



**Universidade dos Açores  
Departamento de Ciências Agrárias  
Pólo de Angra do Heroísmo**

# **Caracterização Molecular do Cão Barbado da Terceira**

**Lisandra Raquel Vieira Ferraz Monteiro**

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo

2010





**Universidade dos Açores  
Departamento de Ciências Agrárias  
Pólo de Angra do Heroísmo**

# **Caracterização Molecular do Cão Barbado da Terceira**

**Lisandra Raquel Vieira Ferraz Monteiro**

**Orientador**

Professor Doutor Artur da Câmara Machado

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo

2010

**Aos meus Pais,**

**ao meu Marido**

**e à minha Filha.**

## **Agradecimentos**

Finalizando este trabalho, gostaria de manifestar o meu sincero e reconhecido agradecimento a algumas pessoas que passo a citar:

Ao meu orientador Professor Doutor Artur da Câmara Machado, pelos conselhos, pelas críticas construtivas, por todos os ensinamentos e pelo acolhimento sempre amigável no Centro de Biotecnologia dos Açores.

À Engenheira Susana Lopes, pela sua dedicação, colaboração, apoio e companheirismo, bem como todos os seus ensinamentos. Sem ela, provavelmente este trabalho não existia.

A toda a restante equipa do Centro de Biotecnologia dos Açores por todo o apoio prestado, principalmente à Carolina, ao Cláudio e à Sara Rocha.

À Associação Açoriana de Criadores do Cão Barbado da Ilha Terceira (AACCBIT), pela cedência das amostras que integram este trabalho.

Aos meus pais, que sempre me apoiaram e cuidaram da minha filha nos momentos mais difíceis.

Finalmente, ao meu marido e à minha filha Catarina, pela paciência, apoio e carinho que me deram.

# Índice

<b>Resumo</b> -----	<b>7</b>
<b>Abstract</b> -----	<b>8</b>
<b>Abreviaturas utilizadas</b> -----	<b>9</b>
<b>1. Introdução</b> -----	<b>11</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> -----	<b>16</b>
<b>2.1 Origens do cão doméstico</b> -----	<b>16</b>
<b>2.2 Domesticação do cão doméstico</b> -----	<b>19</b>
<b>2.3 Estabelecimento de Raças</b> -----	<b>21</b>
<b>2.4 Cães de rebanho</b> -----	<b>23</b>
<b>2.5 Cães de rebanho portugueses</b> -----	<b>24</b>
<b>2.6 Origem das raças Açorianas</b> -----	<b>26</b>
<b>2.7 Cão Barbado da Ilha Terceira</b> -----	<b>27</b>
<b>2.8 Marcadores moleculares</b> -----	<b>29</b>
<b>2.9 Microssatélites</b> -----	<b>30</b>
<b>2.10 Genética de Populações</b> -----	<b>32</b>
<b>3. Materiais e Métodos</b> -----	<b>33</b>
<b>4. Resultados</b> -----	<b>44</b>
<b>5. Discussão</b> -----	<b>54</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> -----	<b>60</b>
<b>7. Anexo1</b> -----	<b>70</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Relação genética entre canídeos e outras espécies da mesma família. O cão selvagem africano foi usado como <i>outgroup</i> .-----	19
<b>Figura 2:</b> Origem geográfica das raças de cães de gado portuguesas. -----	25
<b>Figura 3:</b> Origem geográfica das raças de cães de pastor portuguesas. -----	26
<b>Figura 4:</b> Dendograma filogenético representando as distâncias genéticas entre os diferentes grupos estabelecidos.-----	48
<b>Figura 5:</b> Fragmento do dendograma filogenético representado o segundo grupo de animais.-----	49
<b>Figura 6:</b> Fragmento do dendograma filogenético representado animais geneticamente próximos.-----	50
<b>Figura 7:</b> Fragmento do dendograma filogenético representado animais geneticamente próximos.-----	50
<b>Figura 8:</b> Fragmento do dendograma filogenético representado animais geneticamente próximos.-----	
<b>Figura 9:</b> Dendograma filogenético representado as distâncias genéticas entre todos os indivíduos da população.-----	52

## Índice de Quadros

<b>Quadro 1:</b> Principais diferenças entre cães de Gado e cães de Pastor. -----	24
<b>Quadro 2:</b> Microssatélites utilizados. -----	37
<b>Quadro 3:</b> Regime de temperaturas utilizado na ampliação dos loci.-----	37
<b>Quadro 4:</b> Temperaturas de hibridação dos diferentes pares de primers.-----	38
<b>Quadro 5:</b> Componentes da reacção de PCR de cada primer e respectivas quantidades.	38
<b>Quadro 6:</b> N <sup>o</sup> de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os dez loci estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira. -----	44
-	
<b>Quadro 7:</b> N <sup>o</sup> de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze loci estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para o grupo 1. -----	45
<b>Quadro 8:</b> N <sup>o</sup> de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze loci estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para o grupo 2. -----	46
<b>Quadro 9:</b> N <sup>o</sup> de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze loci estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para o grupo 3. -----	47
<b>Quadro 10:</b> Diferenciação genética entre os grupos estabelecidos $F_{ST}$ .-----	48
<b>Quadro 11:</b> Exemplo de um animal compatível e outro incompatível com os supostos progenitores-----	51
-	

## Resumo

### Caracterização molecular do Cão Barbado da Terceira

Neste trabalho analisaram-se 257 animais da raça Cão Barbado da Terceira sendo caracterizados geneticamente, por doze microssatélites identificando-se um total de 79 alelos. A variabilidade genética foi estimada através das frequências alélicas, diversidade genética, heterozigocidade esperada e observada, probabilidade de identidade e verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Analisou-se as distâncias genéticas entre grupos pré-definidos consoante o ano de nascimento. Realizaram-se testes de paternidade comparando com os dados cedidos pelos criadores dos animais em questão, com bons resultados confirmando-se a compatibilidade com os progenitores na maioria dos casos

A população continua a manter variabilidade genética suficiente para não sofrer um processo de *inbreeding*, contudo deve ser dada atenção aos reprodutores a serem utilizados no futuro de forma a se conseguir uma maior heterozigocidade na raça para que haja uma evolução positiva da mesma.

Desta forma os objectivos deste trabalho foram conseguidos, sendo este tipo de marcadores moleculares suficientemente informativos para esta caracterização.

**Palavras-chave:** Cão Barbado da Terceira, microssatélites, caracterização molecular, paternidade.

## Abstract

### Molecular characterization of Cão Barbado da Terceira

In this study 257 animals from the Cão Barbado da Terceira breed were analyzed, which were genetically characterized with twelve microsatellites, with a total of 79 alleles identified. The genetic variability was estimated through the allelic frequencies, genetic diversity, expected and observed heterozygosity, identity probability and verification of the Hardy-Weinberg equilibrium.

There was also the analysis of the genetic distances between groups predefined according to the year of birth, as well as paternity tests by the comparison with the data provided by the breeders. Good results were obtained and the compatibility with the parents was confirmed in most cases.

The population still maintains enough genetic variability in order not to undergo *inbreeding*, however one should pay attention to the breeders to be used in the future, in a way to obtain a higher heterozygosity so there is a positive evolution of the breed.

Therefore the aims of this study were achieved, and this type of molecular markers was sufficiently informative for this characterization.

**Keywords:** Cão Barbado da Terceira, microsatellites, molecular characterization, paternity.

---

## Abreviaturas

AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism

ASA – Amplified Specific Amplicon

CHCl<sub>3</sub> - Clorofórmio

EDTA – ácido etileno diaminotetra-acético

F – Frequência alélica

FCI – Fédération Cynologique Internationale

HCl – Ácido Clorídrico

H<sub>e</sub> – Heterozigocidade esperada

H<sub>o</sub> – Heterozigocidade observada

KHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de potássio

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

NH<sub>4</sub>Cl – Cloreto de amônio

pb – Pares de base

PCR – Polymerase Chain Reaction

PI – Probabilidade de identidade

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

SCAR – Sequence Characterized Amplified Regions

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

Séc. - Século

SSR – Simple Sequence Repeats

STR – Short Tandem Repeats

TE – solução Tris-EDTA

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats

## Introdução

Apesar de quando se aborda o tema da produção animal, os cães não serem normalmente considerados, esta espécie reveste-se de grande relevância no panorama pastoril, não apenas como fonte de rendimentos, mas também pelo seu valor cultural, conforme o atestam diversos documentos e obras de arte elaborados ao longo dos tempos, referindo-se aos cães de gado ou de condução integrados no ambiente agrário. Relativamente aos benefícios económicos propiciados por estes animais, estes podem ser obtidos por duas vias: directamente, através da venda da descendência de cães de raça, e indirectamente, devido à redução da mortalidade no efectivo dos rebanhos (cães de gado) e da necessidade de mão-de-obra na manutenção do efectivo (cães de condução). No entanto, de forma a possibilitarem a obtenção de lucros pela sua venda, os cães deverão corresponder a critérios definidos: possuir características comportamentais que lhes permitam desenvolver correctamente as suas funções, e, paralelamente, adequar-se ao Estalão definido para a sua raça, que descreve as características morfológicas que os animais deverão exibir.

Recentemente, começou a assistir-se, em diferentes países, a um aumento do interesse pelas raças caninas nacionais, correspondendo a uma maior procura de animais para companhia. Esta situação é particularmente preocupante, dado que a selecção exercida sobre animais destinados ao trabalho com rebanhos é diferente da pressão imposta em animais destinados à companhia de pessoas. De facto, estes são seleccionados fundamentalmente com base em padrões morfológicos e comportamentais por vezes diferentes

dos requeridos nos animais de trabalho, diferença essa que se acentua se não houver cruzamentos entre animais oriundos de ambas as populações. Paralelamente à problemática da manutenção do tipo racial nestas populações caninas, coloca-se a questão da manutenção do efectivo das raças a médio e longo prazo. De facto, os critérios de selecção são por vezes antagónicos, o que leva ao perigo de ver desaparecer alguns comportamentos necessários ao desempenho da função original. Este facto é particularmente problemático face à acentuada redução a que se assiste no efectivo ainda em trabalho, dado que um comportamento, uma vez desaparecido de repertório comportamental de uma raça, não poderá ser recuperado. Por outro lado, as raças nacionais de cães pastor evidenciam, à semelhança de outras similares, um elevado potencial para a dominância, o que, apesar de tal não implicar necessariamente agressividade por parte dos animais, requer um conhecimento do seu potencial para as funções que actualmente se espera que desempenhem.

Face ao acima exposto, e dada a relevância destes cães como património cultural e genético único e parte integrante do sistema agrário nacional, verifica-se assim a necessidade de avaliar a situação das populações, quer a nível dos seus efectivos, quer a nível da homogeneidade, de forma a recorrer às medidas de protecção adequadas.

A caracterização das raças reveste-se, cada vez mais, de importância fundamental na manutenção da sua unicidade, de forma a preservar a sua funcionalidade e integração nas sociedades actuais. O conhecimento assim obtido terá implicações científicas e práticas importantes, permitindo uma

melhor integração dos cães pastor na economia rural e na sociedade portuguesa.

Várias centenas de raças de cães são reconhecidas em todo o mundo, e novas raças estão continuamente emergindo. Estas evoluíram ao longo do último século, a partir de cruzamentos específicos entre animais seleccionados.

A divulgação e o crescente interesse que tem despertado o cão Barbado da Terceira, levou à sua franca expansão e procura, tanto na região como em todo o território nacional e estrangeiro. Por outro lado, a existência de uma nova raça implica que esta seja submetida a um estudo profundo que contribua para clarificar questões acerca da genética desta população.

Sem dúvida que as raças caninas Açorianas têm como base genética o produto da mestiçagem entre os animais introduzidos. Estas populações heterogéneas foram posteriormente submetidas a diferentes tipos de selecção consoante as finalidades a que os animais eram destinados. Numa outra fase, com certeza que ocorreu a introdução de raças específicas que vieram ajudar a cristalizar as raças existentes actualmente.

A origem do “Barbado” não é exacta mas, segundo Oliveira (1998), poderá ser descendente de cães pastores de média estatura que existem em toda a Europa, em zonas de altitude, como o cão Pastor dos Pirinéus, Pastor Catalão, Pastor Polaco de Valle, Collie Barbudo, Bobtail, Boieiro das Ardenas, Boieiro da Flandres e cão da Serra de Aires.

Já há algum tempo que surge um verdadeiro interesse pelo “Barbado”, pelas suas características únicas de temperamento, rusticidade, e de desempenho das tarefas agro-pecuárias como a recolha de gado (destacando-

se no gado bravo), guarda de bens e propriedades, sendo também um excelente cão de companhia.

A grande procura de animais desta raça de cães origina um desafio complexo aos criadores, exigindo que sejam mantidas as qualidades inerentes a esta sem contribuir para a sua degeneração e empobrecimento genético. Tal desafio deverá ser enfrentado e acompanhado por um programa de melhoramento cuidado. Desta forma, este trabalho pretende dar um contributo para a caracterização do cão Barbado da Terceira.

Segundo Hardy-Weinberg uma população encontra-se em equilíbrio se num determinado *locus* polimórfico, as frequências alélicas e genóticas permanecerem constantes ao longo das gerações e se os polimorfismos se mantiverem, na ausência de factores de mudança (Klug & Cummings, 1994).

Este trabalho pretende dar um contributo importante para a caracterização molecular do Cão Barbado da Terceira, usando para tal marcadores genéticos, como os microssatélites. Estes marcadores foram os escolhidos por terem demonstrado uma maior aplicabilidade em estudos de genética populacional (MacHugh *et al.*, 1994; Ciampolini *et al.*, 1995; Arranz *et al.*, 1996), sendo internacionalmente adoptados pelas instituições que se ocupam da caracterização de raças de animais domésticos e em especial na clarificação da espécie *Canis familiaris* em virtude da sua complexidade (Rocha, 2002).

O desenvolvimento tecnológico na área de marcadores, como a tecnologia do ADN recombinante e a amplificação de segmentos de ADN pela reacção em cadeia da polimerase (“polymerase chain reaction” - PCR), abriu

caminho para a análise genética directa da sequência de ADN. Assim, com o desenvolvimento da PCR, foi possível que se desenvolvessem outros métodos de clonagem, sequenciação e análise de polimorfismos.

Dado o seu reconhecimento como raça desde 2004, será interessante verificar as possíveis alterações genéticas da população actual, pois são utilizados com mais frequência, a nível reprodutivo, alguns indivíduos com características preferenciais para os criadores.

O correcto parentesco entre reprodutores é um pré requisito para um eficiente programa de melhoramento genético animal. Muitas questões de parentesco podem ser resolvidas pelos testes convencionais, como grupos sanguíneos e proteínas do soro. No entanto, nalguns casos, esses polimorfismos não são suficientes para esclarecer a correcta paternidade e, em função disso, foram desenvolvidos outros métodos para a determinação da paternidade por marcadores genéticos.

Vários tipos de marcadores têm sido estudados para uso em confirmação de paternidade, com vantagens e desvantagens. Os marcadores microssatélites geralmente têm uma maior eficiência nos casos de verificação e determinação de parentesco, inclusivé em canídeos, devido ao alto polimorfismo que apresentam, aliado a resultados de clara interpretação.

Sendo assim, este trabalho teve como objectivo, além da caracterização molecular do Cão Barbado da Terceira, a verificação da paternidade das amostras desta raça.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 Origens do cão doméstico

Diversos autores têm abordado a origem do cão doméstico (*Canis familiaris*), como sendo um assunto muito debatido e controverso. Toda esta especulação, deve-se fundamentalmente à enorme diversidade morfológica que a espécie apresenta, superior à de qualquer outro canídeo (Wayne, 1986; Wayne & Vilà, 2001), bem como às grandes diferenças comportamentais (Hart, 1995). Uma questão óbvia é então, se esta diversidade reflecte uma ascendência diversa.

Em 1758, Lineu definiu o cão como uma espécie distinta dos restantes canídeos, com base na sua cauda recurvada (Clutton-Brock, 1995). No séc. XVIII, os naturalistas acreditavam que cada raça de cão tinha sido criada separadamente (Clutton-Brock, 2000). Em meados do séc. XIX, Saint-Hillaire afirma que a maioria dos cães descendia do chacal, e alguns outros do lobo (Andreoli, 1992). Darwin sugeriu que considerando a grande diversidade dos cães, provavelmente estes teriam sido fundados por mais de uma espécie. Esta consideração tem sido revista periodicamente (Lorenz, 1954; Coppinger e Schneider, 1995).

Diversos estudos desenvolvidos na segunda metade do séc. XX, abordando o comportamento (e.g. Scott & Fuller, 1965; Fox, 1971), vocalizações (e.g. Lorenz, 1975 *in* Clutton-Brock, 1995) morfologia (e.g. Wayne,

1986) e biologia molecular (e.g. Wayne, 1993; Gottelli et al., 1994) indiciam que o ancestral do cão doméstico é o lobo.

O cão doméstico pertence à família *Canidae* que por sua vez pertence à superfamília *Canoidea* e à ordem *Carnívora*. Os *Canidae* são a linhagem filogeneticamente mais antiga dentro da superfamília *Canoidea*, divergindo dos restantes carnívoros há cerca de 50 milhões de anos. O cariótipo canino é pouco semelhante ao de qualquer outra família de carnívoros (Wurster-Hill & Centerwall, 1982; Wayne *et al.*, 1987) sugerindo que grandes blocos de cromossomas e grupos de ligação podem não ser conservados (O'Brien *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 1999).

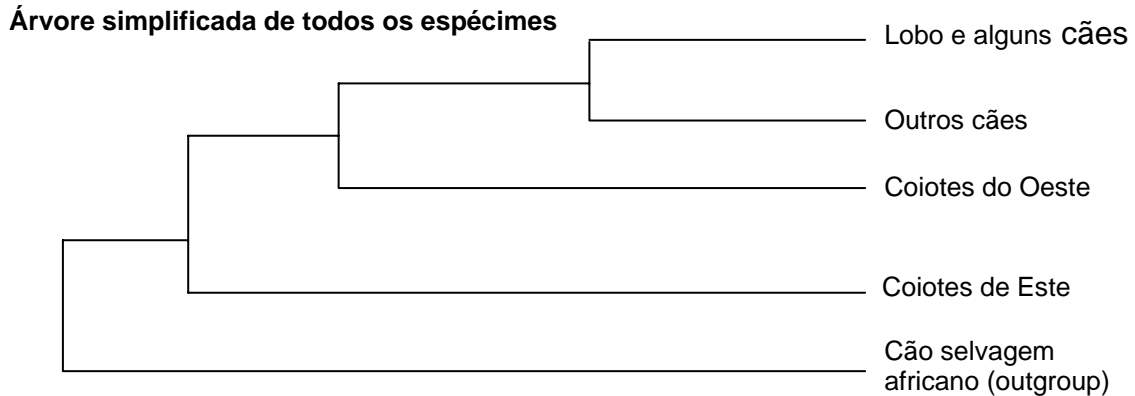
São reconhecidas três subfamílias de canídeos. A subfamília *Hesperocyoninae*, inclui os membros mais antigos e primitivos da família (Wang, 1994). Esta subfamília que existiu desde o Oligoceno até ao Mioceno, inclui predadores de pequeno a médio porte e sobreviveu mais de 20 milhões de anos. No Mioceno médio, os *Hesperocyoninae* foram substituídos pelos *Borophaginae*, grandes cães, que são frequentemente os predadores mais comuns nos depósitos Terciários mais recentes, mas que se extinguiram no Plioceno médio, há cerca de 4 milhões de anos (Wang *et al.*, 1999). A terceira subfamília, *Canidae*, inclui todos os representantes vivos da família e surge no Mioceno tardio.

Apesar dos canídeos pertencerem a uma linhagem antiga, as espécies existentes, têm uma relação próxima e divergiram apenas há cerca de 12-15 milhões de anos. Podem ser identificados três grupos distintos dentro dos *Canidae* existentes, com base em sequências de ADN mitocondrial, incluindo

os canídeos semelhantes à raposa vermelha (e.g. raposas vermelhas, Kit e Ártica, entre outros), as raposas Sul Americanas (e.g. raposas cinzentas e das pampas), e os canídeos semelhantes a lobos (cão doméstico, lobo cinzento, coiote, cão de caça Africano, lobo Etíope e chacais). Os cães do mato e lobo domado com juba “Bush dog e maned Wolf” são dois canídeos Sul Americanos muito divergentes que se agrupam com canídeos semelhantes a lobos em algumas análises (Wayne *et al.*, 1997). A raposa cinzenta, cão guaxinim e raposa com orelhas de morcego, representam linhagens há muito distintas. As relações evolucionárias são também sugeridas pela semelhança entre cromossomas.

Os dados da genética molecular apoiam de forma consistente a origem dos cães nos lobos, uma vez que possuem alelos de aloenzima em comum com os lobos (Ferrel *et al.*, 1978; Wayne e O'Brien, 1987), partilham microssatélites com elevado grau de polimorfismo (Garcia-Moreno *et al.*, 1996) e têm sequências de ADN mitocondrial similares ou idênticas às dos lobos cinzentos (Wayne *et al.*, 1992; Gottelli *et al.*, 1994).

O fenograma que se segue (Fig. 1) mostra surpreendentemente que as diferentes espécies de coiotes, lobos e cães estão mais relacionados do que originalmente se pensava. Já que estas “espécies” são férteis entre si, os resultados não são realmente surpreendentes, o Doutor Robert da Universidade da Califórnia em Los Angeles obteve resultados semelhantes com lobos vermelhos e cinzentos que partilhavam ancestrais maternos com o coiote, num passado não muito distante (Coppinger, 1995).



**Figura 1:** Relação genética entre canídeos e outras espécies da mesma família. O cão selvagem africano foi usado como outgroup (Rocha, 2002).

## 2.2 Domesticação do Cão Doméstico

Domestico é todo o animal mantido e reproduzido pelo homem em cativeiro, em estado de mansidão, através de gerações (Price, 1984).

No princípio, o homem apenas caçava os animais para se alimentar, depois começou a ter alguns para a sua companhia e, mais tarde, começou a criá-los, iniciando-se, assim, a domesticação de algumas espécies, com maior ou menor sucesso.

Segundo Price (1997), existem três processos fundamentais para a domesticação. Primeiramente, terá que haver um relaxamento de certos factores de selecção natural, como a predação e a fome, em segundo lugar certos traços preferidos pelo homem terão que sofrer uma selecção intensificada, por último tem que haver uma selecção natural em cativeiro, levando à adaptação.

O objectivo do homem quando domesticou os animais foi obter deles algum produto, utilidade ou serviço. Graças à sua inteligência, ao forte instinto de companheirismo, o cão tornou-se indispensável ao homem seguindo os seus passos durante o desenvolvimento da civilização, participando activamente na organização da sua vida social, desportiva e militar (Clutton-Brock, 1984).

Apesar de se supor que o processo de domesticação já decorre há 14000 anos, o testemunho mais antigo desta relação surgiu há 12000 anos onde é hoje Israel, quando um grupo de caçadores – recolectores sepultou um corpo cuja mão embalava em cachorro (Lange, 2002).

Os cães sempre estiveram presentes nas mais importantes conjuncturas da história humana. No antigo Egipto, Sirius, o cão celeste, era o Deus familiar. Na China antiga, o Livro dos Ritos menciona os cães como animais para cça e também para alimentação. No século VII, os nobres utilizavam os percursoros do St. Hubert (Bloodhound) para caça. Nos séculos XII a XV, os monges criavam nos mosteiros dos Alpes gelados os legendários antecessores dos cães de montanha para socorrer os viajantes perdidos. Nos séculos XV e XVI, no Renascimento, é a vez dos pequenos cães de luxo, favoritos das rainhas e nobreza geral. Na idade contemporânea despontaram as raças nórdicas, responsáveis pelos êxitos das expedições heróicas em terras polares. A partir de meados do século passado, os cães são utilizados para diversas funções, auxiliando os humanos de diversas formas, por exemplo como guias de cegos, ajuda nos salvamentos, em incêndios e terremotos, captura de criminosos e

apreensão de drogas, bem como cães de companhia (Clutton-Brock, 1984, 1995).

### **2.3 Estabelecimento de Raças**

Apesar de a Raça não ser considerada uma categoria taxonómica formal, não possuindo como tal um significado biológico definido, constitui a base de trabalho no âmbito da zootecnia actual. No âmbito de uma espécie animal assiste-se à formação espontânea ou artificial de raças, isto é, grupos de indivíduos que apresentam características distintas bem definidas (padrão da raça), transmissíveis hereditariamente (Marcenal *et al.*, 1990).

As raças espontâneas formam-se através da selecção natural, mediante a qual apenas os indivíduos que melhor se adaptam a um determinado ambiente conseguem sobreviver, passando aos seus descendentes as características que os distinguem. A maior parte das raças são artificiais, isto é, criadas pelo homem que efectuou a selecção (selecção artificial) procurando fixar as características mais desejadas. A selecção artificial é portanto baseada no cruzamento de indivíduos pertencentes a diferentes raças, e na hibridização, que é o acasalamento de híbridos, ou seja, de indivíduos obtidos por meio de cruzamentos. Na selecção artificial a escolha dos reprodutores é baseada em características morfológicas (selecção morfológica) ou funcionais (selecção funcional. Nalguns casos prevalece a selecção funcional e consequentemente as características morfológicas aparecem menos definidas e mais variáveis, noutros casos, pelo contrário, será a selecção morfológica a

sobrepor-se, com a consequente exaltação das características físicas distintas da raça (Marcenal *et al.*, 1990).

Para que se estabeleçam raças é necessário haver evolução, logo é fundamental existir variação nos caracteres pretendidos, e que esta variabilidade seja transmissível geneticamente. Assim, para a formação de raças, são fundamentais três processos. Em primeiro lugar é necessária a domesticação das espécies, seguindo-se a intervenção técnico-científica do homem nos processos selectivos do melhoramento (selecção artificial) e por fim o controle actual total das raças pelo homem relativamente à sua gestão e reconhecimento (Rodero & Herrera, 2000).

No que respeita especificamente à canicultura, a *Fédération Cynologique Internationale* (FCI, entidade que rege a canicultura a nível internacional) adoptou, na sua assembleia geral de 1983, uma proposta de regulamentação que considera que “um grupo de cães – população – é uma raça quando:

- (a) Todos os animais pertencentes a essa população apresentem um número de características comuns;
- (b) A presença desses caracteres é constante nas gerações sucessivas;
- (c) A população é um grupo fechado de animais no qual apenas os animais correspondendo às condições a) e b) são cruzados entre eles;
- (d) Quando os caracteres comuns e geneticamente determinados são descritos num Estalão FCI.

Considera ainda que “uma variedade de raça é um grupo específico tendo em comum uma ou mais características determinadas que não são obrigatoriamente comuns para todos os indivíduos pertencentes à raça” (FCI, 1983).

## **2.4 Cães de rebanho**

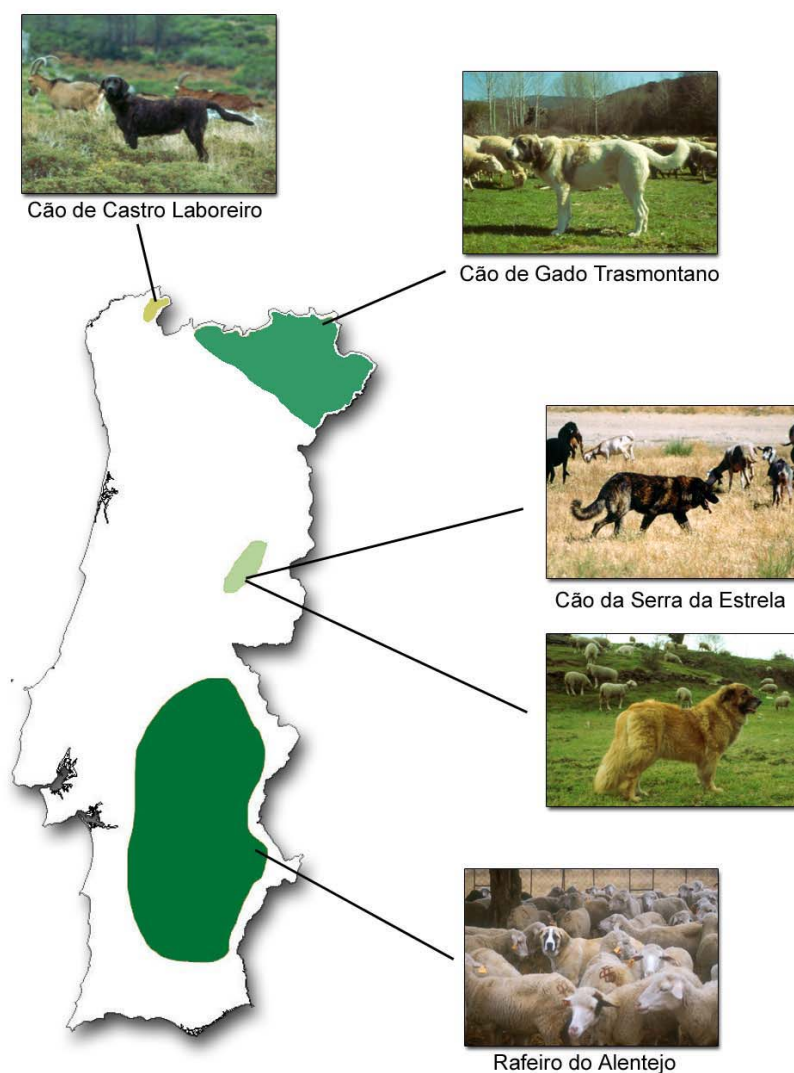
Tradicionalmente designados sob o mesmo nome, os chamados “cães pastor” ou “cães de gado” podem exercer uma de duas funções completamente distintas: enquanto uns auxiliam na condução dos rebanhos (cães de pastor propriamente ditos, cães pastores, cães de condução ou, como são também conhecidos a nível nacional cães de virar), outros protegem os rebanhos dos ataques de predadores (cães de gado propriamente ditos ou cães guardadores de gado). No entanto, esta diferença entre os diferentes tipos de cães nem sempre tem sido reconhecida, sendo esta confusão comum ainda hoje. Na literatura mais antiga, estes dois tipos de cães serem considerados sob o mesmo nome, quer este fosse o de cães de gado, quer o de cães de pastor, atribuindo-lhes a sinonímia. Ambos os tipos caninos constituem parte integrante do sistema tradicional de manejo de gado europeu, apresentando diversas diferenças (Quadro 1) (Cruz 2007).

**Quadro 1:** Principais diferenças entre cães de Gado e cães de Pastor.

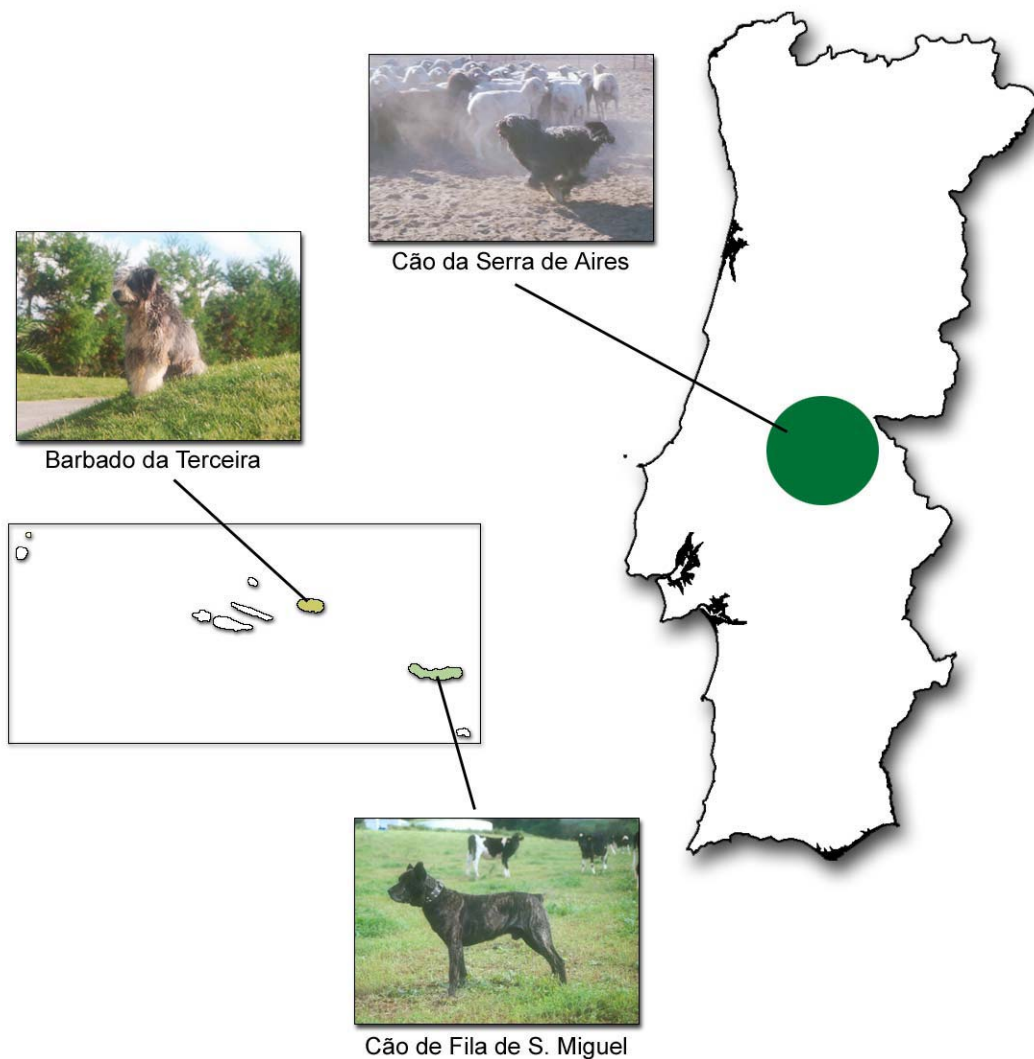
<b>Cães de Gado</b>	<b>Cães de Pastor</b>
<b>Morfologia</b>	
Grande Porte: Altura ao garrote maior que 65cm Peso entre 35 a 65 kg	Pequeno ou médio Porte: Altura ao garrote menor que 65cm Peso menor que 35 kg
Cabeças maciças e arredondadas	Focinhos compridos e estreitos
Orelhas caídas e cauda longa	Orelhas geralmente erectas
Pelagem densa, podendo ser curta ou longa	Pelagem maioritariamente curta
Cor da pelagem: Toda a gama de cores desde o branco ao preto.	Cor da pelagem: escura
Morfologia do tipo Molossoíde	Morfologia do tipo Lupoíde
<b>Comportamento</b>	
Não conduzem o gado	Conduzem o gado
Animais calmos e independentes	Forte instinto predatório
Pouco receptivos a comandos	Utilizado apenas após um período de treino
Trabalham sem supervisão humana	Trabalham apenas com supervisão humana
Modo de acção “instintivo”	Modo de acção “aprendido”

## 2.5 Cães de rebanho portugueses

Actualmente são reconhecidas em Portugal, sete raças de cães de rebanho. Podemos dividir, quanto à actividade pastoril, em cães de protecção de rebanho (Cão da Serra da Estrela, Cão de Castro Laboreiro, Rafeiro do Alentejo e Cão de Gado Transmontano; figura 2) ou cães de condução de gado (Cão da Serra de Aires, Cão de Fila de S. Miguel e Cão Barbado da Terceira; figura 3).



**Figura 2:** Origem geográfica das raças de cães de gado portuguesas (Cruz, 2007).



**Figura 3:** Origem geográfica das raças de cães de pastor portuguesas (Cruz, 2007).

## 2.6 Origem das raças Açorianas

Sobre a origem dos primeiros animais que vieram para os Açores, nunca houve uma opinião unânime, quer por parte dos historiadores quer por parte dos técnicos (Bettencourt, 1923).

Os Açores, aquando da sua descoberta por volta de 1427, possuíam vegetação densa e de difícil penetração, mas sem a existência de mamíferos. Os marinheiros do Infante D. Henrique lançaram gado na orla marítima das ilhas. Em 1439 com o início do povoamento, abundavam já as manadas e rebanhos de gado doméstico em plena liberdade, tornando-se este bravo. Daí a necessidade de se utilizarem Cães pastores para recolher e conduzir as manadas (Teves, 1995).

Sem dúvida que as raças caninas Açorianas têm como base genética o produto da mestiçagem entre os animais introduzidos. Estas populações heterogéneas foram posteriormente submetidas a diferentes tipos de selecção consoante as finalidades a que os animais eram destinados. Numa outra fase, com certeza que ocorreu a introdução de raças específicas que vieram ajudar a cristalizar as raças existentes actualmente (Rocha, 2002)

## **2.7 Cão Barbado da Ilha Terceira**

Este cão é a raça nacional de reconhecimento mais recente, mais propriamente em 2004.

Segundo Oliveira (1998), a origem desta população pode-se dever a duas hipóteses: A primeira refere que o Barbado descenda de cães de pastor ou boieiros de estatura média e pêlo alongado, existentes um pouco por toda a Europa. Enquanto que a segunda hipótese será que descenda de cães de caça trazidos pelos colonizadores de toda a Europa, em virtude da abundância de gado bravo nos Açores.

Dada a aparência morfológica e a funcionalidade desta população, a primeira hipótese será a mais realista. Muito provavelmente, a raça será derivada de um *stock* de cães similar ao que deu origem ao Cão de Fila de S. Miguel, dada a história semelhante de colonização das Ilhas Açorianas. A comparação genética entre estas duas raças é extremamente interessante pois o índice de coascendência, assim como o número de alelos partilhados demonstram uma base genética muito próxima (Rocha, 2002).

Quanto à morfologia (anexo 1) este tipo de cão é normalmente de porte médio (52 a 58 cm e 25 a 30 kg para os machos, 48 a 54 cm e 21 a 26 kg para as fêmeas).

O pêlo é longo e ligeiramente ondulado, com sub-pêlo abundante, no entanto as pelagens não devem ser ásperas, apesar de serem muito variadas em termos de cor e textura. Admitem-se as cores pretas, lobeiro, amarelo e fulvo em todas as tonalidades, podendo os exemplares ser manalvos, pedalvos, quadralvos, com frente aberta, encoleirados e com malhas brancas no peito, ventre e ponta da cauda.

Tal como no caso do Cão de Fila de S. Miguel, também no Cão Barbado da Terceira a cauda pode ser amputada e as orelhas cortadas, em redondo.

Esta raça de cão tem como função o manejo e condução do gado bovino, lide de gado bravo ou bravio e nas touradas à corda. Recentemente, tem sido adaptado a cão de companhia e de guarda de propriedades (Oliveira, 1998).

## 2.8 Marcadores moleculares

Um marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de ADN (Matioli, 2001). Milach (1998a) descreve que marcadores moleculares são características de ADN que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente de acordo com as leis básicas de herança descritas por Mendel e servem para identificar um local ou uma região de um cromossoma. Um marcador genético ideal deve apresentar os seguintes atributos (Milach, 1998b; Matioli, 2001):

- a) Alto nível de polimorfismo;
- b) Estabilidade em diferentes ambientes;
- c) Detectar grande número de *locus* não ligados e;
- d) Ser de herança simples.

O uso de marcadores moleculares permite que a selecção e novos cruzamentos sejam realizados numa mesma geração, o que aumenta consideravelmente a eficiência de um programa de melhoramento. Podem ser usados mesmo que não tenham sido mapeados, ou seja, associados a um gene, a uma região cromossómica ou a um fenótipo, desde que possam ser seguidos em gerações subsequentes, comprovando a sua natureza genética (Milach, 1998). Comportamento social e reprodutivo das espécies e padrões de acasalamento também têm sido estudados com o auxílio de marcadores moleculares (Hughes, 1999).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los:

De hibridização ou amplificação de ADN. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e Minissatélites ou locus VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”) ou ASA (Amplified Specific Amplicon); Microsatélite (ou SSR – “Simple Sequence Repeats”); e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas. Contudo, os tipos de marcadores aqui listados ainda são actualmente utilizados para a caracterização molecular (Milach, 1998a).

## 2.9 Microsatelites

Os microsatelites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em *tandem* “*Short Tandem Repeats*”), são elementos repetitivos, formados por arranjos de repetições em *tandem*, de dois a seis nucleotídeos de comprimento e estão entre os *locus* mais polimórficos dos genomas. O polimorfismo destes marcadores baseia-se na variação do número dos elementos repetidos, provavelmente devido aos erros da ADN Polimerase durante o processo de replicação e reparo da molécula de ADN (Powell *et al.*, 1996). As repetições

mais frequentes são as de dinucleótidos e as de tetranucleótidos as mais raras (Knippers, 1995).

Dois alelos distinguem-se pelo número de vezes que a sequência de nucleótidos se repete. Estas repetições podem ser perfeitas, quando a sequência se repete sem interrupção  $(GA)_n$ , sendo imperfeitas, quando uma sequência de dinucleótidos é interrompida por uma outra de um mononucleótido  $(GA)_n G_n (CA)_n$ , ou compostas, quando, por exemplo, duas sequências de dinucleótidos se repetem uma após a outra  $(GTAT)_n(GT)_n$  (Thomas e Scott, 1993).

Comparando microssatélites com outros marcadores moleculares, constata-se que estes apresentam uma série de vantagens sobre os demais, são abundantes, cobrem extensivamente o genoma, possuem natureza multialélica, necessitam de pequenas quantidades de ADN para análise, são de fácil detecção por PCR, têm herança do tipo mendeliana e são expressos como alelos codominantes. Têm sido aplicados em diversos estudos na área animal, entre eles: estimativas de distâncias genéticas; monitoramento de linhagens endocruzadas; testes de paternidade em diversas espécies animais; comparações de composição genética de amostras recentes e antigas e análise da diversidade genética. Podem, inclusivé, indicar aos criadores a ocorrência da redução da diversidade genética devido ao emprego de um pequeno número de pais, por meio da comparação dos níveis de variabilidade entre a origem e o material derivado. Também auxiliam na identificação dos stocks mais divergentes geneticamente, de forma a maximizar a recuperação

da variabilidade genética via cruzamento, bem como para monitorizar os níveis de endocruzamentos nos grupos (Ferguson *et al.*, 1995).

## **2.10 Genética de Populações**

Genética de populações é o estudo dos parâmetros de variação genética encontrada dentro de grupos ou que evoluíram ao longo do tempo. A variação genética ao longo da população consiste nos tipos de alelos existentes em todos os seus elementos, e respectivas frequências, considerados como um todo. Segundo Hardy-Weinberg uma população encontra-se em equilíbrio se num determinado *locus* polimórfico, as frequências alélicas e genóticas permanecerem constantes ao longo das gerações e se os polimorfismos se mantiverem, na ausência de factores de mudança (Russell, 1992). Desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg podem dever-se a : cruzamentos não aleatórios, subdivisão da população, coascendência, selecção, migração, diferenças sexuais específicas na frequência alelica, factores de amostragem cronológicos e ocorrência de alelos nulos não detectáveis experimentalmente (MacHugh, 1996).

## Materiais e Métodos

### 1. Recolha de amostras para extracção de ADN

A recolha de amostras para extracção de ADN foi feita a partir de 257 animais Cães Barbados da Ilha Terceira. Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue e de pêlo.

### 2. Extracção de ADN

#### 2.1 Extracção de ADN a partir de amostras de sangue

As amostras de sangue foram conservadas a 4°C até se proceder à extracção de ADN. Para tal, utilizou-se o protocolo descrito por van Bragt (1996) para extracção de ADN a partir de sangue fresco.

- 1) Transferir 2.5 ml de sangue para um tubo de *Falcon*, adicionar 10 ml de solução de ruptura I (155 mM NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 1 mM EDTA, pH 7,4) e centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm;
- 2) Rejeitar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 10 ml de solução de ruptura I;
- 3) Incubar no gelo durante 25 minutos agitando frequentemente;
- 4) Centrifugar durante 10 minutos a 2500 rpm;
- 5) Retirar o sobrenadante e adicionar 10 ml de solução de ruptura II (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 400 mM NaCl, 2 mM EDTA);

- 
- 6) Ressuspender bem o sedimento a adicionar 40  $\mu$ l de proteinase K (10mg/ml) e 110  $\mu$ l de 10% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS- Sodium Dodecyl Sulfate);
  - 7) Incubar durante a noite a 60°C;
  - 8) Adicionar 700  $\mu$ l de 3M NaCl e agitar vigorosamente durante 15 segundos;
  - 9) Centrifugar durante 15 minutos a 3000 rpm;
  - 10) Transferir o sobrenadante para um tubo de 50 ml e adicionar dois volumes de etanol a 96%;
  - 11) Recolher o ADN precipitado para um tubo Eppendorf.
  - 12) Lavar com 500  $\mu$ l de etanol a 70 %;
  - 13) Deixar secar bem o ADN e ressuspender em 250  $\mu$ l de Tris –EDTA (TE), pH 7.5.

## **2.2 Extracções de ADN a partir de amostras de pêlo**

### **2.2.1 Protocolo de extracção de ADN de pêlo I**

As amostras de pêlo foram conservadas a 4°C até à sua utilização. Para a extracção foi utilizado o protocolo adaptado a partir do descrito por Mathias Müller:

- 1) Colocar entre 20 a 30 folículos pilosos num *Eppendorf* de 1.5 ml. Adicionar 300  $\mu$ l de reagente B (400mM Tris-HCl; 60 mM EDTA; 150 mM NaCl; 1% SDS; pH 8) e 6  $\mu$ l proteinase K (17.5 mg/ml);
- 2) Deixar incubar durante 48 horas a 60°C;

- 3) Agitar vigorosamente;
- 4) Adicionar 100µl de perclorato de sódio 5M e misturar invertendo o tubo pelo menos 7 vezes;
- 5) Adicionar 300 µl de CHCl<sub>3</sub> e misturar invertendo o tubo pelo menos 7 vezes;
- 6) Centrifugar 5 minutos a 13000 rpm;
- 7) Transferir o sobrenadante para um novo tubo e repetir os passos anteriores uma vez;
- 8) Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar o dobro do volume em álcool absoluto a -20°C;
- 9) Deixar no congelador a precipitar durante a noite;
- 10) Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm;
- 11) Descartar o sobrenadante e lavar o sedimento com álcool a 70% (100 µl) durante 15 minutos;
- 12) Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm a 4°C;
- 13) Descartar o sobrenadante e deixar secar;
- 14) Ressuspender com 50 µl de TE pH 8.

### **2.2.2 Protocolo de extracção de ADN de pêlo II**

As amostras de pêlo foram conservadas a 4°C até à sua utilização. Para a extracção foi utilizado o protocolo adaptado a partir do descrito por Andrade *et al.* (2006).

- 1) Colocar 20 a 30 folículos pilosos para um *Eppendorf* de 1.5 ml;
- 2) Adicionar 50 µl de solução de lise (NaOH 200 mM);

- 3) Ressuspender no vortex durante trinta segundos;
- 4) Centrifugar a 13000 rpm durante trinta segundos.
- 5) Incubar em banho-maria a 95°C durante 10 minutos;
- 6) Adicionar 50 µl de solução neutralizadora (HCl 200 mM, tris-HCl 100 mM, pH 8,5);
- 7) Incubar a 37°C durante trinta minutos;
- 8) Armazenar a -20°C.

### **3. Quantificação do ADN**

O método mais utilizado para quantificar o ADN é a espectrofotometria, por ser considerado como um método não destrutivo que permite quantificar pequenas quantidades de ADN (Müller *et al.*, 1993). Para a quantificação de ADN através do espectrofotómetro, devem-se fazer leituras nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. A leitura no comprimento de onda a 260 nm, permite o cálculo da concentração de ADN na amostra, enquanto que o rácio ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) permite-nos saber o grau de pureza do ADN, pela determinação da contaminação por proteínas. Os valores entre 1,6 e 2, são os valores a obter numa amostra considerada quase isenta de proteínas (Sambrook *et al.*, 1989).

### **4. Amplificação de fragmentos de ADN**

#### **4.1 Microssatélites**

Foram escolhidos 12 microssatélites (Quadro 2) para este estudo, de entre os inúmeros já identificados no genoma canino.

Quadro 2: Microssatélites utilizados.

Locus	Varição (pb)	Repetição	Autor
cGMP1	250-306	(TTCC) <sub>15</sub>	Veske <i>et al.</i> (1997)
ACE	84-104	(TG) <sub>19</sub>	Shibuya <i>et al.</i> (1998)
End	219-225	(GA) <sub>11</sub>	Liu <i>et al.</i> (1998a)
TyrTrans	116-126	(TG) <sub>16</sub>	Khan <i>et al.</i> (1998)
SAHY	146-154	(CT) <sub>12</sub>	Liu <i>et al.</i> (1998b)
LCAT	129-135	(CA) <sub>15</sub>	Guo <i>et al.</i> (1998)
ZuBeCa3	200-204	(AC) <sub>13</sub>	Switonski <i>et al.</i> (1998)
REN39L15	210-224	(CA) <sub>15</sub>	Jouquand <i>et al.</i> (2000)
REN02K21	260-296	(CA) <sub>18</sub>	Jouquand <i>et al.</i> (2000)
REN01O23	189-211	(GCT) <sub>13</sub>	Jouquand <i>et al.</i> (2000)
REN05C07	137-163	(CA) <sub>16</sub>	Jouquand <i>et al.</i> (2000)
REN04M22	185-203	(CT) <sub>7</sub> (CA) <sub>15</sub>	Jouquand <i>et al.</i> (2000)

O regime de temperaturas utilizadas está representado no quadro 3, tendo a temperatura de hibridação variado entre 48-63°C (quadro 4) para os distintos pares de *primers*, uma vez que estes diferem na sua constituição.

Quadro 3: Regime de temperaturas utilizado na ampliação dos loci.

Fase do ciclo	Temperatura (°C)	Duração (min.)	Nº Ciclos
Desnaturação	96	1	X 1
Hibridação	Tm	1	
Extensão	72	1	
Desnaturação	96	30	X 35
Hibridação	Tm	1	
Extensão	72	1	
Desnaturação	96	30	X 1
Hibridação	Tm	1	
Extensão	72	30	
	4		

**Quadro 4:** Temperaturas de hibridação dos diferentes pares de *primers*.

<i>Locus</i>	Temperatura (T <sub>m</sub> )
REN39L15	48°C
REN02K21, cGMP, REN04M22	51°C
ZuBeCa3, REN01023, REN05C07	54°C
End, Tyrtrans, SAHY, LCAT	59°C
ACE	63°C

#### 4.2 PCR

As reacções de PCR, foram efectuadas em volumes finais de 20 µl, com excepção dos *primers* REN39L15 e REN05C07, com um volume final de 17 µl. No quadro 5 estão representados os componentes da reacção de PCR para cada um dos *primers* e as respectivas quantidades.

**Quadro 5:** Componentes da reacção de PCR de cada *primer* e respectivas quantidades.

	cGMP	END	TyrTrans	SAHY	LCAT	ACE	ZuBeCa3	REN39L15	REN02K21	REN01023	REN05C07	REN04M22	
10X Buffer							2 µl						
MgCl <sub>2</sub> (25mM)							1.2 µl						
dNTP (25mM)							0.2 µl						
Foward Primer (10pmol/µl)							0,8 µl				1 µl	0,8 µl	
Reverse Primer (10pmol/µl)							0,8 µl				1 µl	0,8 µl	
Taq (5U/µl)	0,1 µl							0,2 µl				0,1 µl	0,2 µl
ADN (10ng/µl)	5 µl							2 µl	5 µl		2 µl	5 µl	

Os produtos da PCR foram quantificados submetendo as reacções a electroforese em gel de agarose a 2%, a 100 volts durante 60 minutos.

O comprimento dos alelos, em pares de bases (pb), foi determinado num sequenciador automático do ADN (ABI Prism 310 Genetic Analyser, PE Applied Biosystems), tendo-se usado como marcador interno o Genescan 350 TAMRA size standard (PE Applied Biosystems).

## 5. Caracterização das populações

A partir dos alelos encontrados e das suas dimensões foi possível recolher informação sobre os loci analisados e sobre a estrutura genética dos grupos estudados. Os parâmetros estudados foram os seguintes:

- Número de alelos observados;
- Frequência alélica (F);
- Probabilidade de identidade (PI);
- Probabilidade de ocorrência de alelos nulos;
- Heterozigocidade esperada ( $H_e$ ) e heterozigocidade observada ( $H_o$ );
- Teste exacto de Hardy-Weinberg;
- Estatística F ( $F_{is}$ ,  $F_{st}$ , e  $F_{it}$ ).

A frequência alélica representa a proporção de todos os alelos num dado *locus* (Hartl & Clark, 1997) e calcula-se pela seguinte fórmula:

---

$$F = m/2n$$

em que  $m$  representa o número de vezes que um determinado alelo é observado e  $2n$  o número total de alelos.

A heterozigocidade esperada ( $H_e$ ), também denominada diversidade genética por Nei, é um parâmetro importante na análise genética de populações (Kremer *et al.*, 1998), e determina-se da seguinte forma:

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

em que  $p_i$  representa a frequência do alelo  $i$ .

A heterozigocidade observada ( $H_o$ ) é o número total de indivíduos heterozigóticos na amostra dividido pelo tamanho da amostra (Brookfield, 1996).

A comparação entre  $H_e$  e  $H_o$  permite-nos tirar conclusões quanto à tendência de determinada população para a perda ou ganho de variabilidade.

A probabilidade de identidade dá-nos a probabilidade de encontrar, num determinado *loci*, dois indivíduos com o mesmo genótipo (Paetkau *et al.*, 1995) e é-nos dada pela seguinte equação:

$$PI = \sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$$

em que  $p_i$  e  $p_j$  representam a frequência dos alelos  $i$  e  $j$  respectivamente.

A ocorrência de alelos nulos deve-se a modificações na zona de hibridação dos primers, tornando impossível a sua ligação ao molde de ADN e consequentemente a amplificação dos fragmentos onde isso acontece (Cellen *et al.*, 1993; Paetkau & Strobeck, 1995; Pemberton *et al.*, 1995). Segundo Brookfield (1996), a probabilidade de ocorrência de alelos nulos através da deficiência heterozigótica é-nos dada por:

$$r=(H_e-H_o)/(1+H_e)$$

Todos os parâmetros acima mencionados foram calculados recorrendo ao programa IDENTITY 4.0 (Wagner & Sefc, 1999).

O teste exacto de Hardy-Weinberg permite-nos determinar os desvios ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, avaliando a existência de défice ou excesso de heterozigóticos. Para o cálculo dos valores referentes a este teste, os valores de  $F_{is}$  foram estimados segundo Weir e Cockerham (1984), utilizando o programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995). Neste programa a estimativa dos valores exactos de  $P$  é feita através do método da enumeração completa descrito por Louis e Dempster (1987), uma vez que este é mais fiável na presença de menos de quatro alelos num determinado *locus*.

Também foi calculado o coeficiente de inbreeding ( $f$ ) ou índice  $F_{is}$  desenvolvido por Wright. Este método mede os desvios das frequências genotípicas em relação às frequências de uma população panmítica (sem

subdivisão, ocorrência de cruzamentos aleatórios, inexistência de divergência dentro da população) em termos de deficiência ou excesso de heterozigóticos. Os seus valores variam entre -1 e 1; se forem positivos indicam um deficit de heterozigocidade (cruzamentos consanguíneos), comparando com o esperado no equilíbrio de Hardy-Weimberg; pelo contrário, se são negativos apontam para um excesso de heterozigocidade (MacHugh, 1996; Majerus *et al.*, 1996; Hedrick, 2000).

O  $F_{st}$ , também chamado de índice de coascendência ( $\theta$ ), indica-nos o efeito da subdivisão da população, ou seja, a redução da heterozigocidade de uma sub-população devido a deriva genética (Brent, 1996).

Segundo Weir e Cockerham (1984), este índice é calculado através da correlação de pares de alelos entre indivíduos dentro de uma sub-população. O valor de  $F_{st}$  é sempre positivo, variando entre 0 e 1: quando é igual a zero estamos na presença de uma população panmítica; se se iguala a 1 indica-nos isolamento completo (extrema sub-divisão) (MacHugh, 1996; Majerus *et al.*, 1996; Hedrick, 2000). Se obtivermos valores maiores do que 0 e menores do que 0.05 a diferença genética é negligenciável; se os mesmos se encontrarem entre 0.05 e 0.15 temos uma diferenciação moderada; valores entre 0.15 e 0.25 indicam grande diferenciação e valores superiores a 0.25 mostram uma diferenciação genética muito elevada (Hartl e Clark, 1997).

Estes índices foram estimados, segundo o método de Weir e Cockerham (1984) utilizando o programa GENEPOP (Raymond e Rousset, 1995).

Com o auxílio do programa Microsat (Minch, 1997), foi construída uma matriz das distâncias genéticas, calculadas com base na proporção de alelos diferentes (Dps': 1-proporção de alelos compartilhados).

As distâncias genéticas foram representadas graficamente recorrendo ao programa NEIGHBOR do pacote PHYLIP, usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean). As árvores obtidas foram lidas através do programa TREEVIEW.

## Resultados

Para os 257 animais estudados com os 12 microssatélites foi obtido um total de 79 alelos, tendo variado o seu número entre 2 para os *loci* END e LCAT e 13 para o *locus* cGMP (Quadro 6). A média de alelos encontrada por *locus* foi de 6,6. A PI mais elevada foi de 0,642 no *locus* LCAT, o menos polimórfico e a mais baixa de 0,102 no *locus* ACE, para um dos mais polimórficos; sendo para o total dos *loci* de  $2.6 \times 10^{-7}$ , demonstrando a elevada fiabilidade do estudo efectuado. Quanto à He variou entre 0,233 (ZuBeCa3) e 0,820 (ACE) e a Ho entre 0,222 (ZuBeCa3) e 0,778 (ACE), sendo para o total dos *loci* He igual a Ho (0,998).

**Quadro 6:** Nº de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze *loci* estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para todas as amostras.

	Nº Alelos	PI	He	Ho	r
ACE	11	0,102	0,820	0,778	0,023
cGMP	13	0,204	0,657	0,549	0,065
End	2	0,604	0,441	0,669	-0,001
LCAT	2	0,642	0,271	0,261	0,033
REN01O23	6	0,396	0,509	0,486	0,015
REN02K21	9	0,186	0,735	0,735	0
REN04M22	4	0,410	0,668	0,669	-0,001
REN05C07	7	0,124	0,797	0,735	0,034
REN39L15	6	0,192	0,746	0,689	0,033
SAHY	4	0,361	0,567	0,521	0,029
TyrTrans	6	0,291	0,588	0,619	-0,019
ZuBeCa3	9	0,635	0,233	0,222	0,009
Total	79	$2.6 \times 10^{-7}$	0,998	0,998	

Posteriormente, dividiram-se as amostras em três grupos diferentes, em relação ao ano de nascimento. O primeiro grupo incluiu os animais nascidos até 2000, no segundo os animais nascidos entre 2001 e 2004, inclusivé, e por último os animais nascidos depois de 2004.

O grupo 1 inclui 122 animais, tendo sido obtido um total de 71 alelos, variando entre 11, para o locus ACE e 2 para os *loci* END e LCAT (Quadro 7). A PI mais elevada foi de 0,633 no *locus* LCAT e a mais baixa de 0,076 no *locus* ACE, sendo para o total dos loci de  $1.1 \cdot 10^{-7}$ . Quanto à He variou entre 0,285 (LCAT) e 0,849 (ACE) e a Ho entre 0,262 (ZuBeCa3) e 0,869 (ACE), sendo para o total dos *loci* He igual a Ho (0,469).

**Quadro 7:** Nº de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze loci estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para os 122 animais nascidos antes de 2000.

	Nº Alelos	PI	He	Ho	r
ACE	11	0,076	0,849	0,869	-0,011
cGMP	7	0,180	0,707	0,648	0,035
End	2	0,600	0,398	0,385	0,009
LCAT	2	0,633	0,285	0,295	-0,008
REN01O23	5	0,399	0,469	0,426	0,029
REN02K21	9	0,195	0,711	0,713	-0,001
REN04M22	4	0,249	0,696	0,696	0
REN05C07	7	0,122	0,792	0,713	0,044
REN39L15	6	0,164	0,771	0,680	0,051
SAHY	4	0,352	0,530	0,549	-0,012
TyrTrans	6	0,295	0,626	0,639	-0,008
ZuBeCa3	8	0,551	0,299	0,262	0,029
Total	71	$1.1 \cdot 10^{-7}$	0,998	0,998	

No grupo 2 foram inseridos 64 animais, tendo sido obtido um total de 58 alelos, variando entre 2 para os *loci* END e LCAT e 9 para o *locus* ACE (Quadro 8). A PI mais elevada foi de 0,774 no *locus* ZuBeCa3 e a mais baixa de 0,140 no *locus* ACE, sendo para o total dos *loci* de  $2.7 \cdot 10^6$ . Quanto à He variou entre 0,242 (LCAT e ZuBeCa3) e 0,775 (ACE) e a Ho entre 0,188 (LCAT e ZuBeCa3) e 0,719 (REN39L15, REN02K21 e REN04M22), sendo para o total dos *loci* He igual a Ho (0,994).

**Quadro 8:** Nº de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze *loci* estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para os 64 animais nascidos entre 2001 e 2004.

	Nº Alelos	PI	He	Ho	r
ACE	9	0,140	0,775	0,688	0,049
cGMP	7	0,341	0,504	0,406	0,065
End	2	0,608	0,456	0,484	-0,019
LCAT	2	0,663	0,242	0,188	0,044
REN01O23	4	0,411	0,569	0,594	-0,016
REN02K21	6	0,224	0,718	0,719	0,001
REN04M22	4	0,300	0,645	0,719	-0,045
REN05C07	7	0,158	0,769	0,687	0,046
REN39L15	5	0,222	0,717	0,719	-0,001
SAHY	4	0,481	0,535	0,469	0,043
TyrTrans	5	0,394	0,461	0,469	-0,005
ZuBeCa3	3	0,774	0,242	0,188	0,044
Total	58	$2.7 \cdot 10^6$	0,994	0,994	

Dos 71 animais que pertencem ao grupo 3, foi obtido um total de 62 alelos, variando entre 2 para os *loci* END e LCAT e 11 para o *locus* cGMP (Quadro 9). A PI mais elevada é de 0,691 no *locus* ZuBeCa3 e a mais baixa de 0,134 no *locus* REN05C07, sendo para o total dos *loci* de  $7.2 \cdot 10^7$ . Quanto à He variou entre 0,201 (ZuBeCa3) e 0,778 (ACE) e a Ho entre 0,225 (ZuBeCa3) e 0,817 (REN05C07), sendo para o total dos *loci* He igual a Ho (0,997).

**Quadro 9:** N° de alelos, probabilidade de identidade (PI), heterozigocidade esperada (He) e heterozigocidade observada (Ho) obtidos com os doze loci estudados no Cão Barbado da Ilha Terceira para o grupo 3.

	Nº Alelos	PI	He	Ho	r
ACE	9	0,147	0,778	0,704	0,041
cGMP	11	0,183	0,672	0,507	0,099
End	2	0,616	0,481	0,606	-0,084
LCAT	2	0,641	0,271	0,268	0,003
REN01O23	4	0,405	0,497	0,493	0,003
REN02K21	7	0,191	0,732	0,789	-0,033
REN04M22	4	0,345	0,622	0,577	0,028
REN05C07	7	0,134	0,767	0,817	-0,028
REN39L15	4	0,240	0,714	0,676	0,022
SAHY	4	0,394	0,592	0,521	0,045
TyrTrans	5	0,294	0,587	0,718	-0,083
ZuBeCa3	3	0,691	0,201	0,225	-0,025
Total	62	7.2*10 <sup>-7</sup>	0,997	0,997	

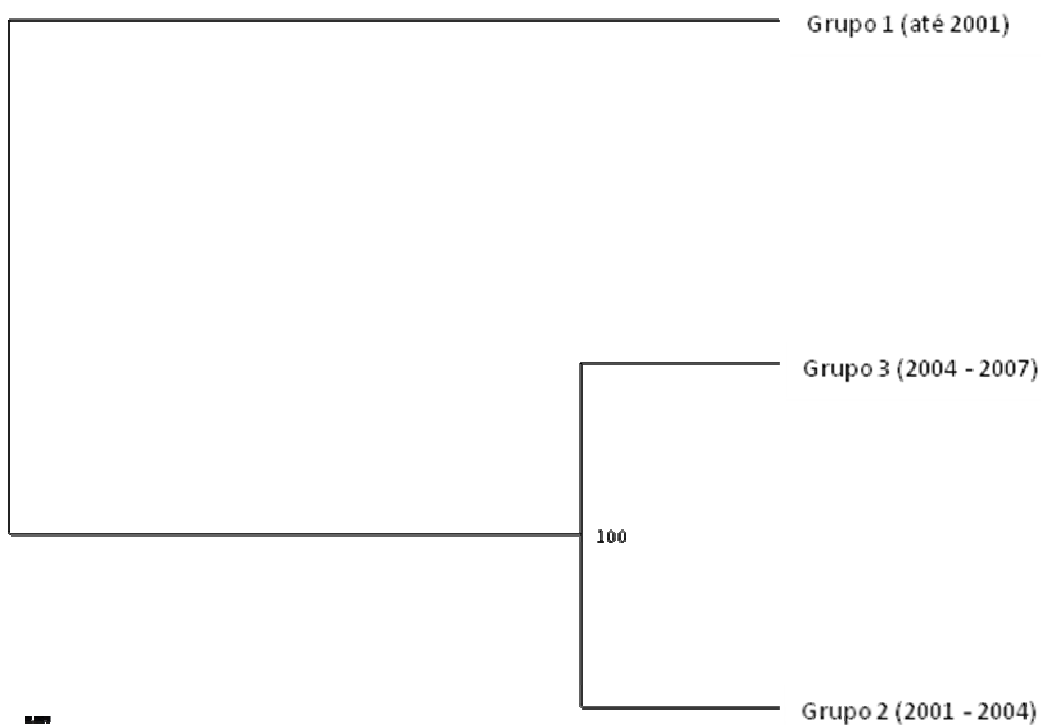
Ao estudar-se a variabilidade genética, é recomendável saber se existem desvios significativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em determinados *loci*. Nos valores de *Fis* para a população em geral, observa-se um deficit de heterozigocidade para os *loci* cGMP (P-val=0,0000; Fis=0,1665), REN05CO7 (P-val=0,0000; Fis=0,0788), REN39L15 (P-val=0,0002; Fis=0,0792) e ZuBeCa3 (P-val=0,0000; Fis=0,0514), enquanto que nos valores dos três grupos em separado verificamos que para o grupo 1 à um deficit de heterozigocidade para os *loci* REN05C07 (P-val=0,0003; Fis=0,1040), REN39L15 (P-val=0,0026; Fis=0,1214) e ZuBeCa3 (P-val=0,0000; Fis=0,1295), para o grupo 2 continuamos a ter um deficit para o *loci* cGMP (P-val=0,0011; Fis=0,2018), por fim no grupo 3 observamos um deficit para o *loci* cGMP (P-val=0,0045; Fis=0,2519), bem como um excesso em relação ao *loci* TyrTrans (P-val=0,0084; Fis= -0,2174).

Pela análise do índice de coascendência  $F_{st}$ , verificamos haver uma diferenciação negligenciável em todos os grupos (Quadro 10).

O dendograma (Figura 4) elaborado com base nas distâncias dos índices de coascendência entre grupos, mostra que o grupo 2 e o grupo 3 estão mais próximos entre si,, estando mais afastados do grupo 1.

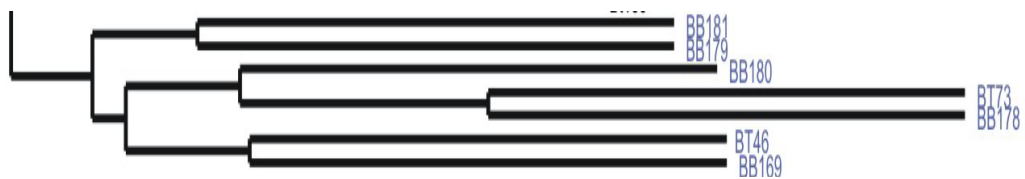
**Quadro 10:** Diferenciação genética entre os grupos estabelecidos  $F_{st}$ .

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Grupo1			
Grupo 2	0,0289		
Grupo 3	0,0160	0,0047	



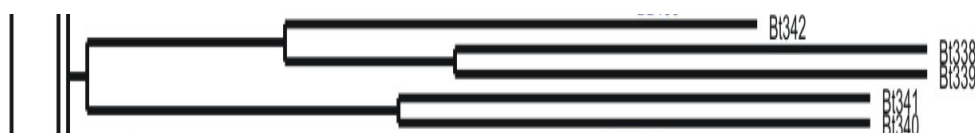
**Figura 4:** Dendograma filogenético representando as distâncias dos índices de coascendencia entre os diferentes grupos estabelecidos.

Quanto ao dendograma constituído com base na matriz das distâncias genéticas calculada por  $1-n^0$  de alelos partilhados entre os indivíduos (Figura 9), mostra claramente a existência de quatro grupos geneticamente diferentes. No primeiro temos um conjunto de 248 indivíduos, pertencentes aos três grupos pré definidos por este estudo consoante a idade, os restantes três grupos são formados por animais nascidos antes de 2001, e são apenas nove indivíduos na sua totalidade, pertencendo sete (BB169, BB178, BB179, BB180, BB181, BT46, BT73) ao segundo grupo (Figura 5), deixando os dois últimos com apenas um animal cada, em que no grupo 3 temos o animal BB129 e no último grupo o animal BB163).

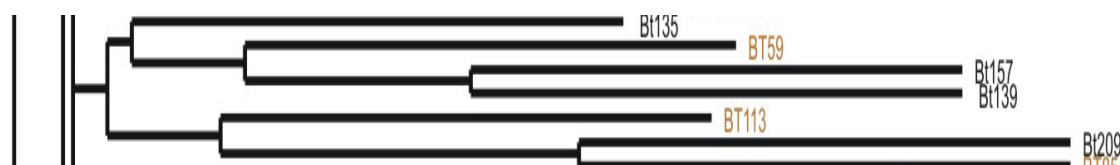


**Figura 5:** Fragmento do dendograma filogenético representado o segundo grupo de animais.

No primeiro grupo de animais conseguimos identificar diversos sub-grupos que são geneticamente próximos. Por exemplo se considerarmos o subgrupo formado pelos animais BT338, BT339, BT340, BT341 e BT342 (Figura 6) observa-se que ambos partilham o mesmo pai e a mesma mãe, o mesmo se sucede com o subgrupo dos indivíduos BT135, BT59, BT157, BT139, BT113, BT209, BT85 (Figura 7).



**Figura 6:** Fragmento do dendograma filogenético representando animais geneticamente próximos.



**Figura 7:** Fragmento do dendograma filogenético representando animais geneticamente próximos.

Também acontece em alguns destes conjuntos de animais existirem indivíduos irmãos apenas para um progenitor, bem como pode acontecer existirem indivíduos que são tios de outros, como é o caso do subgrupo de animais BT126, BT128, BT133, que são irmãos plenos, sendo tios dos animais BT227 e BT230, ou seja os primeiros são filhos do Cão BT29 que por sua vez é avô dos últimos (Figura 8).

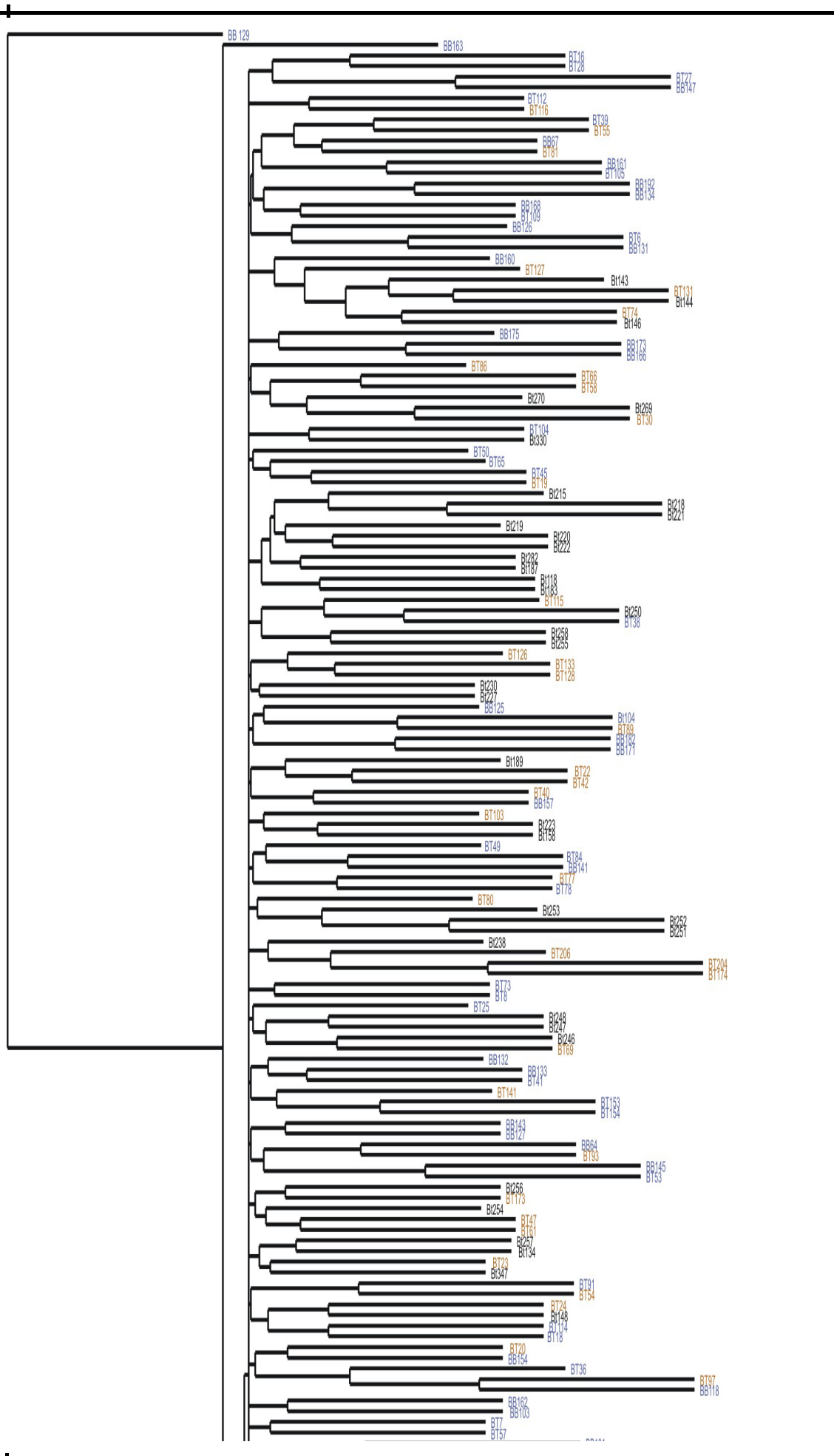


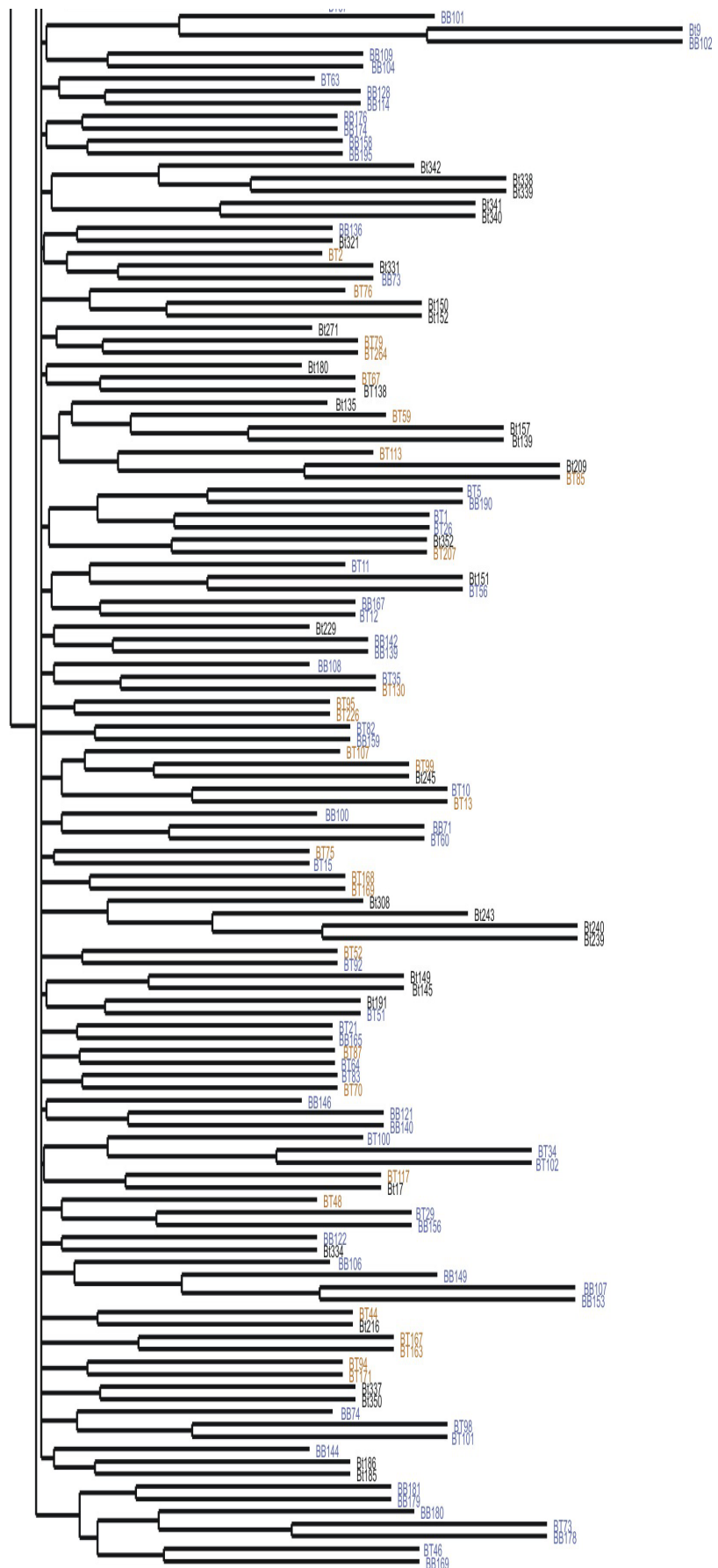
**Figura 8:** Fragmento do dendograma filogenético representando animais geneticamente próximos.

Dos 257 animais estudados, 107 foram analisados em relação à compatibilidade com os supostos pais de acordo com a informação dada pelos proprietários. Como resultado temos 97 indivíduos compatíveis com os progenitores para os 12 microssatélites estudados, enquanto que os restantes são incompatíveis pelo menos para um dos *loci*. No quadro 11 exemplifica-se um animal compatível com ambos os progenitores e outro animal incompatível com o progenitor masculino.

**Quadro 11:** Exemplo de um animal compatível e outro incompatível com os supostos progenitores.

	ACE	REN01O23	cGMP	END	TYR	SAHY	ZuBeCa3	LCAT	REN39L15	REN02K21
<b>BT239</b>	90	190	258	218	116	150	198	128	215	284
<b>(Filho)</b>	98	200	266	218	124	152	198	128	223	288
<b>BT127</b>	98	200	258	218	116	150	198	128	215	284
<b>(Pai)</b>	98	200	258	222	116	152	198	128	223	284.
<b>BT20</b>	90	190	262	218	122	152	198	128	211	278
<b>(Mãe)</b>	90	200	266	218	124	152	198	128	223	288
<b>Amostra compatível com ambos os progenitores</b>										
<b>BT227</b>	88	190	258	218	116	152	198	128	215	284
<b>(Filho)</b>	98	200	262	222	126	152	198	128	219	290
<b>BT226</b>	92	190	258	218	116	152	198	128	219	284
<b>(Pai)</b>	100	198	262	222	124	152	198	128	223	288
<b>BT75</b>	90	190	258	218	116	152	198	128	215	288
<b>(Mãe)</b>	98	200	258	222	126	152	198	130	215	290
<b>Amostra incompatível com um dos progenitores.</b>										





**Figura 9:** Dendrograma filogenético representado as distâncias genéticas entre todos os indivíduos da população.

## Discussão

O Cão Barbado da Terceira foi reconhecido oficialmente pelo Clube Português de Canicultura como raça em 2004. O reconhecimento da raça teve como base o trabalho realizado por Rocha (2002), no qual foi realizada pela primeira vez a caracterização molecular da população existente à data, com o intuito de demonstrar a sua estrutura e distinguir estes animais de outras raças caninas.

Contrariamente, o estudo agora apresentado tem como principais objectivos analisar a evolução genética da população ao longo dos anos, com a intenção de compreender a dinâmica da raça de forma a se conseguir avaliar se a estratégia de cruzamentos está a ser eficiente.

Ao compararmos os dois estudos obtivemos um ganho de heterozigocidade de 0,595 para 0,998, assim como um aumento do número total de alelos, passando a haver 19 novos alelos. Observou-se um ganho de alelos para os *loci* cGMP (6), ACE (1), TyrTrans (1), ZuBeCa3 (7), REN02K21 (2) e REN01O23 (2). Quanto aos *loci* REN39L15 e REN04M22, cada um perdeu um alelo, mantendo-se com igual número de alelos os restantes *loci*. Estes resultados são esperados, visto que Rocha (2002) caracterizou apenas 50 animais enquanto neste trabalho foram caracterizados 257. Ao compararmos os resultados obtidos pelo trabalho de Rocha (2002) com o primeiro grupo de animais pré-estabelecidos neste estudo, ambos representando animais nascidos antes de 2000, também observámos diferenças consideráveis, obtendo-se 11 novos alelos no total, onde os *loci*

---

ACE, TyrTrans e REN01O23 ganharam um alelo cada, o REN02K21 ganhou dois e o cGMP ganhou seis, havendo perda de um alelo nos *loci* REN04M22 e REN39L15, mantendo-se iguais os restantes *loci* em relação ao número total de alelos. Isto pode dever-se ao facto de no presente estudo terem sido caracterizados 122 animais nascidos antes de 2000, mais 72 do que no estudo anterior.

### **Análise de grupos consoante o ano de nascimento dos animais**

A análise dos três grupos pré-estabelecidos neste estudo em relação ao ano de nascimento possibilitou também a identificação de algumas diferenças: verificou-se uma perda de 13 alelos entre o primeiro grupo (animais nascidos antes de 2001) e o segundo (animais nascidos entre 2001 e 2004), havendo um ganho de quatro alelos entre o segundo e o terceiro grupo (animais nascidos após 2004). Se considerarmos que a população geral, constituída pelos três grupos, tem um total de 79 alelos verificamos que existem alelos que não estão presentes no primeiro grupo (71 alelos), estando nos últimos dois grupos (58 e 62 alelos). Desta forma existe uma perda significativa de alelos entre o primeiro e os últimos dois grupos, o que representa um empobrecimento genético da população, como tal este processo terá que ser contrariado.

Sendo a genética de populações o estudo dos parâmetros de variação genética encontrados dentro de grupos e como estes mudam ou evoluem ao longo do tempo. O conjunto de genes (*gene pool*) de uma população é o total

---

de todos os genes dentro de uma população mendeliana e é descrito consoante as frequências génica e genotípica. A lei de Hardy-Weinberg descreve o que acontece com as frequências génicas e genotípicas de uma população onde ocorrem acasamentos aleatórios e livres de forças evolutivas. Quando estas condições se observam, a frequência génica não se altera, e a frequência genotípica estabiliza após uma geração com as proporções  $p^2$ ,  $2pq$ ,  $q^2$ , onde  $p$  e  $q$  são a frequência génica da população. Mudanças nas frequências génicas e/ou frequências genotípicas através do tempo podem acontecer por mutação, migração, selecção natural ou deriva genética (Lewin, 2000). No entanto, considerando a população caracterizada neste estudo e os dados anteriormente descritos, pode também justificar-se o aparecimento destes “novos” alelos com a introdução de novos indivíduos não caracterizados e que sejam progenitores dos animais pertencentes aos grupos de animais nascidos após 2001.

Quanto aos resultados obtidos na heterozigocidade observada, registou-se uma ligeira diminuição da heterozigocidade, passando de 0,998 para 0,994 do grupo um para o grupo dois, aumentando para 0,997 no grupo três. Desta forma não se estará a perder heterozigocidade ao longo do tempo, apesar de ter havido um decréscimo no grupo dois.

Pela análise do índice de co-ascendência destes grupos, verificamos uma diferença genética negligenciável em todos os grupos, sendo esta menor entre os grupos de animais nascidos entre 2001 e 2004 em relação aos animais nascidos após 2004, e uma diferenciação maior destes últimos em

---

relação aos animais nascidos antes de 2001. Isto poderá dever-se aos animais do grupo três serem na sua maioria descendentes de animais do grupo dois.

### **Análise genética da população do Cão Barbado da Terceira em geral**

Ao observar as diferenças genéticas entre os indivíduos, conseguimos identificar um grupo dominante de 248 animais geneticamente semelhantes, havendo apenas nove indivíduos que se distinguem geneticamente deste. Ao analisarmos o primeiro grupo de animais, consegue-se identificar diversos subgrupos que se formam devido à grande proximidade genética existente entre estes indivíduos, que na maioria dos casos são parentes próximos entre si. Entende-se por consanguinidade a reprodução de organismos que se encontram relacionados entre si através de ancestrais. A relação entre os indivíduos depende logicamente da dimensão da população, considerando o número possível de antepassados. Numa população em que cada organismo tem dois pais, quatro avós, oito bisavós, etc., em  $t$  gerações terá  $2^t$  antepassados. Assim, qualquer par de indivíduos estará relacionado entre si, através de um ou mais antepassados comuns num passado longínquo. Quanto mais pequena for a população em gerações anteriores, mais próximos estarão os antepassados comuns. Assim, numa população pequena, a probabilidade de dois indivíduos se encontrarem ligados por antepassados comuns é superior do que numa população maior (Glowatski-Muller *et al*, 1995). Desta forma, a população do Cão Barbado da Terceira, sendo pequena, corre o risco de entrar neste processo de consanguinidade que poderá ter duas abordagens

diferentes: por um lado, pode corrigir e melhorar a raça para produzir animais de excelente qualidade; por outro, a consanguinidade excessiva pode provocar uma perda de vigor da raça, bem como distúrbios na saúde do animal.

Para se evitar a consanguinidade deve ter-se em atenção os reprodutores a serem utilizados, devendo-se tentar aumentar o número de machos a utilizar, tendo em atenção as suas características. Neste estudo, ao analisarmos a paternidade de 107 animais, observámos a utilização de 35 reprodutores diferentes, mas com uma grande diferença no número de filhos de cada um. Por exemplo, o animal BT29 é o progenitor de 24 animais, o BT97 é pai de 14 indivíduos, e o BT22 de 13 filhos. No entanto, a maioria dos restantes progenitores deste estudo são pais apenas de um a quatro indivíduos. Deverá ter-se em atenção estes números de forma a tentar equilibrar a quantidade de filhos por reprodutor.

### **Testes de Paternidade**

Em todo o processo de melhoramento animal, qualquer que seja a espécie em causa, uma correcta identificação individual dos animais e um controlo adequado das genealogias revelam-se de importância fundamental. De facto, sem a validação dos registos genealógicos através de um método seguro e eficaz, podem incorrer erros sistemáticos e persistentes na escolha dos reprodutores, pondo em causa os objectivos delineados pelo tipo de selecção escolhido. O parentesco inequívoco entre os indivíduos de uma

população é condição para um programa de melhoramento genético eficiente (Glowatski-Muller *et al*, 1995).

Quanto aos testes de paternidade efectuados neste estudo, confirmamos a compatibilidade na maioria dos animais em que se conheciam os progenitores através de dados cedidos pelos criadores, desta forma a existência de *pedigrees* certificados pode ser benéfica para que a raça tenha uma evolução positiva, evitando fenómenos de *inbreeding*.

## Referências Bibliográfica

- Andrade, J.L.F., Silva, N.A., Coutinho, L.L. Inovação do método de extracção em suínos. 52º Congresso Brasileiro de Genética, Foz do Iguaçu, PR. 2006.
- Andreoli, G. Le Chien: comportement, psychologie, attitudes. Librairie Gründ, Paris, França. 1992.
- Arranz, J. J., Bayón, Y. e Primitivo, F. S. Comparasion of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. *Animal Genetics*, 27, 415-419. 1996.
- Bettencourt, V. L. Os bovinos da Ilha Terceira. Livraria Editora Andrade, Angra do Heroísmo. 1923.
- Brent, W. M. *The Estimation of Genetic Distance and Population Substructure from Microsatellite Allele Frequency Data*. Department of Biology, McMaster University, Hamilton. 1996.
- Brookfield, J. F.Y. A simple new method of estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5, 453-455. 1996.
- Cellen, D. F., Thompson, A. H., Shen, Y., Philipps, H. A., Richards, R. I., Mulley, J. C. e Sutherland G. R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellites marker. *American Journal of Human Genetics*, 52, 922-927. 1993.
- Ciampolini, R., Moazami-Goudarzi, K., Vaiman, D., Dillman, C., Mazzanti, E., Foulley, J., Leveziel, H. E Cianci, D. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysisof the genetic

variability within and between Italian beef cattle breeds. *Journal of Animal Science* 73, 3259-3268. 1995.

Clutton-Brock, J. Dog. In Mason, I. L. (ed.) *Evolution of domesticated animals*. Longman, London, New York. 1984.

Clutton-Brock, J. Introduction. In *Dogs Through Time: an Archaeological Perspective*. Proceedings of the 1<sup>ST</sup> ICAZ Symposium on the History of the Domestic Dog; Eight Congress of the International Council for Archaeozoology (ICAZ98). August 23-29, 1998. Victoria, B.C., Canada, Crockford, S.J. (ed.) BAR International Series 889. Archaeopress, Oxford, 3-7. 2000.

Clutton-Brock, J. Origins of the domestic dog: domestication and early history. In *The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people*, Serpell, J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, 7-20. 1995.

Coppinger, R. e Schneider, R. Evolution of working dogs. In *The Domestic Dog: its evolution, behaviour and interactions with people*, Serpell, J. (ed.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kindgom, 21-47. 1995.

Cruz, C.M.O. As raças portuguesas de cães de gado e de pastoreio. Aspectos morfológicos e comportamentais. Dissertação de mestrado em produção animal. Universidade Técnica de Lisboa. 2007.

FCI (Fédération Cynologique Internationale). Complement d'information a l'annexe n° 7. Commission Scientifique. Propositions sur les règlements de la F.C.I. concernat la reproduction dans et entre variétés de races. Não publicado, Bélgica. 1983.

- Ferguson, A., Taggard J.B., Prodhon A., McMeel O., Thompson C., Stone C., McGinnity P., Hynes R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *J Fish Biol.*, 47, 103-126. 1995.
- Ferrell, R. E., Morizot, D. C., Horn, J. e Carley, C. J. Biochemical markers in species endangered by introgression: the red wolf. *Biochemical Genetics*, 18, 39-49. 1978.
- Fox, M.W. Behaviour of wolves, dogs and related canids (reprint). Robert E. Krieger Publishing Company, Florida, E.U.A. 1971.
- Garcia-Moreno, J., Matocq, M. D., Roy, M.S., Geffen, E. e Wayne, R. Q. Relationship and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conservation Biology*, 10, 376-389. 1996.
- Glowatski-Mullis, M. L.; Gaillard, C.; Wigger, G. Microsatellite-based parentage control. *Animal Genetics*, 26, 7-12. 1995.
- Gottelli, D., Sillero-Zubiri, C., Applebaum, G. D., Roy, M. S., Girman, D. J., Garcia-Moreno, J., Ostrander, E. A. e Wayne, R. K. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian Wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3, 301-312. 1994.
- Guo, Q., Shibuya, H., Nonneman, D., Liu, P. C., Huang, T. H. M. e Johnson, G. S. A polymorphic (CA)<sub>n</sub> microsatellite in an intron of the canine *Lecithin: cholesterol acyltransferase* gene. *Animal Genetics*, 29, 328. 1998.
- Hart, D.L. Analysing breed and gender differences in behaviour. In Serpell, J. (ed.) *The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with*

- people ( 65-77). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 1995.
- Hartl, D. L. e Clark, A. G. Principals of Populations Genetics. 3ª edição. Sinauer Associates Inc., Canadá. 1997.
- Hedrick, P. W. Genetics of populations. 2ª edição. Jones and Bartlett Publishers, Massachusetts. 2000.
- Hughes, C. Integrating molecular techniques with field methods in studies of social behaviour: a revolution results. *Ecology*, 79, 383-399. 1999.
- Jouquand, S., Priat, C., Hitte, C., Lachaume, P., André, C. e Galibert, F. Identification and characterization of a set of 100 tri- and dinucleotide microsatellites in the canine genome. *Animal Genetics*, 31, 266-272. 2000.
- Khan, S., Shibuya, H., Nonneman, D., Liu, P. C., Huang, T. H. M. e Johnson, G. S. A polymorphic (TG)<sub>n</sub> microsatellite in an intron of the canine tyrosine transaminase gene. *Animal Genetics*, 29, 322. 1998b.
- Klug, W.S. e Cummings, M. R. Concepts of Genetics. 4ª edição. Prentice-Hall, Inc., New Jersey. 1994.
- Knippers, R. Molekulare Genetik 6ª edição. George Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 1995.
- Kremer, A., Petit, R. J. e Pons, O. Measure of polymorphism within and among populations. In: Karp, A., Isacc P. G. e Ingram, D. S. (eds) *Molecular Tools for screening Biodiversity*, 301-311. Chapman & Hall, London. 1998.
- Lange K. E. A ligação do homem ao cão. *National Geographic*. Janeiro 2002, 44. 2002.

- Lewis, B. Genes VII. Oxford University Press and Cell Press. 2000.
- Liu, P. C., Chen, Y. W., Shibuya, H., Katz, M. L., Lubahn, D. B. e Johnson, G. S. A polymorphic (GA)<sub>n</sub> microsatellite in an intron of the canine endothelin-B receptor gene. *Animal Genetics*, 29, 236. 1998a.
- Liu, P. C., Shibuya, H., Lubahn, D. B. e Johnson, G. S. A polymorphic (CT)<sub>n</sub> microsatellite in an intron of the canine SA-hypertension gene. *Animal Genetics*, 29, 72. 1998b.
- Lorenz, K. Man Meets Dog. Methuen, London. 1954.
- Louis, E. J. e Dempster, E. R. Na exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics*, 43, 805-811. 1987.
- Lyons, L. A., Kehler, J. S. e O'Brien, S. J. Development of comparative anchor tagged sequences (CATS) for canide genome mapping. *Journal of Heredity*, 90, 15-26. 1999.
- MacHugh, D. E., Loftus, R. T., Bradley, D. G., Sharp, P. M. e Cunningham, P. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proceedings of the royal Society of London*, 256, 25-21. 1994.
- MacHugh, D. E. Molecular Biogeography and Genetic Structure of Domesticated Cattle. Thesis submitted to the University of Dublin for the degree of Doctor of Philosophy, Dublin. 1996.
- Majerus, M., Amos, W. e Hurst, G. Evolution: The Four Billion Year War. 1<sup>a</sup> Edição. Longman, London. 1996.
- Marcenal, L. N., Aunblet, H. e D'Autheville, P. Enciclopédia do cavalo. Vol. I. Andrei Editora, Lda. S. Paulo. 1990.

- Matioli, S.R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleícos. *Biologia Molecular e evolução*, 202. Ribeirão Preto. 2001.
- Melo, D.C. de, Oliveira, D.A.A., Seerig, A., Carvalho, D.C. de. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de planteis de Tilápia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, 32 (4), 220-224. 2008.
- Milach, S.C.K. Marcadores de ADN. *Biotechnol Ciênc Des*, 5, 14-17. 1998b.
- Milach, S.C.K. Marcadores de ADN em plantas. UFRGS, Porto Alegre. 141. 1998a.
- Minch, E. MICROSAT Version 1.5b. Stanford University Medical Center, Stanford, Califórnia. 1997.
- Müller, H., Ziegler B. e Scheweizer, B. UV-VIS spectrometric methods for qualitative and quantitative analysis of nucleic acids. *International spectroscopy laboratory*, 4, 4-11. 1993.
- O'Brien, S. J., Weinberg, J. e Lyons, L. A. Comparative genomics: lessons from cats. *Trends in Genetics*, 13, 393-399. 1997.
- Oliveira, A.A. Estudo biométrico, funcional e histórico dos Cães Barbados da Ilha Terceira para o seu reconhecimento como raça. Relatório de estágio da licenciatura em Engenharia Zootécnica, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo. 1998.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I. E Strobeck, C. Microsatellites analysis of population structure in canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4, 347-354. 1995.

- Paetkau, D. e Strobeck, C. The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*, 4, 519-520. 1995.
- Pemberton, J. M., Slate, J., Bancroft, D. R. e Barret, J. A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and populations studies. *Molecular Ecology*, 4, 249-252. 1995.
- Powell, W., Machray, G. C. e Provan, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 7, 251-222. 1996.
- Price, E. O. Behavioral aspects of animal domestication. *The Quarterly Review of Biology*, 59 (1), 1-32. 1984.
- Price, E. O. Behavioural genetics and the process of animal domestication. In *Genetics and the behaviour of domestic animals*, Grandin, T. (ed.). San Diego: Academic Press, 31-65. 1997.
- Raymond, M. e Rousset, F. GENEPOP (versão 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86, 248-249. 1995.
- Rocha, A. Contributo para a caracterização do Cão Barbado da Ilha Terceira e do Cão de Fila de S. Miguel. Relatório de estágio da Licenciatura em Engenharia Zootécnica, Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Terra Chã. 2002.
- Rodero, E. e Herrera, M. El concepto de raza. Un enfoque epistemológico. *Arch. Zootec.*, 49, 5-16. 2000.
- Russell, P. J. *Genetics*, third edition. HarperCollins Publishers Inc., New York. 1992.

- Sambrook, J., Fritsch, E. e Maniatis, T. Molecular cloning a laboratory manual., 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1989.
- Scott, J.P. e Fuller, J.L. Genetics and the social behaviour of the dog. Chicago: The University of Chicago Press. 1965.
- Shibuya, H., Cassells, M. W., Huang, T. H. M. e Johnson, G. S. A polymorphic (TG)<sub>n</sub> microsatellite in an intron of the canine angiotensin I converting enzyme gene. *Animal Genetics*, 29, 66-67. 1998.
- Switonski, M., Schelling, C., Dolf, G., Stranzinger, G. e Schläpfer, J. Assignment of a canine microsatellite ZuBeCa3 to canine chromosome 9q21-q22. *Animal Genetics*, 29, 322. 1998.
- Teves, F. O Cão de Fila de S. Miguel. Folheto do clube do Cão de Fila de S. Miguel. 1995.
- Thomas, M.R., Scott M.S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 985-990. 1993.
- Van Bragt, P. H. Molecular biological techniques, In Vitro DNA manipulation including PCR and In Situ Hybridization. International Postgraduate Course, 5-12 July, Porto. 1996.
- Veske, A., Nilsson, S. E.G. e Gal, A. Microsatellites (TTCC)<sub>n</sub> polymorphism in an intron 6 of the canine rod photoreceptor Cgmp-gated cation channel  $\alpha$ -subunit gene. *Animal Genetics*, 28, 374-375. 1997.
- Wagner, H. W. e Sefc, K. M. Identity 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna. 1999.

- Wang, X. Phylogenetics systematics of the Hesperocyoninae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 221, 1-207. 1994.
- Wang, X., Tedford, R. H. e Taylor, B. E. Phylogenetic systematics of the Borophaginae (Carnivora: Canidae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 243, 1-391. 1999.
- Wayne, R.K. Cranial morphology of domestic and wild canids: the influence of development on morphological change. *Evolution*, 40 (2): 243-261. 1986.
- Wayne, R.K. e Vilà, C. Phylogeny and origin of the domestic dog. In *The genetics of the dog*, Ruviski, A. (ed.). CAB International, 1-13. 2001.
- Wayne, R. K. e O'Brien, S. J. Allozyme divergence within the canidae. *Systematic Zoology*, 36, 339-355. 1987.
- Wayne, R. K., Lehman, N., Allard, M. W., e Honeycutt, R. L. Mitochondrial DNA variability of the gray wolf: genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 6, 559-569. 1992.
- Wayne, R. K., Geffen, E., Girman, D. J., Koepfli, K. P., Lau, L. M. e Marshall, C. Molecular systematics of the canidae. *Systematics of the Canidae*. *Systematic Biology*, 4, 622-653. 1997.
- Wayne, R. K. Molecular evolution of the dog family. *Trends in Genetics*, 9, 218-224. 1993.
- Wayne, R. K., Nash, W. C., e O'Brien, S. J. Chromosomal evolution of the canidae: II. Divergence from the primitive carnivore Karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 44, 134-141. 1987.

Weir, B. S. e Cockerham, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.

Wurster-Hill, D. H. e Centerwall, W. R. The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 34, 178-192. 1982.

**Anexo 1**

## **Estalão do Cão Barbado da Terceira**

**Origem:** Ilha Terceira – Açores – Portugal.

**Utilização:** Cão de condução de gado por excelência, muito ágil e dinâmico, conduz e junta o gado com grande facilidade, sendo utilizado também no manejo do gado bravo. É utilizado ainda como cão de guarda, função que desempenha com eficácia. Devido ao seu carácter afável e de ensino fácil é um bom cão de companhia.

**Classificação:** 1º Grupo, Cão boieiro.

**Breve resumo histórico:** Com o início do povoamento das ilhas açoreanas, foi necessário controlar e recolher as várias espécies de gado aí introduzidas logo após a sua descoberta. Diversos tipos de cães, entre eles alguns no Continente no manejo do gado, terão chegado aos Açores.

O “Barbado” provavelmente evoluiu de cães trazidos pelos povoadores a partir de séc. XV e que eram utilizados na recolha de gado bravo. Não nos devemos também esquecer que ao longo dos séculos seguintes vários povos acompanhados pelos seus cães, em trânsitos pelas ilhas, terão influenciado decisivamente o que é hoje o Barbado.

**Aspecto geral:** Cão rústico, com corpo forte e bem musculado, coberto de pêlo comprido, abundante e ondulado.

**Proporções importantes:** Cão sub-longilíneo, em que o comprimento do corpo é ligeiramente superior à altura do garrote. O comprimento do crânio é ligeiramente superior ao comprimento do chanfro.

**Comportamento/ carácter:** Cão companheiro e fiel ao dono, inteligente, de ensino fácil, alegre, meigo e voluntarioso.

**Cabeça:** Forte, sólida e proporcional ao corpo. As linhas craniofaciais superiores são paralelas. O comprimento do crânio é ligeiramente superior ao comprimento do chanfro.

### **Região craniana**

**Crânio:** Tamanho médio, ligeiramente abaulado. A depressão longitudinal mediana começa aproximadamente no terço posterior do chanfro, prolongando-se até metade do crânio. Arcadas supraciliares não salientem. A crista occipital é marcada.

**Chanfradura Nasal (Stop):** Pouco pronunciada.

### **Região Facial**

**Trufa:** Grande, cúbica e recta. Bem pigmentada de cor negra admitindo-se o castanho nas pelagens amarelas e branco sujo.

**Chanfro:** Forte, cilíndrico e recto na sua linha superior. É largo com faces laterais paralelas. Maxilares bem desenvolvidos.

**Lábios:** Firmes, grossos e bem pigmentados. Comissura labial pouco evidente.

Dentes: Fortes, sólidos, com caninos bem desenvolvidos. A dentição articula em tesoura ou em pinça.

Faces: Secas de pele aderente.

Olhos: Tamanho médio, com posicionamento semi-frontal, horizontal, de formato oval, expressivo e inteligentes. Cor de mel a castanho escuro. Pálpebras bem pigmentadas.

Orelhas: Inserção média a alta, triangulares, de tamanho médio. Pendentes, quebradas e bem revestidas de pêlo. Têm mobilidade de porte e em atenção levantam na base e dobram para a frente.

Pescoço: Médio, sólido e bem musculado. Bem implantado nos ombros, suportando a cabeça com dignidade.

## **Tronco**

Linha superior: Recta e horizontal.

Garrote: Largo, proporcionando uma boa ligação da linha do pescoço com a linha do dorso.

Dorso: Largo, flexível e bem musculado.

Lombo: Curto e bem unido à garupa.

Garupa: Robusta e ligeiramente descaída.

Peito: Largo e profundo, chegando aos codilhos. Costelas bem arqueadas, com boa capacidade torácica.

Linha inferior e ventre: Ascendente com ventre ligeiramente recolhido.

**Cauda:** Implantação média a baixa. Encurtada até à terceira vértebra ou inteira de tamanho médio, sem ultrapassar o curvilhão. Em repouso a cauda cai e encurta na parte inferior. Admitem-se anuros.

## **Membros**

**Membros anteriores:** Verticais, de ossatura larga, bem musculados e bem aprumados.

**Espáduas:** Bem desenvolvidas e obliquas.

**Angulação escapulo-umeral:** Aberta

**Braços:** Forte, com os codilhos aderentes ao corpo.

**Antebraços:** Verticais.

**Carpos:** Fortes.

**Metacarpos:** Ligeiramente inclinados.

**Mãos:** Grandes e ovais com dedos bem arqueados e almofadas plantares grossas e resistentes. Unhas fortes.

**Membros posteriores:** Robustos e bem musculados. São bem angulados, denotando grande capacidade de impulso.

**Coxas:** Bem desenvolvidas e bem musculadas.

**Pernas:** Compridas. Bem desenvolvidas.

**Angulação fémuro-tibial:** Fechada.

**Tarsos:** Fortes.

**Metatarsos:** Fortes, em posição praticamente vertical com jarretes curtos.

**Pés:** Ovais, dedos bem unidos e arqueados com membrana interdigital não muito pronunciada, podendo apresentar presunhos.

**Andamento:** Andamentos ágeis e com boa impulsão, permitindo bruscas mudanças de direção e transição de movimentos. Passo ligeiramente bamboleante, trote elástico com bom alcance e suspensão. O galope é enérgico e rápido.

**Pele:** Fina, pigmentada e aderente.

**Pelagem:** Comprida, farta, ligeiramente ondulada, nem lisa nem encaracolada, com sub-pêlo abundante em todo o corpo. Admite-se a tosquia de trabalho encurtando o pêlo uniformemente, devendo esta apresentação ser a utilizada em exposições de beleza.

**Pêlo:** Forte, ligeiramente grosseiro mas não áspero. Abundante em toda a cabeça, no focinho e sobre os olhos, onde cai para a frente. Farto na zona mandibular, originando as barbas de onde lhe advêm o nome. Nos membros o pêlo é abundante, inclusive entre os dedos. Abundante na cauda até à ponta.

**Cor:** Amarelo, cinzento, preto, fulvo e lobeiro nas tonalidades claro, comum e escuro, podendo ser manalvos, pedalvos, quadralvos, com frente aberta, encoleirados e com malhas brancas no peito, ventre e ponta da cauda.

### **Altura e Peso**

#### **Altura ao garrote:**

Machos: 52 a 58 cm.

Fêmeas: 48 a 54 cm.

#### **Peso:**

Machos: 25 a 30 Kg.

Fêmeas: 21 a 26 Kg.

**Defeitos:** Qualquer desvio em relação ao estalão deve ser considerado como falta e penalizado na exacta proporção da sua gravidade e das suas consequências na saúde e bem-estar do cão.

### **Defeitos graves**

Comportamento e carácter: Timidez e agressividade.

Trufa: Almarada.

Chanfro: Ponteagudo e estreito.

Pelagem: Pêlo mole e sem subpêlo. Com malhas para além das áreas definidas.

Altura: Excessiva (acima de 60 cm) ou diminuta (abaixo dos 48 cm).

Andamentos: Movimentos sem alcance e propulsão.

### **Defeitos eliminatórios (Desqualificações)**

Maxilas: Prognatismo, Endognatismo.

Olhos: Total ou parcialmente azuis.

Pelagem: De cor castanha ou mosqueada.

Todo o cão que apresenta qualquer nível de anomalia física ou de comportamento deve ser desqualificado.

Nota: Os machos devem sempre apresentar os dois testículos, de aparência normal, bem descidos no escroto.

