssatélites entre pares de populações (abaixo da diagonal) e em cada população (*diagonal*) nas 12 raças autóctones, 3 raças exóticas e 2 populações da raça Ramo Grande.

	ALT	ARO	BAR	BRA	CAC	CHA	FRI	GAR	LIM	MRI	MRO	MER	MIN	MIR	PRE	RGD	RGL
ALT	*0,084*																
ARO	0,057	*0,056*															
BAR	0,074	0,039	*0,077*														
BRA	0,125	0,079	0,111	*0,114*													
CAC	0,059	0,026	0,013	0,090	*0,064*												
CHA	0,092	0,061	0,092	0,107	0,081	*0,085*											
FRI	0,129	0,088	0,105	0,140	0,094	0,094	*0,106*										
GAR	0,064	0,074	0,086	0,124	0,076	0,097	0,128	*0,097*									
LIM	0,075	0,047	0,075	0,098	0,056	0,052	0,087	0,090	*0,072*								
MRI	0,090	0,054	0,085	0,128	0,067	0,103	0,122	0,107	0,082	*0,087*							
MRO	0,060	0,043	0,060	0,107	0,042	0,102	0,096	0,092	0,071	0,072	*0,076*						
MER	0,049	0,034	0,055	0,094	0,044	0,059	0,091	0,067	0,056	0,064	0,054	*0,063*					
MIN	0,073	0,036	0,060	0,089	0,046	0,046	0,089	0,084	0,035	0,071	0,069	0,046	*0,064*				
MIR	0,126	0,074	0,130	0,181	0,120	0,152	0,166	0,156	0,126	0,077	0,112	0,107	0,122	*0,130*			
PRE	0,091	0,057	0,073	0,125	0,070	0,079	0,126	0,109	0,079	0,084	0,081	0,066	0,060	0,125	*0,088*		
RGD	0,088	0,060	0,079	0,105	0,063	0,063	0,063	0,094	0,054	0,092	0,069	0,052	0,048	0,142	0,088	*0,073*	
RGL	0,098	0,071	0,094	0,115	0,076	0,077	0,075	0,109	0,066	0,103	0,079	0,065	0,056	0,158	0,100	**0,005**	*0,084*

O valor a negrito indica F_{st} não significativo para $P \leq 0,05$.

As relações genéticas entre as populações da raça Ramo Grande das ilhas do Faial, do Pico, de S. Jorge e da Terceira estão representadas na Figura 6. Nesta análise foram incluídas as raças Frísia, uma vez que existem evidências de cruzamento com animais da Ramo Grande, e Mirandesa para comparação, pois esta é a raça autóctone mais diferenciada geneticamente (F_{st}=0,130±0,030).

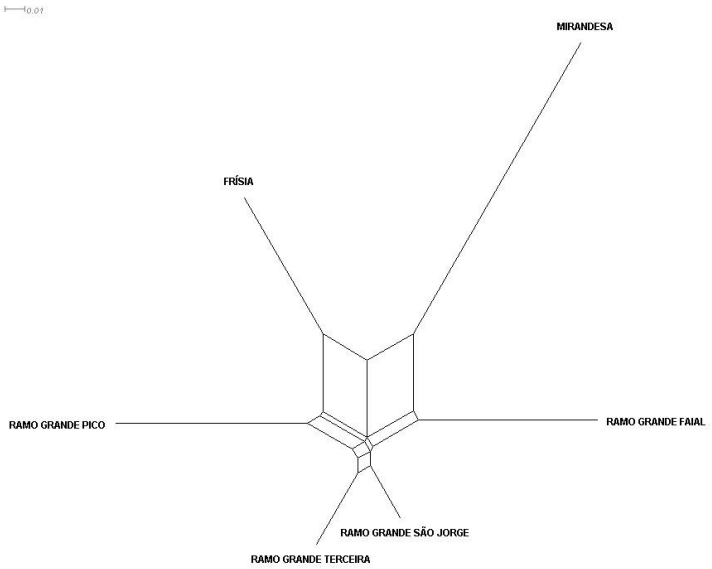


Figura 6. Dendrograma *Neighbor-Net* obtido a partir da matriz de distâncias genéticas D_A entre as populações da raça Ramo Grande de 4 ilhas (Faial, Pico, S. Jorge e Terceira), a raça comercial Frísia e a raça Mirandesa.

Os valores de F_{st} médios calculados para o conjunto de 25 microssatélites entre pares de populações da raça Ramo Grande das 4 ilhas analisadas (Tabela 4) indicam que, excepto as da ilha Terceira e do Pico, estas populações não são geneticamente diferenciadas (P≤0,05). Sendo que a população de S. Jorge foi a que apresentou o valor médio mais baixo (F_{st}=0,012±0,003). Este resultado é consistente com a análise de distâncias genéticas ilustrada na Figura 6.

Tabela 4. Valores de F_{st} médios estimados para o conjunto de 25 microssatélites entre pares de populações (abaixo da diagonal) e em cada população (*diagonal*) da raça Ramo Grande do Faial, do Pico, de S. Jorge e da Terceira

	RGF	RGP	RGS	RGT
RGF	*0,022*			
RGP	**0,026**	*0,020*		
RGS	**0,015**	**0,011**	*0,012*	
RGT	0,027	**0,023**	**0,010**	*0,020*

Valores a negrito indicam F_{st} não significativos para P≤0,05.

As relações genéticas entre indivíduos da raça Ramo Grande de cada uma das 4 ilhas, da raça Frísia e da raça Mirandesa estão ilustradas na Figura 7. A influência da raça Frísia na raça Ramo Grande é visível, nomeadamente há 6 animais inscritos no Livro Genealógico da raça Ramo Grande (PT915364695 e PT796177826 do Pico; PT317033191, PT616197390 e PT317033073 de S. Jorge; PT793357726 da Terceira), todos oriundos de explorações diferentes, que se agrupam com os animais da raça Frísia. O animal PT816195239 aparenta ser geneticamente mais próximo da raça Mirandesa, sendo que este resultado poderá ser reflexo da ausência das restantes raças/populações nesta análise. Os animais Ramo Grande das várias ilhas formam um grupo relativamente heterogéneo (pouca diferenciação genética), o que está em consonância com a análise dos valores de F_{st} médios (não significativos) entre estas populações.

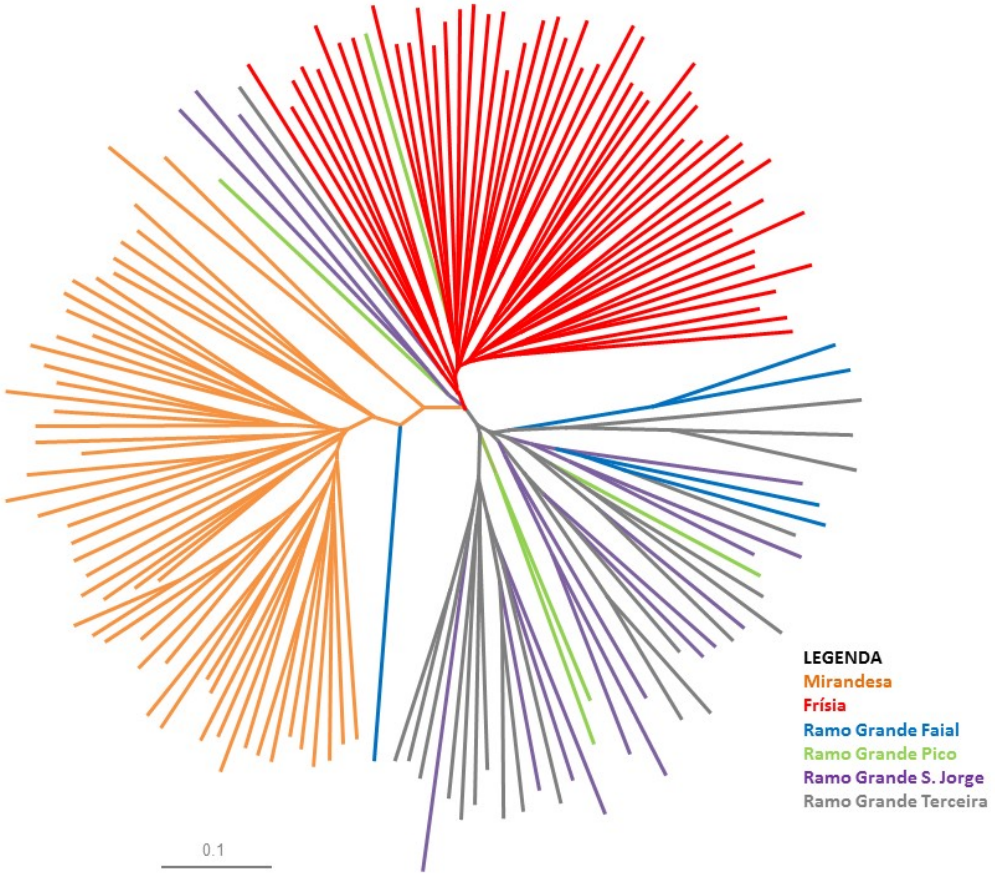


Figura 7. Dendrograma *Neighbor-Joining* obtido a partir da matriz de distâncias genéticas *DAS* entre animais da raça Ramo Grande de 4 ilhas (Faial, Pico, S. Jorge e Terceira), da raça comercial Frísia e da raça Mirandesa.

3.3. Estrutura genética e grau de cruzamento

A análise *Bayesiana* da estrutura genética das raças autóctones Portuguesas foi realizada anteriormente para um conjunto mais alargado de marcadores moleculares (*i.e.* 40 microssatélites) e, com excepção das raças Barrosã e Cachena que integraram um grupo único, todas as raças autóctones e comerciais formaram grupos independentes (Ginja *et al.*, 2010). A análise que agora fizemos incluiu 25 desses microssatélites, bem como a população da raça Ramo Grande amostrada em 2013 (RGL), e resultou num número provável de 14 populações (*K*), determinado com base no valor de ΔK=3,88 (Figura 8 e Tabela 5).

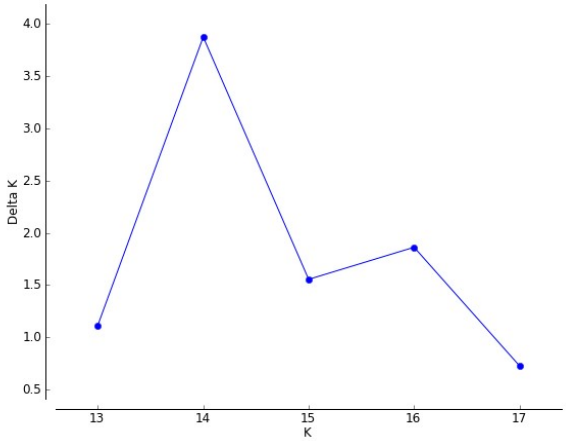


Figura 8. Distribuição do ΔK obtido com o programa Structure para valores de $12 \leq K \leq 17$ e resultantes da análise da raça Ramo Grande (RGD e RGL), de 12 raças autóctones Portuguesas e de 3 raças comerciais, sem incluir *a priori* informação sobre as populações de origem de cada animal.

Os resultados desta análise confirmam a proximidade genética entre a raça Ramo Grande e a Frísia, que formaram um grupo único (grupo 14 da Tabela 5, definido pela cor roxa na Figura 9). A proporção média dos genótipos (*Q*) dos animais da raça Ramo Grande (RGD e RGL) contidos no grupo 14 foi de, aproximadamente, 74% (Tabela 5). Este valor é ligeiramente inferior ao da média global observada nestas raças (*Q*=0,793±0.169), o que sugere que a raça Ramo Grande tem uma composição genética heterogénea. Isto traduz-se numa percentagem baixa de animais correctamente classificados, com probabilidades dos genótipos individuais elevadas (*i.e.* $q \geq 0{,}80$), na raça Ramo Grande (~44% e 51% na RGD e RGl, respectivamente). No entanto, apenas um animal Ramo Grande (PT293305895) apresentou probabilidade máxima do seu genótipo noutra população ($q \geq 0{,}80$ na raça Minhota). Na Figura 8 observa-se um segundo pico na distribuição dos valores de ΔK=1,87 para *K*=16 e, neste caso, a raça Ramo Grande forma um grupo independente (Figura 9). Estes resultados indicam, ainda, uma maior influência da raça Frísia na população RGD (*Q*=0,128 no grupo da Frísia), que registou apenas 36,6% de animais correctamente classificados (Tabela 6).

Tabela 5. Resultados da análise com o Structure obtidos para *K*=14 e sem incluir informação *a priori* sobre as populações de origem. Está indicado o seguinte: o grupo correspondente a cada população, a proporção média dos genótipos dos animais amostrados (*Q*) em cada população, a percentagem de animais correctamente classificados na população de origem e o número de animais incorrectamente classificados noutras populações.

População	*N*	Grupo	*Q±DP*	% Corr. *q*≥0,80	%Incorr. *q*≥0,80
Ramo Grande 2004 (RGD)	41	14	0,738±0,179	43,9	1
Ramo Grande 2013 (RGL)	49	14	0,741±0,205	51,0	
Alentejana	38	11	0,809±0,177	63,2	
Arouquesa	70	2	0,719±0,187	44,3	1
Barrosã	69	13	0,862±0,085	79,7	
Brava de Lide	43	12	0,866±0,135	79,1	
Cachena	51	13	0,710±0,159	39,2	1
Garvonesa	39	5	0,796±0,181	59,0	
Marinhoa	46	1	0,848±0,109	76,1	
Maronesa	47	6	0,848±0,108	76,6	
Mertolenga	64	4	0,682±0,218	39,1	1
Minhota	50	8	0,728±0,195	52,0	
Mirandesa	54	9	0,895±0,096	85,2	
Preta	60	3	0,736±0,178	50,0	
Charolês	58	7	0,838±0,140	70,7	
Frísia	51	14	0,873±0,090	78,4	
Limousine	47	10	0,839±0,097	76,6	
Totais	**877**	**14**	**0,793±0,169**	**62,1**	**4**

N: tamanho da amostra. *DP*: desvio padrão. *q*: probabilidade do genótipo individual.

Tabela 6. Sumário dos resultados da análise com o Structure obtidos para *K*=16 e sem incluir informação *a priori* sobre as populações de origem.

População	*N*	Grupo	*Q±DP*	% Corr. *q*≥0,80	%Incorr. *q*≥0,80
Ramo Grande 2004 (RGD)	41	13	0,631±0,257	36,6	
Ramo Grande 2013 (RGL)	49	13	0,746±0,209	55,1	
Totais	**877**	**16**	**0,772±0,181**	**57,4**	7

N: tamanho da amostra. *DP*: desvio padrão. *q*: probabilidade do genótipo individual.

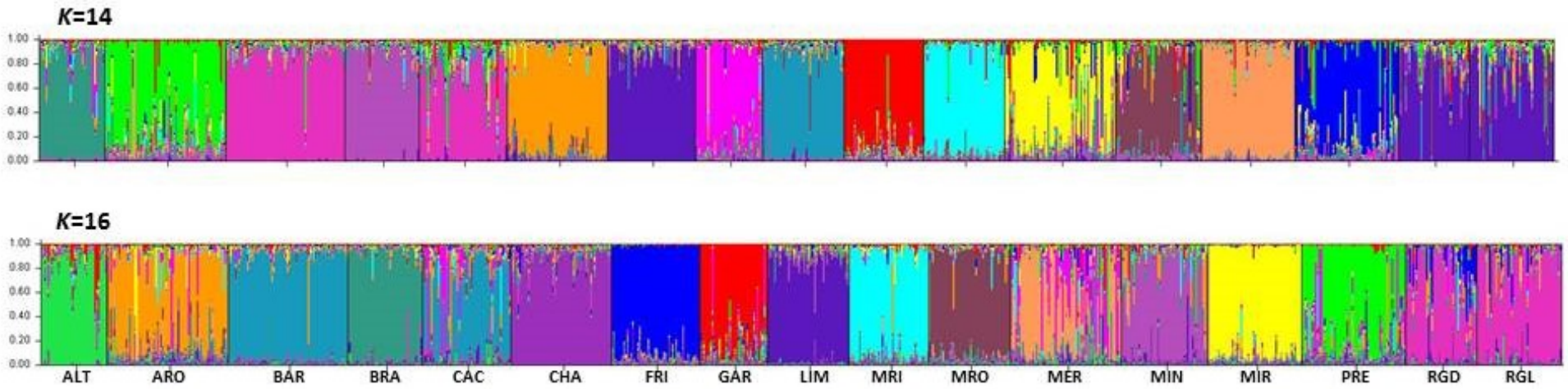


Figura 9. Representação gráfica das probabilidades dos genótipos individuais, em cada uma das populações, calculadas com o programa Structure para *K*=14 e *K*=16 sem incluir informação *a priori* sobre as populações de origem. Cada animal é representado por uma linha e cada grupo genético é identificado por uma cor.

A existência de subestrutura em cada um dos 14 grupos identificados através do Structure pode ser analisada nos mesmos moldes, mas utilizando subconjuntos dos dados genotípicos. Assim, optou-se por repetir a análise do Structure para averiguar se é possível distinguir entre as raças Ramo Grande e Frísia com este conjunto de microssatélites. Incluíram-se na análise duas raças autóctones bem diferenciadas (MIR e MRO). Na Figura 10 e com base no valor de ΔK=195,6, identifica-se K=4 como o número mais provável de partições para este conjunto de dados.

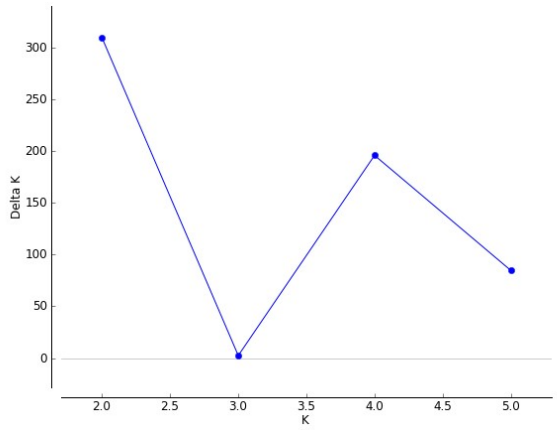


Figura 10. Distribuição do ΔK obtido com o programa Structure para valores de 1≤K≤5 e resultantes da análise da raça Ramo Grande (RGD e RGL), das raças Maronesa e Mirandesa e da raça comercial Frísia, sem incluir *a priori* informação sobre as populações de origem.

Este resultado confirma a separação da raça Ramo Grande num grupo independente (representado a azul na Figura 11), sendo que a influência da raça Frísia mantém-se ao nível dos 10% na população RGD (cor vermelha registada em animais Ramo Grande, Figura 11). Verifica-se que as populações RGD e RGL não estão geneticamente diferenciadas, o que corrobora os resultados das análises de F_{st} e de distâncias genéticas (Tabela 3 e Figura 5). O mesmo é válido para as populações do Faial, do Pico, de S. Jorge e da Terceira.

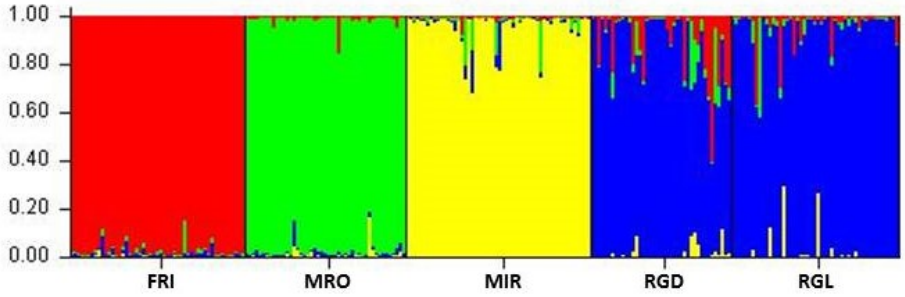


Figura 11. Representação gráfica das probabilidades dos genótipos individuais, nas populações Frísia, Maronesa, Mirandesa e Ramo Grande, calculadas com o programa Structure para K=4 sem incluir informação *a priori* sobre as populações de origem.

Os resultados da análise com o Structure quando se incluiu informação sobre as populações de origem dos animais estão resumidos, para a raça Ramo Grande, na Tabela 7. O facto de se observar uma percentagem relativamente baixa de animais classificados nesta raça com um valor de probabilidade do genótipo individual superior a 95% (RGD=61% e RGL=81.6%) reflecte bem a sua heterogeneidade genética.

Tabela 7. Sumário dos resultados da análise com o Structure obtidos para *K*=16 e com informação *a priori* sobre as populações de origem. Está indicado o seguinte: a proporção média dos genótipos dos animais amostrados (*Q*) na raça Ramo Grande e a percentagem de animais cruzados.

População	*N*	*Q±DP*	% Corr. *q*≥0.99	% Corr. *q*≥0,95	% Corr. *q*≥0,80	%Cruz. *q*<0,95
Ramo Grande 2004 (RGD)	41	0,873±0,219	0,0	61,0	85,4	39,0
Ramo Grande 2013 (RGL)	49	0,924±0,184	12,2	81,6	91,8	18,4
Média	**90**	**0,901±0,201**	**6,7**	**72,2**	**88,9**	**27,8**

N: tamanho da amostra. *DP*: desvio padrão. *q*: probabilidade do genótipo individual.

Numa perspectiva menos conservadora, podia ser considerado um valor de *q* inferior a 80% para definir animais cruzados. Neste caso, as percentagens de animais com evidência de cruzamento decrescem para 14,6 e 8,2 nas populações RGD e RGL, respectivamente. No entanto, ao forçar os animais a pertencer a uma determinada raça ou população para fazer as análises com o Structure é recomendado considerar probabilidades do genótipo individual superiores.

Assim sendo, identificaram-se 25 animais da raça Ramo Grande com um valor de *q* inferior a 95%, quando se incluiu informação sobre a população de origem, e com pelo menos 10% do genótipo atribuído noutra raça (nomeadamente nas raças Frísia, Limousine e Charolesa) na análise sem informação *a priori* sobre a proveniência dos animais (Tabela 8 e Figura 12). A população Ramo Grande amostrada em 2004 regista uma influência superior da raça Frísia do que os animais Ramo Grande amostrados no âmbito deste relatório. A influência de raças autóctones na Ramo Grande poderá ser aceitável dentro de certos limites, tendo em conta que estas raças terão contribuído originalmente para a sua formação. No caso dos animais Ramo Grande que denotam evidência de cruzamento com raças comerciais importadas recomenda-se que não sejam utilizados como reprodutores.

Tabela 8. Lista dos 25 animais da raça Ramo Grande que registaram uma probabilidade do genótipo individual, *q*<0,95 na população de origem definida nas análises com o Structure. Indica-se, ainda, a ilha e o criador onde os animais foram amostrados, o sexo de cada animal, as raças provavelmente utilizadas em cruzamento e possibilidade de ascendência noutras raças até à 1ª e/ou 2ª geração.

População	Registo LG	Ilha	Criador	Sexo	Cruzamento	Pais	Avós
RGD	PT493296574			F	FRI		✓
RGD	PT793302332			F	BRA		✓
RGD	PT595504792			F	FRI		
RGD	PT595480466			F	[1]LIM/ARO	✓	✓
RGD	PT595492247			F	LIM/FRI		✓
RGD	PT095521411			M	CAC/MIN/LIM		✓
RGD	PT195522793			M	CHA/FRI		
RGD	PT2731847			F	MRO/BAR/CAC/MIR	✓	✓
RGD	PT2730827			F	MRI	✓	✓
RGD	PT295491645			F	FRI		
RGD	PT295495261			F	FRI	✓	✓
RGD	PT895479843			F	FRI		
RGD	PT395483611			F	CHA/FRI	✓	✓
RGD	PT495503038			F	FRI		
RGD	PT495524205			F	FRI		
RGD	PT095511875			F	FRI		
RGL	PT095506925	S. Jorge	57	M	MER/CHA	✓	✓
RGL	PT915364695	Pico	417	M	MRI/CAC/FRI		✓
RGL	PT214618818	Faial	325	M	LIM/ARO/MIR	✓	✓
RGL	PT816195239	Faial	267	M	ALT/MER/MIR	✓	✓
RGL	PT217012618	Pico	247	F	BAR/CAC/ALT		
RGL	PT115353704	Faial	284	F	MIR		✓
RGL	PT715283718	S. Miguel	410	F	CHA		✓
RGL	PT616197390	S. Jorge	65	F	LIM/CHA/FRI		✓
RGL	PT715393387	Terceira	288	F	LIM/FRI		

[1]Este animal apresentou uma proporção significativa do seu genótipo na raça Limousine (~40%), na análise do Structure sem informação sobre a população de origem, e uma probabilidade significativa de pertencer à raça Limousine, na análise do Structure quando essa informação foi considerada.

Os resultados do Structure foram consistentes com os da análise de distâncias genéticas, nomeadamente confirmou-se a proximidade genética entre os animais PT915364695 e PT616197390 e as raças comerciais importadas e o touro PT816195239 é, muito provavelmente, descendente da raça Alentejana. No caso dos animais PT796177826 e PT317033191 o valor da probabilidade do genótipo ficou pouco acima dos 0,95, razão pela qual não aparecem listados como animais cruzados na Tabela 8, mas detectou-se influência das raças Frísia e Charolesa. Relativamente aos animais PT317033073 e PT793357726, a probabilidade do genótipo na raça Ramo Grande foi da ordem dos 98% e 65% em função de definir, ou não, *a priori* a população de origem, respectivamente.

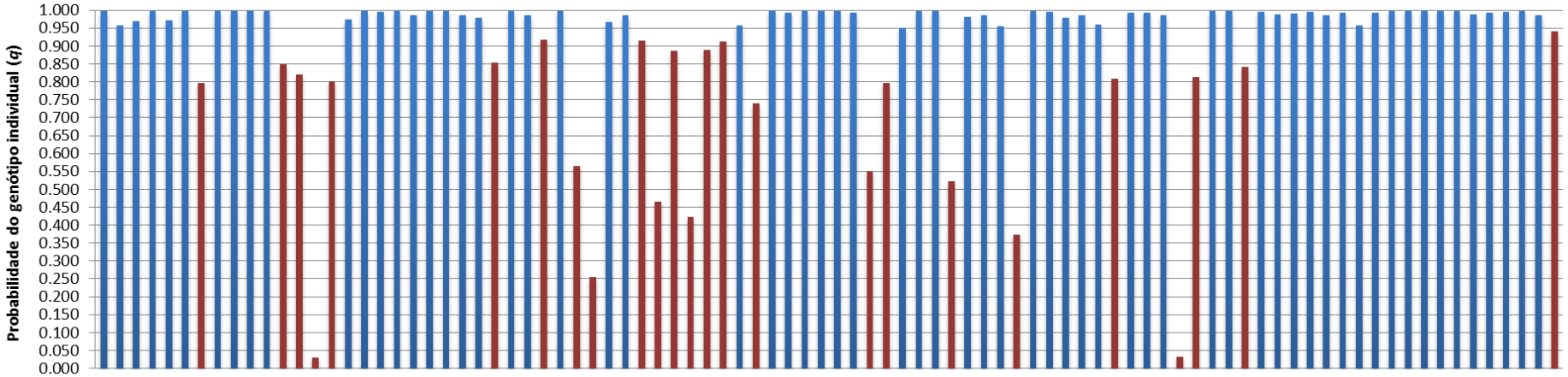


Figura 12. Representação gráfica das probabilidades dos genótipos individuais (*q*) na raça Ramo Grande, calculadas com o programa Structure com informação *a priori* sobre a população de origem. Os 25 animais da raça Ramo Grande classificados como cruzados e que registaram uma probabilidade do genótipo individual inferior a 0,95 na população de origem estão destacados a vermelho.

A dificuldade em inferir a origem do cruzamento pode relacionar-se com o facto de estarem envolvidas várias raças, até porque a raça Ramo Grande tem origem nas congéneres autóctones do continente Português, e de essa influência poder ter ocorrido há várias gerações. Por exemplo, no caso do animal PT293305895, registou-se uma influência significativa da raça Minhota que, por sua vez, tem uma história confirmada de cruzamento com a raça comercial Gelbvieh de origem Alemã. No entanto e na análise com informação sobre as populações de origem, a probabilidade do genótipo deste animal na raça Ramo Grande foi de ~98% o que parece indicar que esta influência ocorreu há várias gerações.

IV. Conclusões

Este relatório constitui um instrumento útil para a definição de um programa específico de maneio e conservação da raça bovina Ramo Grande. A amostragem realizada foi relativamente ampla e representativa da diversidade genética da raça. Assim, foi possível determinar com precisão os indíces de variabilidade genética da raça Ramo Grande, nomeadamente a heterozigotia e a diversidade alélica. No entanto, é necessário considerar um número mais representativo de animais inscritos no LG para determinar de forma fiável os coeficientes de parentesco nas populações de cada ilha e ao nível das várias explorações. Esta informação é necessária para minimizar o grau de parentesco entre animais e controlar os níveis de consanguinidade da raça.

Os resultados da análise da estrutura genética e do grau de cruzamento são particularmente úteis para a gestão do LG da raça Ramo Grande, pois, é impreterível identificar animais com influência da raça Frísia e excluí-los do programa de reprodução. Os animais da raça Ramo Grande com evidências de cruzamento variaram entre os 39 e os 18% nas populações amostradas em 2004 e 2013, respectivamente, com uma média global de ~28%. Estes animais denotam evidência de cruzamento com raças comerciais importadas e contêm, pelo menos, 10% do seu genótipo atribuído a outra raça. A maior influência é a da raça Frísia, mas também da Limousine e Charolesa, onde se observaram probabilidades significativas de ascendencia até à 2ª geração.

As principais recomendações no que respeita à gestão do património genético da raça bovina Ramo Grande são as seguintes:

- ✓ Excluir do programa de reprodução da raça Ramo Grande os 25 animais listados na Tabela 8 e na Figura 12, bem como os seus descendentes directos, que derivam de cruzamentos entre raças (nomeadamente raças comerciais importadas).

- ✓ Genotipar todos os touros destinados a planos de reprodução por inseminação artificial com este painel de 25 microssatélites, para testar a compatibilidade com a raça Ramo Grande e diminuir a probabilidade de perpetuar uma eventual influência de outras raças, como por exemplo da raça Frísia.

- ✓ Genotipar de forma sistemática todos os animais adultos que vierem a ser registados no LG da raça Ramo Grande com um painel de microssatélites recomendado para testes de paternidade (por exemplo, 17 dos marcadores incluídos neste estudo), com o objectivo de determinar com precisão o grau de parentesco entre animais e os coeficientes de consanguinidade ao nível das várias explorações e ilhas.

Estes resultados poderão ser comparados com os da análise clássica de genealogias, com a vantagem que os marcadores moleculares captam sinais ancestrais da história evolutiva da raça.

- ✓ Analisar com mais detalhe as relações genéticas dos animais da raça Ramo Grande, entre e dentro de cada ilha, utilizando a informação resultante dos testes de paternidade previstos no *item* anterior.

- ✓ Recrutar animais de explorações diferenciadas, para definir acasalamentos programados, com o objectivo de maximizar a diversidade genética e minimizar o grau de parentesco entre animais da raça Ramo Grande. Esta análise deverá ser feita com base em dados moleculares e utilizando software adequado para o efeito.

V. Referências bibliográficas

Ajmone Marsan, P.; Fernando Garcia, F.; Lenstra, J. A.; Consortium, T. G. 2010. On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. *Evol Anthropol,* 19: 148-157.

Belkhir, K.; Borsa, P.; Chikhi, L.; Raufaste, N.; Bonhomme, F. 1996-2004. Genetix: Logiciel sous windows tm pour la génétique des populations. 4.02 ed. Montpellier, France, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS, Université de Montpellier II.

Dgav. 2013. *Raças autóctones portuguesas*. Lisboa, Direcção Geral de Agricultura e Veterinária

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol. Ecol.,* 14 (8): 2611-20.

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics,* 164 (4): 1567-87.

Gama, L. T.; Carolino, N.; Costa, M. S.; Matos, C. P. 2004. Country report on farm animal genetic resources. Vale de Santarém, Portugal, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Ginja, C.; Telo Da Gama, L.; Penedo, M. C. 2010. Analysis of str markers reveals high genetic structure in portuguese native cattle. *J. Hered.,* 101 (2): 201-10.

Goudet, J. 2001. Fstat a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. 2.9.3 ed.

Groeneveld, L. F.; Lenstra, J. A.; Eding, H.; Toro, M. A.; Scherf, B.; Pilling, D.; Negrini, R.; Finlay, E. K.; Jianlin, H.; Groeneveld, E.; Weigend, S. 2010. Genetic diversity in farm animals--a review. *Anim Genet,* 41 Suppl 1: 6-31.

Guo, S. W.; Thompson, E. A. 1992. Performing the exact test of hardy-weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics,* 48 (2): 361-72.

Gutierrez, J. P.; Royo, L. J.; Alvarez, I.; Goyache, F. 2005. Molkin v2.0: A computer program for genetic analysis of populations using molecular coancestry information. *Journal of Heredity,* 96 (6): 718-721.

Huson, D. H.; Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution,* 23 (2): 254-67.

Langella, O. 1999-2002. Populations 1.2.28. 1.2.28 ed. France, CNRS UPR9034.

Nei, M.; Tajima, F.; Tateno, Y. 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. Ii. Gene frequency data. *Journal Molecular Evolution,* 19 (2): 153-70.

Peakall, R.; Smouse, P. E. 2006, 2012. Genalex 6: Genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes,* 6: 288-295.

Pritchard, J. K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics,* 155 (2): 945-59.

Ralo, A.; Guerreiro, A. 1981. Racas exoticas e cruzamentos. *In*: Rodrigos, A. (Ed.) *Bovinos em portugal.* Lisboa, Direccao Geral dos Servicos Veterinarios.

Raymond, M.; Rousset, F. 2003. Genepop (version 3.4). Update of raymond, m. & rousset, f. (1995) genepop: Population genetics software for exact tests and ecumenicism 3.4 ed.

Weir, B. S.; Cockerham, C. C. 1984. Estimating f-statistics for the analysis of population structure. *Evolution,* 38: 1358-1370.