

Caracterização genética das raças ovinas Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela: DNA nuclear e mitocondrial

Generic characterization of Bordaleira de Entre Douro e Minho and Serra da Estrela sheep breeds: nuclear and mitochondrial DNA

C. Oliveira¹, B. Gutiérrez-Gil², S. Pedrosa², E. Barbosa¹, R. Dantas³, J. V. Leite³, N. V. Brito^{1*}, J. J. Arranz², Y. Bayón²

¹Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Escola Superior Agrária de Ponte de Lima, Refóios 4990 Ponte de Lima, Portugal.

²Departamento de Producción Animal, Universidad de León E-24071 León, España.

³AMIBA - Associação dos Criadores Bovinos da Raça Barrosã e Ovinos Bordaleiros, 4800-875 São Torcato, Guimarães, Portugal.

Resumo: A caracterização genética das raças ovinas autóctones portuguesas Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela é estudada. A raça ovina espanhola Churra é, igualmente, incluída no estudo como raça de referência. A análise genética realizou-se quer em DNA nuclear (utilizando 19 marcadores microsátélites de DNA) quer em 680 pb da sequência controlo em DNA mitocondrial. Obtiveram-se, em microsátélites, parâmetros de variabilidade genética como frequência alélica e heterozigotias que indicam um nível considerável de variação, nas raças ovinas estudadas. Distâncias genéticas superiores foram demonstradas na raça espanhola Churra, apesar da distância estimada entre a Bordaleira de Entre Douro e Minho e a Serra da Estrela indicar uma diferenciação não negligenciável entre as raças nacionais. A análise de haplótipos de mtDNA revelou, no seu conjunto, um nível considerável de variação. Os resultados observados na Bordaleira de Entre Douro e Minho sugerem, comparativamente com as outras raças estudadas, uma superior uniformidade da herança genética materna, em contraponto às informações provenientes dos resultados obtidos nos marcadores microsátélites DNA nuclear.

Palavras-chave: Raças ovinas Portuguesas, caracterização genética, marcadores microsátélites DNA, DNA mitocondrial.

Summary: A genetic characterization of Bordaleira de Entre Douro e Minho and Serra da Estrela Portuguese sheep breeds is presented. Spanish Churra sheep is also included in the study as a reference breed. Genetic analysis was performed both on nuclear DNA (using 19 microsatellite DNA markers) and on 680 pb from the control sequence at the mitochondrial DNA. Parameters of genetic variability obtained at microsatellites, such as allele frequencies and heterozygosities indicated a considerable level of variation at the sheep breeds studied. Genetic distances revealed the highest value with Spanish Churra, but that obtained between Bordaleira de Entre Douro e Minho and Serra da Estrela indicated a non-disregardable differentiation between both Portuguese sheep. Analysis of mtDNA haplotypes also revealed in general a considerable level of variation. Results at mtDNA in Bordaleira de Entre Douro e Minho suggested a larger uniformity of genetic maternal inheritance when compared with the other breeds studied in contrast with results obtained from nuclear microsatellite data.

Key words: Portuguese sheep breeds, genetic characterization, DNA microsatellite markers, mitochondrial DNA.

*Correspondência: nunobrito@esapl.pt

Introdução

As raças ovinas Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela são duas importantes raças autóctones, localizadas no Norte-Centro de Portugal, representantes de diferentes aptidões e sistemas produtivos. Manifesta-se, actualmente, um especial interesse no conhecimento dos seus recursos genéticos, na análise da sua biodiversidade, na preservação sócio-ecológica dos seus sistemas produtivos, enquadrados num conceito de “agricultura sustentável”, baseado numa filosofia holística, de interligação entre plantas e animais e uma relação muito estreita com a terra, água e ar.

Perde-se na memória do tempo a existência da raça ovina Serra da Estrela (BoSE), com origens muito remotas, procedente de forma selvagens (Carneiro das turfeiras – *Ovis aries palustris*; Mufião Europeu – *Ovis musimon*; e Mufião Asiático – *Ovis aries orientalis*) (SPOC, 2002). O efectivo actual dos ovinos da Serra da Estrela (Figura 1), próximo dos 115.000 animais dos quais 13.000 inscritos no Livro de Adultos, fruto de uma importante redução demográfica, apresenta duas variedades distintas: branca e preta. Apesar da variedade *branca* ser a mais abundante, a variedade *preta* é considerada mais rústica (DGP, 1991).

Morfológicamente os indivíduos desta raça apresentam estatura mediana, cornos em ambos os sexos, de forma espiralada, possuindo lã do tipo cruzada fina e pouco ondulada. O peso vivo atinge aproximadamente 65 kg nos machos e 42 kg nas fêmeas. Caracterizam-se na sua componente produtiva essencialmente como de aptidão leiteira (SPOC, 2002). É uma raça principalmente explorada em regime extensivo, adaptada às condições geoclimáticas da região.

A raça autóctone Bordaleira de Entre Douro e Minho (BEDM) (Figura 2), tal como outras raças ovinas do Norte de Portugal é descendente dos troncos Ibéricos *Ovis aries iberica* e *ligeriensis* que teriam povoado inicialmente a região peninsular (região Galaico-Do-



Figura 1 - Efectivo ovino de Raça Serra da Estrela (BoSE): variedade branca. Fotografia Gabriela Candeias.



Figura 2 - Efectivo ovino de Raça Bordaleira de Entre Douro e Minho (BEDM). Fotografia Joaquim Cerqueira

riense). Apresenta uma redução notável do seu efectivo, pois decresceu de cerca de 242.000 animais no início do século XX para os valores presentes de 4.700 ovinos inscritos no Registo Zootécnico em 2002 (DGP, 1991 e AMIBA, 2002). A existência de duas variedades caracteriza esta raça que são exploradas em sistemas e zonas distintas: a variedade *várzea* ou *comum*, com maior diversidade de caracteres e a variedade *churra* ou de *montanha*, bastante mais homogénea com rebanhos característicos de dimensão apreciável (Leite e Dantas, 2002).

Relativamente aos aspectos morfológicos, os ovinos da Bordaleira de Entre Douro e Minho apresentam pequeno porte, velo denso, geralmente de cor branca, cornos raros nas fêmeas mas frequentes nos machos. Possui lã composta por fibras lanares do tipo cruzado a churro. O peso oscila consoante a variedade em questão: variedade *churra* (macho: 40 kg e fêmeas: 25 kg), variedade *várzea* (macho: 50 kg e fêmeas: 40 kg). A sua aptidão e sistema de produção são vocacionados, apenas, para a produção de carne (Leite e Dantas, 2002).

A caracterização genética das populações autóctones revela actualmente especial interesse e constitui, hoje, um pilar em políticas de melhoramento animal e desenvolvimento rural. Através da análise genética é possível estimar os níveis de variabilidade de uma população, suas características diferenciais com outras, mais ou menos, próximas, bem como analisar as relações filogenéticas entre as mesmas (Avisé *et al.*, 1987; Harrison, 1989).

Os marcadores de tipo microsatélite manifestam-se de elevada utilidade para a caracterização genética das populações dada a sua ampla distribuição no genoma, elevada variação, herança codominante e fácil identificação alélica. São, ainda, de grande precisão para estimar o grau de variabilidade intra e inter-populacional e utilizaram-se de forma generalizada em diferentes espécies animais e em particular em ovinos (Buchanan *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995; Arranz *et al.*, 1998 e Arranz *et al.*, 2001a).

Por outro lado, o DNA mitocondrial (mtDNA) fornece informação complementar à transmitida pelo DNA

nuclear e apresenta características peculiares que o diferenciam daquele. As mais importantes referem-se ao seu tipo de herança exclusivamente materna, à sua dotação haplóide que implica ausência de fenómenos de recombinação e uma maior taxa de evolução (Brown *et al.*, 1979). Ainda que não sejam frequentes os estudos genéticos realizados na espécie ovina baseados na análise da variabilidade do mtDNA, poder-se-ão referir os trabalhos de Wood e Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998).

O objectivo do presente estudo é contribuir para a caracterização genética das raças ovinas portuguesas referidas utilizando informação obtida tanto do DNA nuclear como do mtDNA, incluindo-se, ainda, uma raça exótica como referência.

Material e métodos

Animais

Realizou-se uma amostragem aleatória a partir de animais não aparentados, em rebanhos localizados no solar das raças ovinas portuguesas Bordaleira de Entre Douro e Minho (66 animais analisados provenientes de 15 rebanhos), com uma amostra equilibrada de ambas as variedades (*várzea* e *churra*) e Serra da Estrela (52 animais analisados provenientes de 11 rebanhos), maioritariamente da variedade branca. Analisou-se, ainda, uma amostra de animais da raça espanhola Churra (50 animais).

Metodología laboratorial

Isolou-se DNA genómico a partir de sangue, utilizando o procedimento conhecido como “salting out” (Miller *et al.*, 1988). Os marcadores nucleares seleccionados foram 19 loci microsatélites localizados em diferentes cromossomas (Quadro 1). Realizaram-se várias reacções de amplificação conjunta ou “multiplex” e os fragmentos amplificados combinaram-se em duas corridas electroforéticas utilizando um sequenciador automático ABIPRISM 377. A identificação alélica

estimou-se mediante os programas “Genescan” e “Genotyper”.

No estudo do DNA mitocondrial utilizaram-se 19 amostras de cada uma das duas raças portuguesas (que no caso da Bordaleira de Entre Douro e Minho incluiu indivíduos de ambas as variedades) e 30 da raça Churra espanhola. Selecionou-se uma sequência de 680 pares de bases (pb) da denominada região controlo e amplificou-se mediante “primers” específicos. O fragmento amplificado foi submetido a um processo de sequenciação cíclica dupla, já que se realizou em ambos os sentidos para reduzir o erro. As sequências resultantes analisaram-se utilizando o programa CLUSTAL-W (Thompson *et al.*, 1994) e obteve-se a sequência consenso, procedendo-se, finalmente, à análise dos haplótipos.

Metodología estatística

No caso dos loci microsatélites estimaram-se, mediante contagem directa, as frequências alélicas e realizaram-se os contrastes para comprovar a sua adequação ao equilíbrio Hardy-Weinberg (H-W), mediante o método proposto para este tipo de marcadores por Guo e Thompson (1992), utilizando o programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995). Realizou-se a contagem do número de alelos por locus, bem como o número de alelos presentes apenas numa das raças ou “alelos

específicos”. Estimou-se a heterozigotia observada bem como a diversidade génica (esta última assumindo equilíbrio H-W) utilizando o programa MICROSAT (Minch *et al.*, 1996). Foram, ainda, calculados os seguintes parâmetros de distância genéticas entre populações: D_s de Nei *et al.* (1972) e a distância de Nei (1978) (Nei, 1987). Mediante o algoritmo UPGMA e utilizando o programa PHYLIP 3.55 (Felsenstein, 1995) obtiveram-se os correspondentes dendrogramas.

A partir dos haplótipos de DNA mitocondrial, calculou-se uma matriz de distâncias “pairwise”, utilizando como algoritmo a distância nucleotídica “p”, seguindo Nei e Kumar (2000). A partir destes dados e seguindo a metodologia “Neighbor-joining” (NJ), construiu-se a árvore filogenética correspondente, utilizando o programa MEGA 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Resultados e discussão

No Quadro 1 apresenta-se para cada locus, o número de alelos identificados, o valor da heterozigotia observada (H_{obs}) e o número de alelos que se detectaram de forma exclusiva em cada uma das raças e que denominamos alelos específicos.

No conjunto dos 19 microsatélites analisados identificou-se um total de 180 alelos na raça Bordaleira de Entre Douro e Minho e de 162 na Serra da Estrela.

Quadro 1 – Número de alelos em cada locus, heterozigotia observada (H_{obs}) e número de alelos específicos nas raças Bordaleira de Entre Douro e Minho e Serra da Estrela.

Marcador	Localização cromossómica	Bordaleira de Entre Douro e Minho			Serra da Estrela		
		Nº de alelos	Alelos específicos	H_{obs}	Nº de alelos	Alelos específicos	H_{obs}
BM2504	OAR8	8	1	0,74	8	1	0,56
BM3413	OAR2	8	-	0,70	10	2	0,65
BM6526	OAR26	9	3	0,73	7	1	0,80
BM8125	OAR17	9	3	0,69	6	1	0,71
BMS1290	OAR1	9	3	0,60	7	1	0,51
BMS522	OAR5	10	4	0,64	6	-	0,63
CSSM008	OAR11	5	1	0,60	5	1	0,60
CSSM015	OAR11	4	1	0,71	4	1	0,60
CSSM031	OAR23	18	5	0,75	17	4	0,83
CSSM043	OAR26	16	5	0,87	11	-	0,83
ILSTS005	OAR7	8	-	0,46	10	2	0,69
ILSTS0011	OAR9	8	-	0,63	9	1	0,82
LSCV29	OAR14	9	2	0,72	8	1	0,65
MCM527	OAR5	8	2	0,77	7	1	0,73
MCM53	OAR6	13	3	0,75	8	-	0,74
OARCP23	OAR16	7	1	0,47	9	3	0,65
RBP3	OAR25	11	-	0,60	11	-	0,78
RM006	OAR5	9	4	0,57	6	1	0,71
SPS115	OAR15	11	1	0,81	13	3	0,91

Quadro 2 – Número médio de alelos por locus e valores da heterozigotia observada e esperada (e erro padrão) nas raças Portuguesas Bordaleira de Entre Douro e Minho, Serra da Estrela e na raça Churra Espanhola.

	Numero médio de alelos por locus	Heterozigotia média observada	Heterozigotia média esperada
Bordaleira de Entre Douro e Minho	9,4	0,68±0,11	0,74±0,08
Serra da Estrela	8,6	0,71±0,10	0,72±0,09
Churra Espanhola	8,4	0,70±0,11	0,74±0,08

Estes marcadores apresentaram um amplo intervalo, relativamente ao seu nível de variabilidade. Assim, o número de alelos oscilou entre 4 e 18 na raça Bordaleira de Entre Douro e Minho e entre 4 e 17 na Serra da Estrela, correspondendo o mínimo, em ambos casos, ao marcador CSSM015 e o máximo ao locus CSSM031.

Por outro lado, para a heterozigotia obtida por contagem directa, o valor mais reduzido estimou-se para os marcadores ILSTS005 na Bordaleira de Entre Douro e Minho ($H_{obs}=0,46$) e BMS1290 na Serra da Estrela ($H_{obs}=0,51$). A heterozigotia mais elevada correspondeu, em ambas as raças, ao marcador SPS115 ($H_{obs}=0,81$ e $H_{obs}=0,91$, respectivamente).

Os parâmetros referidos permitem, pois, comprovar que a elevada variabilidade que se demonstrou nos loci microsatélites de outras raças ovinas (Buchanan *et al.*, 1994; Díez Tascón *et al.*, 2000; Arranz *et al.*, 2001b), também se detecta nestas duas raças ovinas portuguesas. Será de destacar, por exemplo, que em ambas as raças, dos 19 loci analisados 10 apresentaram uma taxa de heterozigotia igual ou superior a 0,70.

Outro aspecto que se constata no Quadro 1, é o elevado número de alelos que foram identificados apenas numa das duas raças e que se torna indicativo das diferenças genéticas entre ambas. Na raça Bordaleira de Entre Douro e Minho de um total de 180 alelos, 39 foram alelos específicos enquanto que para a Serra da Estrela observaram-se 24 alelos específicos num total de 162 alelos identificados.

No Quadro 2 incluem-se alguns parâmetros promédios representativos do nível de variabilidade genética de cada raça, como o número médio de alelos por locus e as heterozigotias observada e esperada, esta última estimada no pressuposto da existência do equilíbrio Hardy-Weinberg. Na mesma tabela apresenta-se, ainda, os valores correspondentes da raça Churra espanhola, utilizada como referência.

Será de destacar, para as raças Portuguesas analisadas, que os valores promédios de heterozigotia tanto

observada como esperada, assumindo equilíbrio H-W, foram elevados, atingindo níveis próximos aos estimados na raça Churra Espanhola, que já se tinha revelado como uma raça de elevada variabilidade genética (Arranz *et al.*, 1998; Arranz *et al.*, 2001a). Ao comparar-se o número médio de alelos por locus entre raças, constatou-se uma proximidade entre a raça Churra (8,4) e a raça Serra da Estrela (8,6), enquanto que a Bordaleira de Entre Douro e Minho apresentou um número superior (9,4), o que novamente indica o elevado grau de variabilidade genética de ambas as raças portuguesas, particularmente desta última.

O Quadro 2 reflecte, ainda, para a raça Serra da Estrela um valor médio similar de heterozigotia observada e esperada ($H_{obs}=0,71$ vs $H_{esp}=0,72$). Um comportamento distinto apresentou a raça Bordaleira de Entre Douro e Minho, já que a heterozigotia observada ($H_{obs}=0,68$) foi inferior à esperada ($H_{esp}=0,74$). Esta diferença entre raças também se detectou ao efectuar os contrastes do equilíbrio Hardy-Weinberg para cada um dos marcadores. Tanto na raça Churra como na Serra da Estrela, apenas um microsatélite, em cada situação, mostrou um desvio significativo do equilíbrio H-W ($P<0,05$), enquanto que na Bordaleira de Entre Douro e Minho foram quatro os loci que se desviaram do equilíbrio.

Os resultados descritos nesta última raça podem ser atribuídos, pelo menos em parte, a um efeito de subdivisão populacional, o que se encontra em concordância com a existência das duas variedades descritas desta raça, que neste estudo se analisaram de forma conjunta. Um dos efeitos da existência de sub-populações diferenciadas numa população conjunta é precisamente a estima de uma heterozigotia observada inferior à correspondente ao equilíbrio H-W.

A raça Churra foi utilizada, igualmente, como referência para o cálculo das distâncias genéticas e os resultados obtidos apresentam-se no Quadro 3. Tal como se esperaria, tanto na distância de Nei (1972), ou D_s , como para a de Nei (1978), o valor mais re-

Quadro 3 – Distâncias genéticas entre as três raças: distância de Nei (1972) (D_s) sobre a diagonal e distância de Nei (1978) sob a diagonal.

	Bordaleira de Entre Douro e Minho	Serra da Estrela	Churra Espanhola
Bordaleira de Entre Douro e Minho		0,086	0,097
Serra da Estrela	0,059		0,123
Churra Espanhola	0,069	0,093	

Quadro 4 – Na parte superior: valor mínimo, máximo e promédio (e seu erro padrão) das distâncias “p” estimadas para cada par de indivíduos em cada uma das raças. Na parte inferior: valores de distância entre raças.

	Mínimo	Máximo	Promédio
Bordaleira de Entre Douro e Minho	0,00	0,0103	0,0042±0,0011
Serra da Estrela	0,00	0,0132	0,0068±0,0014
Churra Espanhola	0,00	0,0338	0,0081±0,0016

	Bordaleira de Entre Douro e Minho	Serra da Estrela
Serra da Estrela	0,0057±0,0011	
Churra Espanhola	0,0064±0,0012	0,0077±0,0013

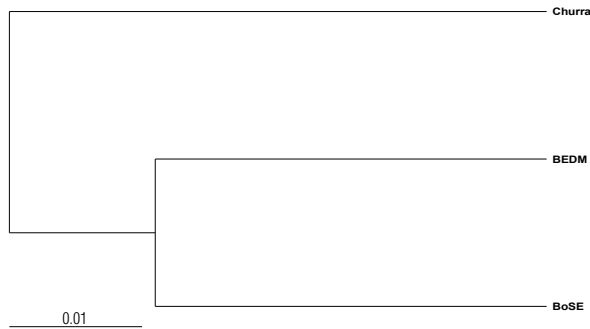


Figura 3 - Dendrograma obtido com base na distância de Nei (D_s), pelo método UPGMA.

duzido correspondeu às duas raças portuguesas. Todavia, os valores estimados com a Churra espanhola não foram muito superiores, especialmente para o caso da Bordaleira de Entre Douro e Minho. Estes resultados indicam, pois, que entre estas duas raças portuguesas existe um nível de diferenciação genética considerável e não muito afastado do correspondente a raças filogeneticamente mais afastadas. Os dendrogramas construídos a partir de ambas as distâncias genéticas apresentaram uma topologia semelhante, pelo que apenas se demonstra o obtido a partir da distância D_s (Figura 3). À semelhança do que seria de esperar, a raça Churra espanhola aparece mais afastada, relativamente às raças portuguesas analisadas.

A análise do DNA mitocondrial, nas duas raças ovinas portuguesas, demonstrou, em ambas as situações, e comparando as sequências obtidas em cada indivíduo, a existência de um elevado grau de variabilidade. No total, detectaram-se 33 lugares polimórficos e todos eles resultaram ser mutações de tipo SNP (“single nucleotide polymorphism”). No entanto, entre os SNPs encontrados apenas um foi uma “transversão” correspondendo os restantes a “transições”. Estes resultados são coincidentes com os obtidos noutras raças e espécies animais em que o tipo mais frequente foi, geralmente, do tipo “transição”. Poder-se-à, nomeadamente, citar, para o caso concreto de estudos em ovinos, trabalhos de autores como Wood e Phua (1996) e Hiendleder *et al.* (1998).

Deverá referir-se, igualmente, que dos 33 SNPs detectados 14 corresponderam ao que se denomina “singletons”, ou seja, acontecimentos que unicamente se identificam num indivíduo, fenómeno, este, encontrado nas duas raças.

Na análise independente de cada uma das raças, o número de mutações SNP identificadas foi de 17 na raça Bordaleira de Entre Douro e Minho e de 27 na Serra da Estrela, correspondendo, em cada situação, a um número de acontecimentos únicos ou “singletons” de 10 e 14, respectivamente. Esta menor variabilidade a nível do mtDNA na raça Bordaleira de Entre Douro e Minho, relativamente à Serra da Estrela, parece, eventualmente, divergir dos resultados referidos a partir dos marcadores de tipo microsatélite.

Estimou-se, a partir dos haplótipos individuais, a determinação das distâncias por pares de indivíduos ou

distâncias “pairwise”, cujos resultados se apresentam no Quadro 4. Incluem-se, neste, os valores mínimos e máximos de distâncias estimadas em cada uma das raças, bem como o promédio para cada raça. Para esta determinação, foram igualmente incluídos, como referência, os animais da raça Churra espanhola.

Dentro de cada raça estudada, o valor mínimo de distância correspondeu a pares de indivíduos em que o valor “ p ” obtido foi zero. Os valores máximos determinaram-se, por ordem decrescente, nas raças Churra (0,0338), Serra da Estrela (0,0132) e Bordaleira de Entre Douro e Minho (0,0103). Finalmente, o valor promédio de distâncias “pairwise” seguiu, igualmente, a mesma sequência: Churra (0,0081), Serra da Estrela (0,0068) e Bordaleira de Entre Douro e Minho (0,0042).

Os resultados obtidos sugerem, pois, no seu conjunto, uma maior uniformidade na linha hereditária materna da raça Bordaleira de Entre Douro e Minho, relativamente às outras raças ovinas analisadas, em clara contraposição com os resultados derivados do DNA nuclear. Estes dados pressupõem que a elevada variabilidade genética desta raça tenha como base, fundamentalmente, cruzamentos com machos de diversas origens, enquanto que a linha materna se manteve com um grau de uniformidade, inclusivamente, superior a outras raças.

No Quadro 4 representa-se, igualmente, os valores de distância estimados entre as três raças analisadas. A não existência de diferenças muito nítidas, ao comparar estes valores de distância inter-racial com as distâncias médias dentro de cada raça, foi constatada. Nalgumas situações, inclusivamente, o valor da distância intra-racial superou os inter-raciais, como no exemplo mais flagrante da raça Churra. Nas duas raças ovinas portuguesas, a distância inter-racial (0,0057) foi um pouco superior à intra-racial da Bordaleira de Entre Douro e Minho mas inferior à da Serra da Estrela. Como tal,

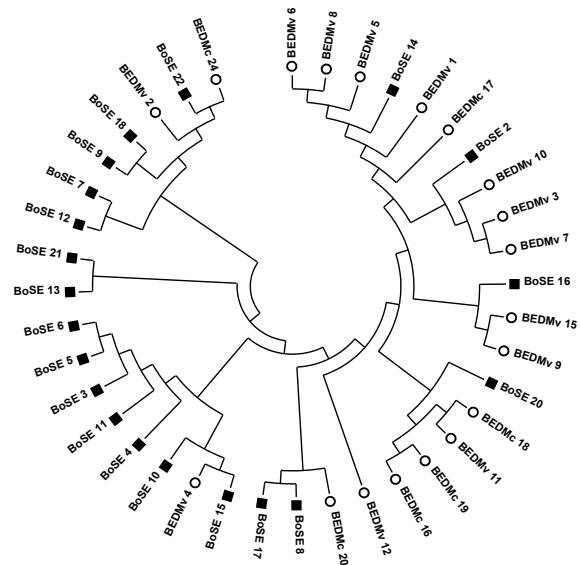


Figura 4 - Árvore de haplótipos, pelo método NJ, baseado em 680 pb de mtDNA.

estes dados não permitem estabelecer, objectivamente, uma relação clara entre as linhas maternas destas raças.

Finalmente, na Figura 4 representa-se o dendrograma construído a partir dos dados individuais dos haplótipos do mtDNA, nas duas raças objecto deste estudo. Esta árvore demonstra uma certa tendência dos haplótipos da mesma raça a um agrupamento conjunto, todavia não cumprido em várias situações. Estes resultados coincidem com os obtidos por outros autores, em estudos que incluíam, também, raças ovinas relativamente próximas (Pedrosa et al., 2002; Tapio et al., 2002).

Indica-se, ainda, nesta Figura, para o caso da raça Bordaleira de Entre Douro e Minho, os indivíduos que pertencem a cada uma das variedades (BEDMv e BEDMc). Como se pode observar, não se constatou nenhuma separação nítida entre ambos os tipos, no que se refere à dotação genética de origem exclusivamente materna, já que os seus haplótipos aparecem intercalados na Figura. Concomitantemente, os nossos dados não permitem relacionar as divergências genéticas entre as variedades desta raça com linhas maternas claramente diferenciadas e sugerem que estas diferenças poderiam ter, fundamentalmente, origem na via paterna.

Esta caracterização genética das raças ovinas Serra da Estrela e Bordaleira de Entre Douro e Minho permitiu, assim, constatar uma elevada variabilidade genética, observada dentro da raça e entre raças, a eventual presença, na raça BEDM, de subpopulações, provavelmente correspondentes às suas variedades e uma maior uniformidade, igualmente nesta raça, de mtDNA, sugerindo uma linha mãe bem definida e uma política de cruzamentos não dirigidos ao longo do tempo.

Estes estudos permitirão, pois, avaliar a utilidade das análises baseadas, simultaneamente, na dotação nuclear e mitocondrial para a caracterização da biodiversidade das populações, contribuir para a determinação das relações entre populações, compreender evoluções e variações biológicas, enfim, prosseguir na manutenção de um recurso biológico insubstituível: as raças pecuárias autóctones.

Bibliografia

- AMIBA (2002). Associação dos Criadores da Raça Barrosã. A *Bordaleira de Entre Douro e Minho*. Ed. AMIBA. Braga
- Arranz, J.J., Bayon, Y., San Primitivo, F. (1998). Genetic relationships among Spanish sheep using microsatellites. *Anim Genet.* 29, 435-440.
- Arranz, J.J., Bayón, Y. e San Primitivo, F. (2001a). Differentiation among Spanish sheep breeds using microsatellites. *Genet. Sel. Evol.*, 33, 529-542.
- Arranz, J.J., Bayon, Y., San Primitivo, F. (2001b). Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Rumin. Res.* 39, 3-10.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R.B., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 18, 489-522.
- Brown, W.M., George, M.Jr., Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 76, 1967-1971.
- Buchanan, F.C., Adams, L.J., Littlejohn, R.P., Maddox, J.F. e Crawford, A.M. (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, 22, 397-403.
- DGP (1991). Direcção Geral de Pecuária. *Recursos Genéticos – Raças Autóctones: Espécies Ovina e Caprina*. Série «Divulgação» (Revista Ovelha) da Associação de Criadores de Ovinos do Sul, 25-35 e 149-159.
- Diez-Tascon, C., Littlejohn, R.P., Almeida P.A., Crawford, A.M. (2000). Genetic variation within the Merino sheep breed: analysis of closely related populations using microsatellites. *Anim Genet.* 31, 243-251.
- Felsenstein, J., 1995. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package)*. Univ. Washington. USA
- Forbes, S.H., Hogg, J.T., Buchanan, F.C., Crawford, A.M. e Allendorf, F.W. (1995). Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. *Mol. Biol. Evol.*, 12 (6), 1106-1113.
- Guo, S.W. e Thompson, E.A. (1992). Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* 48, 361-372.
- Harrison, R.G., (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population biology and evolutionary biology. *Trends Ecol Evol.*, 3, 535-546.
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., Janke, A. (1998). The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *J Mol Evol.*, 47, 441-448.
- Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I.B., Nei M. (2001). *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics. Analysis software*, Arizona State University, Tempe, Arizona.
- Leite, J.V. e Dantas, R. (2002). *Raça Ovina Bordaleira de Entre Douro e Minho*. Ed. AMIBA. Braga. pp 1-8
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesy, H.F. (1988). A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleotide cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
- Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavalli-Sforza, L.L. (1996). MICROSAT (version 1.5b): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. <http://hpgl.stanford.edu/projects/microsat/programs/msat15.c>.
- Nei, M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. Oxford UK. ISBN: 0195135849.
- Pedrosa, S., Arranz, J.J., Bayón, Y., San Primitivo, F. (2002). Analysis of the variability at mtDNA in three indigenous Spanish sheep. *Proceedings of the XXVIII International Conference on Animal Genetics : ISAG*. Göttingen, Germany, 124.
- Raymond, M. e Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86, 239.
- SPOC (2002). Sociedade Portuguesa de Ovinicultura e Caprinicultura. *Recursos Genéticos – ovinos*. http://www.ovinosecaprinos.com/recursos_f.html.
- Tapio, M., Grigaliunaite, I., Holm, L.E., Jeppson, S., Kantanen, J., Miceikiene, I., Olsaker, I. Viinalass, H., Eythorsdottir, E. (2002). Mitochondrial Differentiation in Northern European Sheep. *Proceedings of 7th World Congress on Genetics Applied To Livestock Production* 33, 621-624.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994). *Nucleic Acids Research*. 22, 4673-80.
- Wood, N.J., Phua, S.H. (1996). Variation in the control region sequence of the sheep mitochondrial genome. *Anim Genet.*, 27, 25-33.