

VALORIZAÇÃO DAS EXPLORAÇÕES AGRÍCOLAS



GENÉTICA, BIOTECNOLOGIA E AGRICULTURA

FICHA TÉCNICA



Título	GENÉTICA, BIOTECNOLOGIA E AGRICULTURA
Autores	Albano Beja-Pereira Nuno Ferrand de Almeida
Editor	© SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação Consultadoria Empresarial e Fomento da Inovação, S.A. Edifício “Les Palaces”, Rua Júlio Dinis, 242, Piso 2 – 208, 4050-318 PORTO Tel.: 226 076 400, Fax: 226 099 164 spiporto@spi.pt; www.spi.pt Porto • 2005 • 1.ª edição
Produção Editorial	Principia, Publicações Universitárias e Científicas Av. Marques Leal, 21, 2.º 2775-495 S. João do Estoril Tel.: 214 678 710; Fax: 214 678 719 principia@principia.pt www.principia.pt
Revisão	Marília Correia de Barros
Projecto Gráfico e Design	Mónica Dias
Paginação	Xis e Érre, Estúdio Gráfico, Lda.
Impressão	SIG – Sociedade Industrial Gráfica, Lda.
ISBN	972-8589-57-3
Depósito Legal	233542/05

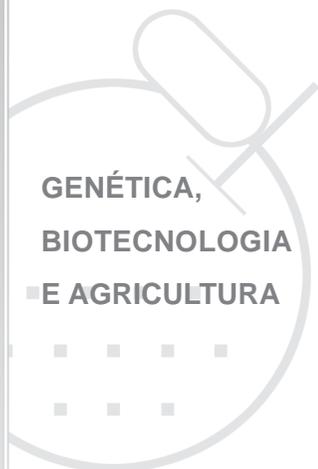


GENÉTICA, BIOTECNOLOGIA E AGRICULTURA

Albano Beja-Pereira
Nuno Ferrand de Almeida



Sociedade Portuguesa de Inovação



Nos últimos anos, o extraordinário desenvolvimento da biologia molecular, a sequenciação completa e cada vez mais rápida dos genomas de muitas espécies de plantas e de animais domésticos, e a emergência da genómica e da biotecnologia ameaçam mudar drasticamente a agricultura tradicional. Depois de milhares de anos a moldar lentamente os organismos através de processos delicados e fascinantes, a espécie humana confronta-se actualmente com a necessidade de continuar a aumentar os níveis de produção em virtude de um crescimento demográfico que não regista, ainda, um abrandamento significativo. Para isso

conta com técnicas tão variadas como a inseminação artificial, a produção de animais e plantas transgénicos, a clonagem, a detecção e análise dos genes que determinam as características complexas, a selecção assistida por marcadores, entre muitas outras. No geral, a crescente aplicação destas técnicas poderá conduzir a uma situação de progressiva homogeneização genética do muito reduzido número de espécies domésticas que proporcionam a grande parte dos recursos alimentares de mais de seis biliões de pessoas. Ao mesmo tempo, a enorme diversidade de populações, raças e variedades locais de plantas e animais que o homem aperfeiçoou desde o Neolítico, e a que hoje se chama recursos genéticos, corre um sério risco de extinção cujas implicações serão imensas.

Com esta publicação pretende-se fazer um pequeno sumário do estado actual do conhecimento nas áreas que resultam da intersecção das modernas técnicas da genética molecular, da biotecnologia, e da caracterização, utilização e conservação dos recursos genéticos. Os dois primeiros capítulos começam por fazer uma breve descrição do que foi a invenção da agricultura e a domesticação de plantas e animais, e terminam com a situação pós-Revolução Industrial e o reconhecimento da necessidade de garantir a conservação dos recursos genéticos tidos como parte integrante das políticas de desenvolvimento sustentável. O terceiro capítulo é dedicado à descrição das metodologias actualmente disponíveis para proceder à caracterização molecular da diversidade biológica e o quarto capítulo revê algumas noções básicas de genética populacional. O quinto capítulo sintetiza as principais formas de inferir os processos históricos que terão estado na base dos padrões de diversidade

genética que caracterizam hoje as populações e o sexto capítulo é dedicado à vasta aplicabilidade dos diferentes tipos de marcadores moleculares em questões tão relevantes como a identificação individual ou a verificação do parentesco. Finalmente, os dois últimos capítulos descrevem os principais avanços da biotecnologia e algumas das suas possíveis repercussões na agricultura de hoje, bem como as principais estratégias adoptadas a nível nacional e internacional para assegurar uma gestão e conservação adequada dos recursos genéticos locais.

ALBANO BEJA-PEREIRA
NUNO FERRAND DE ALMEIDA

A BIOLOGIA DA DOMESTICAÇÃO

A domesticação de espécies animais e vegetais iniciada pelos povos caçadores-recolectores do Crescente Fértil alterou irremediavelmente o modo de vida da humanidade.

O B J E C T I V O S

- Localizam-se no tempo e no espaço os principais centros de domesticação e refere-se a subsequente expansão das economias agro-pastoris na Europa.
- Descrevem-se as principais alterações fenotípicas sofridas pelos animais e plantas com o decurso da domesticação.



ENQUADRAMENTO Actualmente, 99% da humanidade depende directamente dos produtos agrícolas e animais e dos seus derivados para se alimentar, bem como do que resulta como combustível, fertilizante para os solos, produção de vestuário e calçado, cosmética e força de tracção. Contudo, os motivos exactos que levaram a humanidade a domesticar animais e plantas são múltiplos e por isso pouco conhecidos. A comunidade científica tem desenvolvido algumas teorias explicativas mais ou menos consensuais. No entanto, de forma a simplificar a descrição desta grande revolução que foi a agricultura, e obviamente por razões de espaço, adopta-se aqui a mais consensual destas teorias explicativas: a teoria do determinismo ambiental. Até à data, estão identificados seis centros principais de origem ou domesticação no Velho Mundo (Próximo Oriente, Vale do Indo, Ásia Central, Sudeste Asiático, Bacia do Mediterrâneo e Norte de África) e dois no Novo Mundo (América Central e Cordilheira Andina). Destes vários centros de domesticação, o do Próximo Oriente, ou Crescente Fértil, é tido como o primeiro e o mais importante de todos pelo número de espécies domesticadas e por ter sido o precursor das civilizações ocidentais. Existem, ainda, outras regiões onde ocorreu a domesticação de espécies animais ou vegetais mas que, pela sua menor importância, são consideradas centros secundários de domesticação. Os eventos que conduziram à domesticação e posterior difusão da agricultura não ocorreram em simultâneo, mas sim de uma forma difusa, ao longo de uma determinada época que se convencionou designar por *Neolítico*.

A DOMESTICAÇÃO DAS PRIMEIRAS PLANTAS

O homem aprendeu a controlar e a tomar partido do ciclo de vida de algumas gramíneas (trigo, cevada e linho) há cerca de 17 000 anos. Em resultado disto, alguns povos do Crescente Fértil passam a ter uma fonte de alimentos permanente e segura. A partir daqui, tornou-se necessário proteger as áreas de cultivo e proceder à sua colheita no devido tempo, pelo que esses povos começaram a diminuir o ritmo e a amplitude das suas deslocações para recolher alimentos, e foram-se tornando sedentários. A pouco e pouco, pequenos grupos de indivíduos começam a organizar-se para controlar uma determinada área geográfica, e surgem então os primeiros povoados na região da Mesopotâmia (presentemente parte do Iraque, Turquia, Síria e Irão). Mas não foi só o homem que mudou o seu estilo de vida. O clima do hemisfério Norte também começou a mudar a seguir ao final da última época gla-

ciar, causando um aumento gradual da temperatura e da aridez, que terão começado a comprometer o desenvolvimento de certas plantas.

Há cerca de 15 000 a 12 000 anos, os primeiros povos constituídos por agricultores passam por uma expansão demográfica, fruto da abundância alimentar resultante do cultivo e colheita de cereais e de outras espécies vegetais entretanto domesticadas. Porém, o aumento da aridez começa a reflectir-se na diminuição de zonas ricas em pastagens, obrigando alguns animais herbívoros delas dependentes a procurar activamente essas zonas. Como a disponibilidade de água sempre teve um papel importante no estabelecimento de zonas de cultivo e fixação das comunidades humanas, é possível que, rapidamente, animais herbívoros e agricultores tenham começado a competir pelo mesmo espaço.

Nestas condições, pensa-se que, por essa altura, um grande número destes animais passou a partilhar o seu território com a espécie humana, sendo visto não só como uma fonte de alimento, mas também como uma ameaça às suas culturas agrícolas. Assim, à crescente procura de alimentos em virtude da explosão demográfica, que terá levado à desflorestação e ao esgotamento nutritivo dos solos, juntou-se a «aproximação» forçada de algumas espécies animais. Desta forma, ficaram então reunidas as condições para se dar o passo seguinte, a domesticação dos animais.

A DOMESTICAÇÃO DOS PRIMEIROS ANIMAIS

Com a excepção do cão, que se pensa ter sido domesticado a partir do lobo muito antes da invenção da agricultura, o primeiro animal domesticado terá sido a cabra, seguida da ovelha, vaca e porco. Por razões óbvias, os arqueólogos foram os primeiros a analisar os achados provenientes de jazidas arqueológicas, e como a maior parte dos materiais que estudavam eram ossos provenientes de latrinas ou despojos alimentares de povoados antigos, foi necessário estabelecer diferenças entre os ossos de um animal selvagem e os de um animal doméstico. Concluiu-se rapidamente que existiam com frequência diferenças morfológicas (no tamanho e na forma) capazes de permitir a correcta identificação da maior parte das espécies domésticas.

Assim, e por ordem cronológica, a cabra terá sido o primeiro animal a ser domesticado a partir da cabra selvagem (*Capra aegagrus*) do Próximo Oriente, há cerca de 12 000 anos, seguindo-se a ovelha, domesticada a partir do muflão euro-asiático (*Ovis orientalis*) há aproximadamente 10 800 anos.

A vaca apareceu um pouco mais tarde (há cerca de 9000 anos) e foi domesticada a partir do auroque (*Bos primigenius*), actualmente uma espécie já extinta. Pensa-se que a domesticação do porco tenha ocorrido em paralelo à da ovelha e à da vaca, tendo como origem o javali euro-asiático (*Sus scrofa*). Posteriormente, deu-se, noutras regiões, a domesticação de mais duas linhagens de bovinos: o bovino africano, que terá ocorrido no Nordeste de África, e o zebu, no Vale do Indo.

Terminada a domesticação dos cereais e de algumas espécies animais por volta do sexto milénio antes de Cristo (a.C.), as primeiras comunidades de agricultores iniciaram uma nova fase: a expansão pelo velho Mundo.

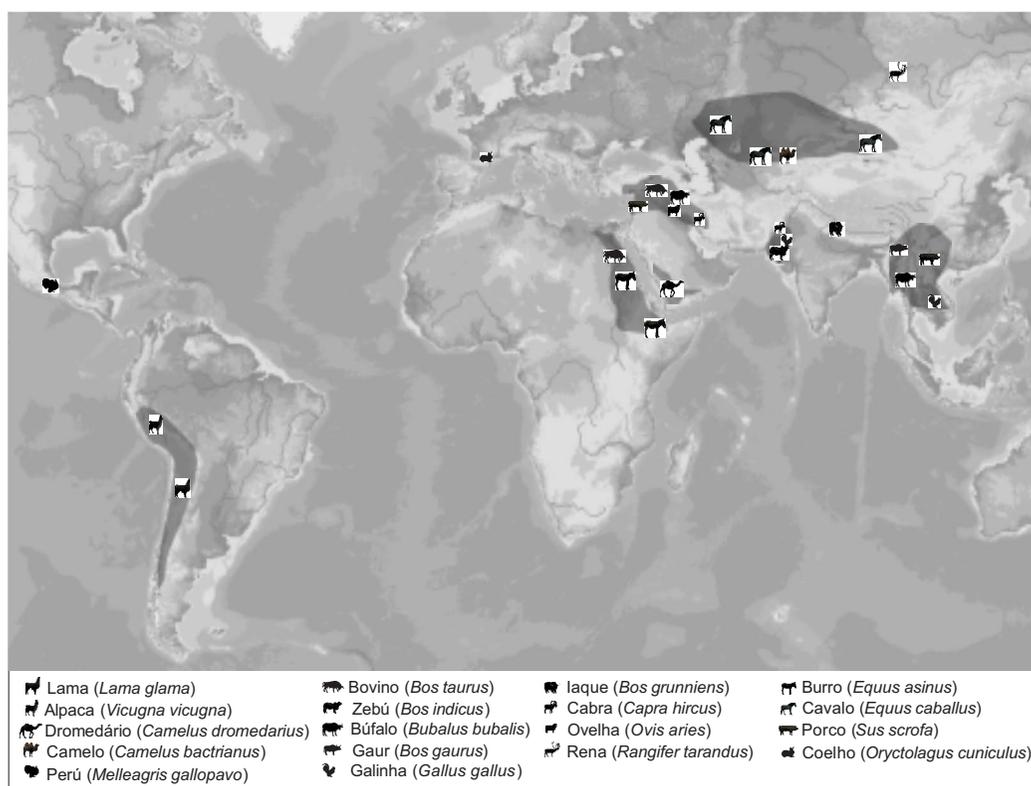


Figura 1.1 • Principais centros de domesticação animal

A EXPANSÃO AGRÍCOLA NA EUROPA

A partir do sexto milénio a.C., começam a encontrar-se os primeiros vestígios da chegada dos agricultores ao Sudeste Europeu (Grécia, Bulgária). A

partir desta região, a expansão dividiu-se em duas correntes, continuando para o Ocidente e Norte da Europa. A primeira terá seguido ao longo do vale fértil do rio Danúbio e dos seus afluentes, estendendo-se até às planícies centro-europeias, de onde continuou rumo à península Escandinava e ao Noroeste de França. A segunda dirigiu-se para Ocidente, ao longo da costa Mediterrânica, até atingir a franja Atlântica da Península Ibérica.

Ao longo do trajecto de expansão da agricultura, os povos indígenas pre-existentes na Europa foram sendo gradualmente substituídos ou aculturados (neolitização) pelas sucessivas hordas de agricultores vindos do Oriente, no espaço de 3000 anos. Em resultado disto, a grande maioria das espécies domésticas (animais e vegetais) europeias dos dias de hoje é derivada das domesticações ocorridas no Crescente Fértil.

Enquanto decorria a neolitização da Europa, deu-se início a uma nova vaga de domesticação de espécies animais. Por esta altura, as estepes Euro-asiáticas estavam cheias de povos pastoralistas que começaram a sofrer as consequências da sobre-pastorícia e da desflorestação que, em conjunto com a subida da temperatura, culminou na quase desertificação de grandes territórios. À medida que a aridez crescia, estes povos viram-se obrigados a aumentar a amplitude e a frequência das suas deslocações em busca de novas pastagens para os seus animais. Pensa-se que esta possa ter sido a principal razão que levou estes povos a domesticar o cavalo por volta do sexto milénio a.C., uma espécie que posteriormente se veio a revelar uma preciosa arma de guerra permitindo a supremacia e expansão de povos como os Mongóis ao longo da Eurásia. Os mesmos motivos poderão ter justificado a domesticação de outras duas espécies – o burro e o camelo – pelos povos da Ásia Central, Península Arábica e Nordeste Africano, com o intuito de auxiliarem o movimento de pessoas e bens.

O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DAS RAÇAS

Sem se darem conta, os primeiros agricultores tornaram-se os primeiros indivíduos de uma espécie a decidir o futuro de outros indivíduos de outras espécies. Ou seja, o homem do Neolítico, ao julgar e decidir empiricamente sobre quais dos seus animais seriam os futuros reprodutores dos seus rebanhos e quais as sementes que seriam lançadas à terra na época seguinte, tornou-se, simultaneamente, o primeiro geneticista. Ao longo dos tempos, os caprichos do homem e a força da natureza foram moldando a forma e o ciclo de vida das espécies animais e vegetais domésticas.

Nas plantas, a intervenção do homem foi sobretudo relacionada com a produtividade e a adaptação a novas condições climáticas. Sempre que o homem colonizava uma nova região, confrontava-se, uma vez mais, com um clima de características diferentes, solos diferentes e novas pragas. Os primeiros agricultores estavam conscientes de que as colonizações de novos territórios dependiam do aproveitamento de recursos nativos existentes na área. Por isso, aprenderam, desde muito cedo, a utilizar o cruzamento das suas plantas domésticas com as espécies semelhantes nativas de cada região, acelerando a sua adaptação a novas condições. Foi assim, por exemplo, que surgiram as variedades locais das espécies cerealíferas domesticadas no Crescente Fértil.

No caso das plantas, houve algumas dificuldades relacionadas com o seu sabor e a possibilidade da sua digestão e absorção pelo sistema digestivo humano. É senso comum, nos dias de hoje, saber que alguns sabores estão associados a substâncias químicas tóxicas (por exemplo, saponina, solanina, glicosinato, ácido oxálico), mas para os primeiros agricultores as coisas não terão sido tão fáceis. E, uma vez mais, a capacidade de intervenção do homem para gradualmente retirar ou eliminar muitas destas substâncias tóxicas ou indigestas das plantas foi notável. Para suplantar este problema, desenvolveu técnicas como a enxertia em plantas arbóreas e aprendeu a controlar os cruzamentos entre espécies de forma a reduzir algumas substâncias nocivas. Aprendeu, também, que o facto de cozinhar destrói ou inactiva certas substâncias tóxicas e que a produção de farinha (moagem) a partir de algumas plantas ou sementes destrói algumas fibras mais grosseiras que o aparelho digestivo, por si só, não consegue digerir. Os glicosinatos e os tiocianatos, que estão presentes em plantas como a couve, inibem a captação de iodo pela tiróide e favorecem o aparecimento do bócio, constituem um bom exemplo de substâncias que podem ser eliminadas através de uma simples cozedura. Uma outra forma bastante interessante de apreciar como o homem resolveu o problema do cheiro e do sabor desagradáveis de alguns alimentos foi a utilização de plantas que, pelo seu sabor e odor concentrados, permitiam disfarçar ou atenuar outros aromas. As plantas aromáticas utilizadas na confecção de alimentos em certas regiões do Mediterrâneo, de África e da Índia são disto um bom exemplo.

Nos animais, o processo de diferenciação de variantes ou raças locais foi mais moroso e especializado. Deve entender-se por raça, um conjunto de indivíduos de características uniformes, com registo de ascendência conhecido, e que em alguns casos têm os mesmos objectivos de selecção. Um dos aspectos que mais distingue os processos de domesticação de animais e de plantas é o reduzido número de espécies animais envolvidas na domesticação. Por exemplo, existem apenas 35 espécies de animais domésticos e destas, segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), apenas cinco (cabra, galinha, porco, ovelha e vaca) produzem a maior parte das neces-

sidades proteicas da espécie humana (i.e., carne, leite, ovos). Por outro lado, menos de 50 raças locais são responsáveis por 90% dessa produção. Assim, nos animais domésticos a diversidade é sobretudo intra-específica, ao contrário das plantas, que exibem várias centenas de espécies domésticas.

Embora também com os animais domésticos o homem tenha sabido tirar partido do seu cruzamento com a fauna local, este foi um processo menos extenso e geograficamente circunscrito a regiões onde existia o ancestral selvagem da espécie em causa. A cabra e o cavalo são bons exemplos da utilização da hibridação com indivíduos da mesma espécie, mas de populações selvagens diferentes, com o provável intuito de trazer uma maior capacidade de adaptação às espécies domésticas alienígenas. Ao longo do tempo, a maior pressão de seleção do homem sobre os animais domésticos levou a uma especialização de certas raças em relação à capacidade de trabalho e à produção de carne, leite, ovos e fibras. Conforme as necessidades de uma determinada região, assim eram seleccionadas as respectivas raças de animais domésticos. Por exemplo, o leite de vaca sempre teve um papel muito importante na alimentação dos povos do Norte da Europa, pelo que sempre existiu uma maior tendência para que as suas raças bovinas tivessem melhores características leiteiras. A nível nacional, um bom exemplo pode ser dado pela especialização das raças de ovelhas do Alentejo, nomeadamente da raça merina, na produção de lã para a indústria têxtil.

CENTRO DE DOMESTICAÇÃO	PLANTAS	ANIMAIS
Mediterrâneo	Ervilha Azeitona Trigo duro Menta	
Próximo Oriente	Trigo Lentilha Aveia Cevada Mostarda Luzerna Couve Uva	Cabra Ovelha Porco Vaca Dromedário Gato Búfalo
Médio Oriente	Amêndoa Pêssego Linho Couve Alho Cenoura Uva Ervilha Algodão Maçã	Cavalo Camelo Ovelha Cabra



Extremo Oriente	Cebola Soja Maçã Alface Nabo	Porco Galinha Carpa Búfalo
Índia	Arroz Laranja Cana-de-açúcar Pimenta preta Pepino Manga Banana Coco	Vaca Galinha
Nordeste Africano	Café Ocre Sorgo	Burro Vaca
México	Milho Papaia Batata-doce Algodão Amaranto	Perú
Andes	Algodão Batata Abóbora Tomate Mandioca Amendoim Ananás	Porco da Guiné Lama Alpaca

Tabela 1.1 • Animais e plantas domesticados e respectivos centros de domesticação

Os RECURSOS GENÉTICOS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Todos os dias um número incerto de raças e variedades animais e vegetais desaparece ao ser trocado ou absorvido por outras com maiores taxas de produção. A fim de procurar inverter esta tendência, torna-se necessário perceber que os recursos genéticos de um país, ou região, constituem um património cultural e biológico único e são parte integrante da sua riqueza.

O B J E C T I V O S

- Define-se o conceito de recurso genético e descrevem-se as principais consequências da mudança nos sistemas de produção agrícola após a Revolução Industrial.
- Debate-se a importância do aproveitamento dos recursos genéticos locais no desenvolvimento sustentável das regiões.



ENQUADRAMENTO Ao longo de milhares de anos, o homem domesticou plantas e animais muito diferentes e transportou-os para lugares distantes, onde os cruzou com formas selvagens e domésticas locais, moldando-os lentamente para satisfação das suas necessidades. Da enorme diversidade e complexidade deste processo resultaram inúmeras populações, raças e variedades locais que hoje se designam por recursos genéticos animais e vegetais, e que se encontram em grande parte ameaçados de extinção pelos sistemas de produção intensiva surgidos na era pós-Revolução Industrial. Actualmente, a adopção e aplicação de medidas agro-ambientais que promovem uma política de desenvolvimento sustentável, associadas à emergência da genómica e da biotecnologia aplicadas, deixam antever um futuro mais promissor para a utilização, gestão e conservação dos recursos genéticos animais e vegetais.

UMA BREVE INTRODUÇÃO HISTÓRICA

Conforme se expôs no final do capítulo anterior, o processo de génese das raças de animais e plantas domésticas deu-se ao nível da adaptação ao meio ambiente e de uma especialização da sua função (alimentar, têxtil, combustível, entre outras). Neste cenário, a selecção sobre caracteres relacionados com um aumento de produção teve, quase sempre, um papel secundário ao longo dos tempos. Porém, este papel vai ser alterado com a Revolução Industrial, no século XIX. Uma das grandes modificações trazidas por esta época da história da espécie humana foi a rápida mudança da estrutura socioeconómica das sociedades ocidentais, caracterizada pelo êxodo das populações do sector primário para o sector secundário, isto é, da agricultura para a indústria, do campo para a urbe. A diminuição da mão-de-obra no campo e o conseqüente aumento da densidade populacional nas zonas urbanas alterou para sempre os sistemas de produção agrícola. Passou a ser necessário produzir mais com menos mão-de-obra, e num mais curto espaço de tempo.

A invenção da agricultura e o seu subsequente desenvolvimento estão intimamente ligados ao sucesso e expansão tecnológica de uma determinada sociedade. Na verdade, nenhuma outra revolução operada por uma sociedade humana desencadeou tantas mudanças nos modos de produção agrícola como a Revolução Industrial, de tal forma que hoje se considera a história da agricultura dividida em dois grandes períodos: antes da Revolução Industrial e depois da Revolução Industrial. Antes da Revolução In-

dustrial, a capacidade agrícola de uma determinada região era o resultado da fertilidade dos seus solos e das condições climáticas que permitiam a produção de matéria vegetal, gerando aquilo que hoje se pode designar como uma produção sustentável. Desta forma, não eram criados mais animais do que aqueles que a produção vegetal de uma determinada zona permitiria alimentar.

A disponibilidade de matéria verde sob a forma de pastagens, ou conservada sob a forma de silagem e de algumas sementes cerealíferas, era a condição determinante para o número de animais a criar. Os anos agrícolas eram bem marcados e qualquer desvio da normalidade (perturbações meteorológicas, novas doenças) condicionava toda a produção de plantas e animais. Assim, a adaptação das espécies domésticas ao meio ambiente e à sua função deu-se de uma forma muito lenta e progressiva durante milhares de anos.

Mas a Revolução Industrial veio alterar profundamente esta ordem, estabelecida desde os tempos do Neolítico. Numa primeira fase da pós-Revolução Industrial, as distâncias geográficas ficaram mais curtas com o desenvolvimento do caminho-de-ferro. Passou a ser mais fácil transferir os recursos excedentes de uma determinada região para outra geograficamente afastada e mais deficitária. Por exemplo, passou a ser possível comprar e transportar cereais de zonas mais produtivas para alimentar os animais de outras regiões mais distantes. De igual forma, o transporte de animais, num curto espaço de tempo, entre regiões afastadas foi grandemente facilitado. Tornou-se possível abastecer os mercados com produtos agrícolas de regiões cada vez mais longínquas. Paralelamente, os progressos na área da química permitiram a criação de fertilizantes que incrementavam a capacidade produtiva dos solos e que, por sua vez, conduziam ao aumento do número de animais sustentados por hectare (encabeçamento). Surgem os primeiros sistemas de produção animal e vegetal completamente destinados ao mercado, levando a que as antigas explorações, que produziam apenas o suficiente para o consumo familiar, começassem a desaparecer e a dar origem a uma produção mais concentrada na exportação para os grandes aglomerados populacionais.

Com o fim da Segunda Guerra Mundial veio a reconstrução da Europa e com ela o desenvolvimento tecnológico chega à agricultura. Desta vez, são as ciências biológicas, nomeadamente a microbiologia, a bioquímica e a genética que tomam a dianteira do conhecimento e da aplicação. Inicia-se, assim, uma nova fase, onde os antibióticos, as hormonas sintéticas e os suplementos nutritivos passam a fazer parte do dia-a-dia da produção animal, enquanto o desenvolvimento de novos pesticidas e fertilizantes marca o ritmo da produção vegetal.

OS RECURSOS GENÉTICOS E O DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Os recursos genéticos domésticos de uma região podem definir-se como o produto da interação entre o homem, um determinado meio ambiente e os indivíduos das espécies domésticas, animais e vegetais, ao longo dos tempos, num processo complexo que conduziu à formação de raças animais e variedades vegetais adaptadas a esse meio ambiente, ao sistema de produção agrícola dessa região e a uma determinada função (alimentação, trabalho, têxtil).

Conforme se referiu anteriormente, a maior parte das espécies domésticas existentes na Europa é originária de outros continentes (Ásia, África, América). Foi, também, referido que sempre que um determinado animal ou planta é retirado do seu meio ambiente e introduzido noutra, que até aí lhe era estranho, precisa de se adaptar às novas condições locais. Ora, a adaptação de um ser vivo a um determinado ambiente é condicionada pela sua capacidade de sobreviver e de se reproduzir com os recursos disponíveis. É sabido que nem todos os indivíduos de uma população, raça ou espécie reagem ao meio envolvente de maneira igual, sobretudo porque entre cada um deles existem pequenas diferenças genéticas que lhes conferem alguma vantagem, ou desvantagem, em situações diferentes daquelas que caracterizavam a sua região de proveniência. Por isso, é necessário que no seio das formas domésticas exista um mínimo de diversidade genética, uma vez que é essa mesma diversidade que vai ditar a sua plasticidade fisiológica e capacidade de adaptação.

Nas espécies domésticas, o homem tem intervindo no sentido de amenizar grandes diferenças ambientais, permitindo-lhes uma adaptação gradual a novas circunstâncias ambientais. Porém, existem limites para além dos quais as pequenas diferenças genéticas que existem entre os indivíduos não são suficientes para garantir a sobrevivência de uma população, raça ou espécie numa determinada região. Um exemplo disto mesmo pode observar-se em certas árvores de fruto, como a bananeira, que não conseguem sobreviver e reproduzir-se naturalmente em regiões muito frias como a Península Escandinava. O mesmo se aplica aos animais, como a cabra ou o dromedário, que por serem originários de zonas mais quentes e áridas não toleram o frio extremo das regiões polares. Portanto, para que uma espécie se adapte a condições adversas, mais ou menos extremas, é necessário que exista um mínimo de diversidade genética nos indivíduos que a constituem. Neste contexto, é da maior importância salientar que são precisamente as pequenas diferenças entre as raças e variedades da mesma espécie doméstica que asseguram a diversidade necessária para sobreviver a alterações climáticas imprevistas ou ao aparecimento de novas doenças. Deste modo, a destruição das raças

ou variedades locais de animais e plantas, que resultaram de milhares de anos de evolução, constitui uma perda terrível e uma grave ameaça para o futuro.

Hoje é bem conhecido o efeito da globalização da agricultura nos países ocidentais da pós-Revolução Industrial. O caso de Portugal não é diferente do dos restantes países ocidentais. Com excepção da introdução de alguns animais da raça bovina Frísia, originária dos Países Baixos, e de algumas espécies vegetais importadas das antigas colónias portuguesas, no final do século XIX, os recursos genéticos nacionais estavam praticamente intactos e não tinham, ainda, sofrido processos de miscigenação com variedades ou raças exóticas. Se se percorresse o Portugal dessa época, seria possível constatar que as raças domésticas variavam de região para região, sendo, por isso, frequentemente designadas pelo seu nome local, e eram raros os casos em que diferentes raças domésticas de uma mesma espécie podiam ser encontradas na mesma região. No Alentejo, por exemplo, existiam apenas os porcos de raça Alentejana, enquanto a Norte do Douro existiam porcos de raça Bísara. Porém, no virar do século, instalam-se as primeiras indústrias, e a construção dos caminhos-de-ferro permite as primeiras importações de raças e variedades domésticas exóticas (ver tabela 2.1). Numa primeira fase, estas importações tiveram como objectivo melhorar alguns caracteres produtivos dos recursos genéticos Portugueses. Posteriormente, as variedades exóticas passaram a ser criadas em linha pura, evitando-se o cruzamento com as raças locais por forma a não perderem as suas capacidades produtivas. Como na sua grande maioria as raças e variedades exóticas conseguiam obter níveis de produtividade muito maiores em condições de exploração intensiva, os agricultores rapidamente optaram por estas em detrimento das raças tradicionais. Em menos de sessenta anos, Portugal e muitos outros países perderam, irremediavelmente, uma parte muito importante dos seus recursos genéticos desenvolvidos durante centenas, ou mesmo milhares de anos.

Mas não há regra sem excepção. As melhorias produtivas das raças exóticas devem-se, sobretudo, a uma intensa selecção genética durante as últimas gerações, com o objectivo de eliminar os indivíduos menos produtivos. Este facto promoveu a erosão de uma grande parte da sua diversidade genética, comprometendo a sua capacidade de adaptação a condições adversas. A raça bovina Frísia é um excelente exemplo disto mesmo. Esta raça foi sendo seleccionada ao longo dos anos no sentido de se conseguir uma eficiente produção de leite em condições intensivas de exploração. Mas isto só se aplica em condições ambientais controladas (estabulação, temperatura, humidade, sanidade), pelo que se se colocarem indivíduos desta raça no meio ambiente próprio de determinadas raças locais, rapidamente baixarão a sua capacidade de produção para níveis iguais ou mesmo menores do que os conseguidos com essas raças locais.

BOVINAS	CAPRINAS	EQUINAS	OVINAS	SUÍNAS
Blue Belgique	Saanen	Andaluz	Awassi	Dannish Landrace
Blond d'Aquitaine	Murciana	Árabe	Ille de France	Duroc
Charolesa	Malaguenha	Hanoveriano	Manchega	Large Black
Gelbvieh		Puro Sangue Inglês	Romanov	Large White
Holstein-Frisian		Sela Francês	Suffolk	Pietran
Jersey				
Limousine				
Normandesa				
Sallers				

Tabela 2.1 • Principais raças exóticas introduzidas em Portugal desde o século XIX

Numa altura em que a actividade agrícola intensiva contribui cada vez mais para a degradação ambiental (isto é, contaminação de recursos hídricos, aquecimento global do clima), é um tremendo contra-senso que os países ocidentais continuem a produzir uma quantidade largamente excedentária de produtos agrícolas (animais e vegetais). Isto é ainda mais grave se se considerar que um terço da população mundial sofre de carências nutritivas e vive abaixo do limiar de pobreza. Em face deste dilema, os países mais desenvolvidos decidiram a adopção de medidas que permitissem contrariar a degradação ambiental e os excedentes agrícolas por eles produzidos. Para tal, a União Europeia tem vindo a fomentar o regresso a uma produção agrícola sustentável.

Assim, desde a década de noventa do século XX que a União Europeia tem vindo a promover a mudança da política agrícola comum (PAC), dinamizando sistemas e métodos de produção agrícola sustentável por forma a enfrentar os novos desafios económicos, sociais e ecológicos impostos no âmbito da Agenda 2000. A legislação comunitária sobre mercados agrícolas tem vindo a ser alterada de maneira a conseguir uma sintonia com as políticas ambientais. De entre as várias medidas até agora aplicadas, as agro-ambientais prevêm uma recompensa financeira aos agricultores cujas boas práticas agrícolas sejam respeitadoras do ambiente e recursos naturais, e nas quais se inclui o uso das raças e variedades locais (recursos genéticos endógenos) nos sistemas de produção agrícola.

Em Portugal, os recursos genéticos animais são constituídos por seis espécies diferentes que se dividem em treze raças de bovinos, catorze de ovinos, cinco de caprinos, duas de suínos e quatro de equinos (três de cavalos e uma de burros), perfazendo um total de trinta e oito raças autóctones, espalhadas por todo o território continental e insular (ver tabela 2.2). Destas, a maioria está classificada como ameaçada de extinção e ao abrigo de medidas agro-ambientais. No que se refere às espécies e variedades domésticas ve-

getais, a informação é mais imprecisa uma vez que o seu número é incomparavelmente superior.

BOVINAS	CAPRINAS	EQUINAS	OVINAS	SUÍNAS
Alentejana	Algarvia	Lusitana	Badana	Alentejana
Arouquesa	Bravia	Sorraia	Terra Quente	Bísara
Barrosã	Charnequeira	Garrana	Galega Bragançana	
Brava	Serpentina	Burro de Miranda	Galega Mirandesa	
Cachena	Serrana		Mondegueira	
Garvonesa			Algarvia	
Maronesa			Serra da Estrela	
Marinhoa			Merino Beira baixa	
Mertolenga			Saloia	
Minhota			Merino Branca	
Mirandesa			Merino Preta	
Preta			Campaniça	
Ramo Grande			Churra entre Douro e Minho	
			Bordaleira entre Douro e Minho	

Tabela 2.2 • Raças de animais domésticos autóctones de Portugal

De uma forma absolutamente coincidente com as preocupações crescentes em relação à caracterização, utilização e conservação dos recursos genéticos, ocorreu uma autêntica revolução na biologia molecular, genética e tecnologias daí derivadas, perfeitamente simbolizada pela conclusão da sequenciação integral do genoma humano no ano 2000. Desde essa altura, a emergência de novas áreas do conhecimento, como a genómica e a biotecnologia aplicada à agricultura, promete mudar por completo a forma como se trabalha no domínio dos recursos genéticos animais e vegetais. Por esta razão, os próximos capítulos são dedicados às técnicas actualmente disponíveis para proceder à caracterização molecular de populações, raças e espécies, a uma breve revisão dos principais conceitos de genética populacional, às inferências que é possível conseguir a partir da análise dos actuais padrões de diversidade genética, e às suas aplicações.

MÉTODOS MOLECULARES NA ANÁLISE DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Os métodos moleculares de análise da diversidade biológica actualmente disponíveis revolucionaram completamente os processos de caracterização dos recursos genéticos animais e vegetais e provocaram avanços sem precedentes no seu conhecimento.

O B J E C T I V O S

- Descrevem-se os principais métodos moleculares que permitem a análise da diversidade biológica.
- Salienta-se a importância decisiva que a descoberta da reacção em cadeia da polimerase teve na revolução molecular.
- Comparam-se as vantagens e limitações dos diferentes métodos na caracterização genética das espécies.



ENQUADRAMENTO Com a descoberta dos grupos sanguíneos, no início do século XX, começou a perceber-se que o genoma das espécies continha alguma variabilidade em relação à qual era difícil definir uma norma, mas foi preciso esperar até ao final da década de 60 para perceber a extensão dessa variabilidade. Nessa altura, dois grupos independentes de investigadores mostraram a enorme variabilidade genética da espécie humana e da mosca-da-fruta através da separação de proteínas mediante a utilização de técnicas electroforéticas, e alteraram radicalmente a perspectiva que então se tinha sobre um genoma essencialmente invariável. Actualmente, o acesso a técnicas de análise genómica directa e a facilidade de obtenção e amplificação do DNA através de PCR deu origem a um variado conjunto de métodos de estudo da diversidade biológica ao nível molecular que revolucionaram a caracterização e conhecimento dos recursos genéticos animais e vegetais.

OS GRUPOS SANGUÍNEOS E AS ALOENZIMAS

A descoberta do grupo sanguíneo ABO no início do século XX, por Landsteiner, e o subsequente reconhecimento de que as suas frequências variavam de forma assinalável de acordo com a população analisada constituíram um primeiro grande avanço na caracterização genética das populações. Pela primeira vez, perspectivava-se a possibilidade de classificar os indivíduos estudados em classes não ambíguas, discretas, o que tornava mais fácil qualquer tipo de comparação entre populações, raças ou mesmo espécies. As décadas que se seguiram assistiram à descoberta de muitos outros grupos sanguíneos, primeiro na espécie humana e depois em muitas raças domésticas, que se tornaram instrumentos relevantes nas primeiras tentativas de estudar a sua origem ou determinar parentescos. Contudo, a generalização deste tipo de trabalho só foi possível com a descoberta da electroforese de proteínas, que permitiu revelar uma quantidade de variação genética nas populações naturais até aí insuspeitada.

A electroforese de proteínas nasceu da combinação de técnicas de separação de moléculas num campo eléctrico com técnicas histoquímicas. As proteínas são produtos de expressão dos genes constituídos por sequências de aminoácidos que ocorrem nos tecidos (sangue, fígado, rim, músculo) e podem, em solução, adquirir carga eléctrica. Dos vinte amino-

ácidos que entram na composição das proteínas, três podem ter carga positiva (arginina, lisina e histidina) e outros dois carga negativa (ácido aspártico e ácido glutâmico). Os restantes quinze são electricamente neutros e não contribuem com carga para a proteína. Como as proteínas diferem na sua sequência primária, as contribuições daqueles cinco aminoácidos vão também ser diferentes e, por isso, a carga final da proteína é muito variável. Quando sujeitas a um campo eléctrico, e dependendo do pH da solução em que se encontram, as proteínas adquirem carga positiva ou negativa e deslocam-se, assim, para o pólo negativo ou positivo, respectivamente. A migração electroforética das proteínas decorre numa matriz sólida, mas porosa, que permite a sua deslocação durante o tempo em que estão submetidas a um campo eléctrico, e que posteriormente é eficaz na sua imobilização após a experiência. Como matrizes habitualmente utilizadas em electroforese de proteínas podem destacar-se os géis de agarose, de amido e de poliacrilamida. Estas duas últimas substâncias permitem a elaboração de matrizes de malhas apertadas que, para além de separarem as proteínas pela sua carga, exercem também um efeito de crivo e promovem a sua separação adicional pelo tamanho e conformação. Depois de realizada a electroforese, os géis são colocados em soluções que contêm os produtos químicos necessários à revelação das diferentes proteínas com actividade enzimática. Esta metodologia permite, assim, a revelação e análise simultânea de várias enzimas e dos respectivos padrões electroforéticos. Adicionalmente, existem vários outros tipos de coloração, incluindo aqueles que possibilitam a detecção de proteínas que não têm actividade enzimática.

Na figura 3.1 encontra-se representado o procedimento experimental normalmente utilizado com este tipo de métodos. Em geral, uma análise electroforética termina com a interpretação dos padrões de bandas observados no gel, que permitem avaliar do interesse, ou não, das diferentes enzimas estudadas para a caracterização de uma população, raça ou espécie. A existência de variação genética numa proteína pode ser detectada através da observação de pelo menos dois tipos diferentes de padrões electroforéticos, que podem ser explicados através de um mecanismo genético simples. Assim, se uma mutação ao nível do DNA causar uma alteração na proteína correspondente, nomeadamente uma substituição aminoacídica que envolva a alteração de carga da proteína, espera-se a observação de bandas com diferente mobilidade em resposta ao campo eléctrico aplicado. Essas classes de mobilidade electroforética diferente podem, depois, ser interpretadas à luz da teoria mendeliana da hereditariedade, fornecendo um mecanismo genético explicativo dos padrões observados.

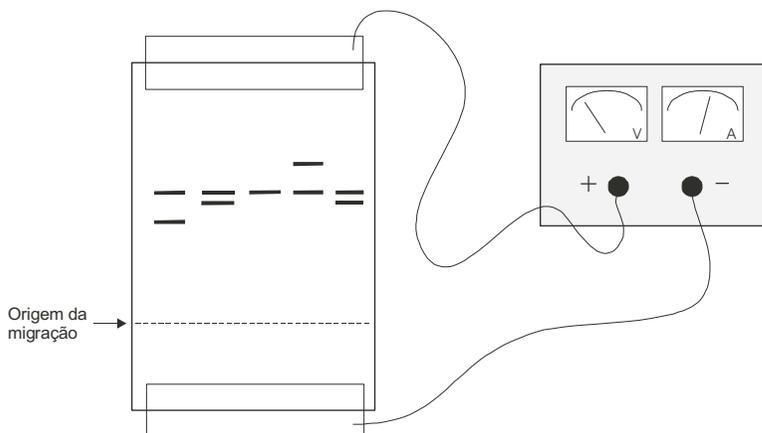


Figura 3.1 • Aspecto de uma separação electroforética de proteínas

Durante as décadas de setenta e oitenta do século XX, os métodos de separação electroforética de proteínas encontraram o seu mais elevado nível de sofisticação com o desenvolvimento da focagem isoelectrica. Esta metodologia baseia-se na separação das proteínas através do seu ponto isoelectrico (pI), uma propriedade fisico-química que é característica de cada proteína. Assim, em vez dos géis feitos com tampões caracterizados por um determinado valor de pH, aos quais era aplicado um campo eléctrico, desenvolveram-se matrizes que tinham um gradiente de pH e nas quais as proteínas se deslocavam até atingirem um ponto de equilíbrio (o seu pI) e se imobilizarem. As técnicas de revelação seguiam, depois, essencialmente os mesmos princípios descritos para a electroforese convencional. A principal vantagem da focagem isoelectrica reside na sua muito maior capacidade de resolução. Na verdade, enquanto uma separação electroforética convencional resulta de um compromisso entre a separação desejada e a perda de definição das bandas necessariamente associada ao prolongamento da experiência, a focagem isoelectrica concentra a proteína nas regiões do gel correspondente ao seu pI, permitindo a obtenção de bandas muito bem resolvidas.

Apesar de a aplicação generalizada das técnicas electroforéticas ao estudo e caracterização dos recursos genéticos animais e vegetais ter permitido grandes avanços, tanto em áreas fundamentais como aplicadas, há muito que se sabia que a quantidade de variação genética assim detectada não representava mais do que uma pequena fracção da realmente existente nas espécies. Dois tipos de razões concorriam para sustentar esta interpretação. Em primeiro lugar, as reconhecidas limitações da técnica electroforética: três quartos dos aminoácidos são electricamente neutros e não contribuem com carga para a proteína e, por outro lado, o código genético mostra que vários codões podem codificar para o mesmo aminoácido, resultando em mutações não detectadas

ao nível da proteína. Em segundo lugar, a electroforese era apenas uma análise genómica indirecta e deixava por analisar a maior parte do genoma, que não é codificante. Estas limitações terminaram quando, no final dos anos 80, se descobriu uma forma extraordinariamente simples de amplificar, em poucas horas e dentro de um pequeno tubo de ensaio, qualquer porção de DNA do organismo que se quisesse caracterizar: a reacção em cadeia da polimerase, ou PCR.

A DESCOBERTA DA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Os métodos de análise genómica directa existiam há já algum tempo, especialmente desde o final dos anos sessenta quando se descobriram as enzimas de restrição. Estas enzimas permitiam cortar o DNA dos organismos estudados em pedaços, que podiam ser depois analisados através da utilização de técnicas relativamente complexas e morosas e que, precisamente por essas razões, nunca foram aplicadas em larga escala. Isso só veio a ser possível a partir do momento em que a generalização dos aparelhos de PCR permitiu a obtenção, em condições laboratoriais normais, de grandes quantidades de DNA conseguidas a partir de quase qualquer tipo de material de origem biológica. O princípio da PCR é, na verdade, muito simples e baseia-se nas propriedades de desnaturação e renaturação da molécula de DNA quando submetida a elevadas temperaturas. Assim, a temperaturas próximas dos 95°C, as duas cadeias de DNA separam-se, voltando depois a ligar-se após o seu arrefecimento. A ideia chave do processo de amplificação do DNA em tubo de ensaio foi a adição de pequenas sequências chamadas iniciadores (*primers*), que flanqueiam a região que se pretende estudar e, sobretudo, de uma polimerase de DNA termoestável, capaz de resistir às elevadas temperaturas alcançadas. Esta enzima, designada por *Taq*, foi encontrada num organismo que vive em fontes termais (*Thermus aquaticus*) e que, por isso, tem polimerases de DNA necessariamente adaptadas a essas condições extremas.

Uma reacção de PCR é tipicamente constituída por três passos, que se repetem ciclicamente durante algumas horas (figura 3.2). O primeiro passo corresponde à desnaturação do DNA conseguida a uma elevada temperatura, o segundo passo à ligação dos *primers* às cadeias de DNA simples, e o terceiro passo à extensão, ou seja, à incorporação dos diferentes nucleótidos (A, T, G e C) presentes no tubo de ensaio pela acção da *Taq*, reproduzindo-se, assim, a porção da sequência de DNA que se situa entre os dois *primers*. Estes três passos são depois repetidos um determinado número de vezes

(tipicamente 30 a 35 vezes), resultando cada ciclo na duplicação da quantidade de DNA da sequência pretendida. Desta forma, o número de cópias dessa sequência é tão elevado no final da reacção de PCR que pode considerar-se o conteúdo do tubo como uma solução purificada da porção pretendida do DNA do organismo em estudo.

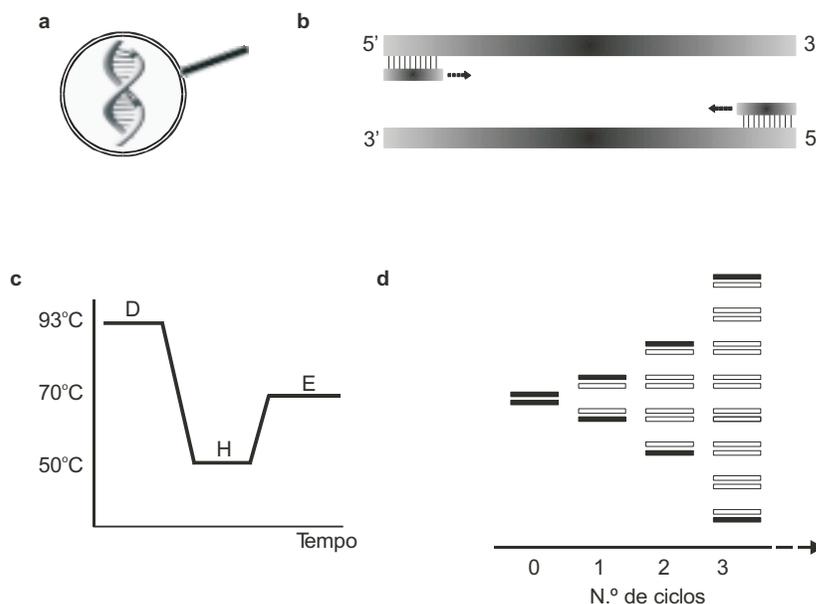


Figura 3.2 • Principais aspectos de uma reacção em cadeia da polimerase (PCR). **a.** a reacção de PCR pode amplificar qualquer porção da molécula de DNA; **b.** no início, as duas cadeias desnaturam e abrem, dando lugar à hibridação por parte dos iniciadores e subsequente processo de extensão; **c.** um ciclo de uma reacção de PCR é composto por uma fase de desnaturação do DNA (D), uma fase de hibridação com os iniciadores (H) e uma fase de extensão do DNA mediada por uma polimerase (E); **d.** a partir de um número inicial reduzido de cópias do segmento de DNA que se pretende amplificar, dá-se um aumento exponencial ao longo dos ciclos da reacção de PCR.

Os factores mais importantes para a obtenção de boas reacções de PCR incluem a qualidade das amostras iniciais de DNA, a adequação dos *primers*, e as condições em que decorre a sucessão de ciclos de amplificação. No que se refere à qualidade da amostra de DNA, deve referir-se que existe hoje um conjunto muito variado de protocolos de extracção de DNA, não só a partir de amostras convencionais de material biológico (sangue e músculo, por exemplo), como também de amostras degradadas (pêlos, penas, excrementos, ossos, entre muitos outros exemplos). Desta forma, os procedimentos de rotina de um laboratório devem ser devidamente adaptados ao tipo de amostras que são analisadas. Os *primers* são pequenas sequências de DNA (tipicamente com 20 a 30 nucleótidos) que devem ser perfeitamente complementares em

relação às extremidades das sequências que se pretendem amplificar, e que podem ser obtidos comercialmente. O seu desenho é, em geral, feito pelo investigador, que dispõe actualmente de várias ferramentas informáticas que o auxiliam no processo. Dependendo do grau de conservação da região do genoma em estudo, um determinado par de *primers* pode ser utilizado com maior ou menor sucesso na amplificação de regiões homólogas em espécies filogeneticamente não muito afastadas. Finalmente, existe hoje uma ampla bibliografia sobre as condições mais apropriadas para a realização de reacções de PCR, nomeadamente no que se refere aos componentes da reacção e à duração dos diferentes passos, que podem ser ajustadas de acordo com as características da região do DNA que se pretende amplificar, bem como do seu tamanho. Os produtos das reacções de PCR permitem, depois, a aplicação de uma ampla variedade de métodos de análise que incluem, entre outros, os polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), os polimorfismos de tamanho dos fragmentos amplificados (AFLP), os micros-satélites, os polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) e a sequenciação.

OS POLIMORFISMOS DE TAMANHO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Os polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição, ou RFLP, resultam da possibilidade de cortar o DNA através da utilização de enzimas de restrição que são capazes de reconhecer pequenas sequências específicas (normalmente com 4 a 6 pares de bases de comprimento). Estas enzimas existem naturalmente nas bactérias e servem para as defender da invasão de DNA estranho. Actualmente, existem algumas centenas deste tipo de enzimas disponíveis comercialmente, que cortam sequências com motivos muito diversificados e têm, por isso, uma grande utilidade. A enzima de restrição *EcoRI*, por exemplo, é purificada a partir da bactéria *Escherichia coli* e corta sequências de DNA que exibam o motivo GAATTC. O procedimento experimental normalmente seguido para proceder à caracterização de um RFLP num determinado conjunto de indivíduos está esquematizado na figura 3.3 e implica a amplificação por PCR da sequência de interesse (onde ocorre uma determinada substituição nucleotídica), a sua digestão com a enzima de restrição adequada, e a subsequente separação dos fragmentos obtidos num gel de agarose ou de poliacrilamida. Como o DNA em solução é uma molécula carregada negativamente, os seus fragmentos deslocam-se sempre para o pólo positivo e a sua separação resulta das diferenças de tamanho. A visua-

lização desses fragmentos faz-se através da utilização de substâncias como o brometo de etídio ou o nitrato de prata.

A utilização em larga escala dos RFLP como marcadores moleculares capazes de caracterizar uma população ou uma raça nunca foi muito popular em virtude do grande tamanho do genoma nuclear. Pelo contrário, a simplicidade e pequeno tamanho dos genomas mitocondriais e cloroplastidiais permitiram a utilização de baterias de enzimas de restrição na sua caracterização e a inferência das relações filogenéticas entre as diferentes moléculas a partir do conhecimento das sequências cortadas. Actualmente, a sequenciação tornou quase obsoleto este tipo de utilização dos RFLP que, no entanto, continuam a ser muito usados quando se pretende caracterizar rapidamente uma determinada posição nucleotídica que se sabe ser variável. Este é precisamente o caso de muitas doenças genéticas que ocorrem em maior ou menor frequência em muitas espécies de animais domésticos (ver destaque neste capítulo).

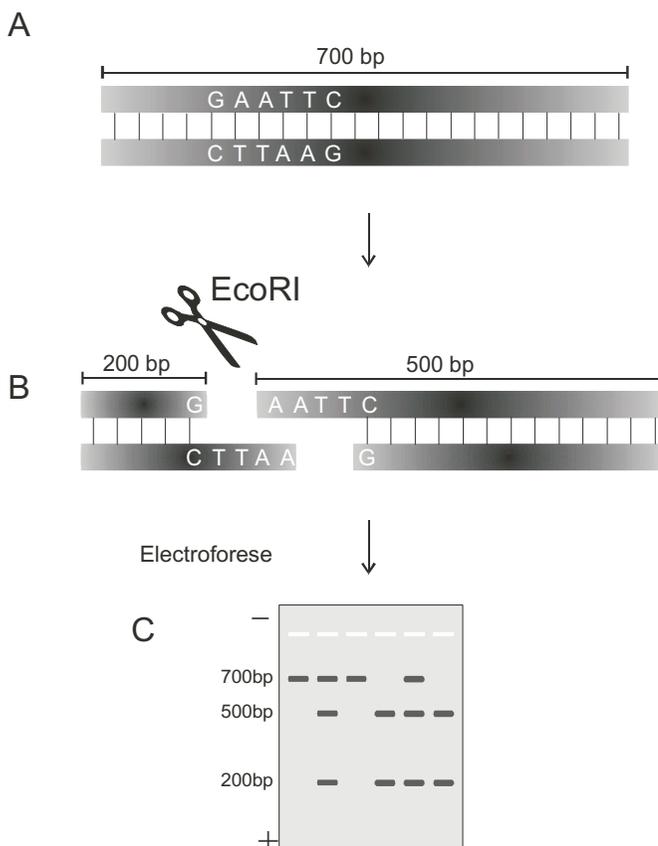


Figura 3.3 • Procedimentos experimentais destinados à obtenção de RFLP. **A.** as sequências de DNA possuem determinados motivos que são reconhecidos pelas enzimas de restrição; **B.** estas enzimas cortam o DNA em fragmentos mais pequenos; **C.** os fragmentos de DNA resultantes da digestão enzimática são separados por electroforese.



A DESPISTAGEM DA DEFICIÊNCIA DE ADESÃO LEUCOCITÁRIA BOVINA (BLAD) ATRAVÉS DE UM TESTE RFLP

A deficiência de adesão leucocitária bovina (*Bovine leukocyte adhesion deficiency*; BLAD) é uma doença que afecta muitos animais da raça Holstein em todo o mundo. Esta doença tem uma origem genética e caracteriza-se por uma deficiência existente numa proteína da superfície dos leucócitos denominada por integrina. Estas proteínas são responsáveis pelas interacções intercelulares necessárias para que os neutrófilos possam passar pelas paredes dos vasos sanguíneos e entrar nos tecidos para destruir os organismos patogénicos. Os indivíduos afectados por este distúrbio genético sofrem de infecções graves como pneumonia, gengivite, lentidão na cicatrização de feridas devido à formação anormal de pus, ausência de neutrófilos e excesso de leucócitos (100,000/ml). A frequência muito baixa desta doença na raça Holstein e a pouca expressão de sinais clínicos deve-se ao facto de a maior parte dos animais afectados morrer antes de completar um ano. Esta doença causa grandes prejuízos económicos na produção de leite e espalhou-se devido à utilização de sêmen de um

touro portador que, pelo seu elevado mérito genético, foi utilizado na inseminação artificial em todo o mundo. Apesar de a BLAD ter sido descoberta no início dos anos oitenta, só na década de noventa foram caracterizadas duas mutações no gene CD18 que estão associadas ao desenvolvimento da doença. Uma dessas mutações ocorre no nucleótido 383 e causa alterações na conformação da proteína expressa, comprometendo as suas funções. Como este distúrbio se deve apenas a uma mutação simples, foi relativamente fácil criar um teste genético capaz de detectar a sua presença. Para realizar este teste é apenas necessário proceder à colheita de material biológico do animal (sangue, pele, pelos), a partir do qual se extrai DNA. Depois, um pequeno fragmento do DNA extraído, contendo o local onde ocorre a mutação, é amplificado numa reacção de PCR. Finalmente, a detecção da presença ou ausência da mutação é feita através da utilização de um teste RFLP, ou seja, de uma enzima que tem a capacidade de reconhecer a sequência com a mutação e a corta em dois fragmentos distintos.

OS POLIMORFISMOS DE TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Os polimorfismos de tamanho dos fragmentos amplificados, ou AFLP, evoluíram a partir dos RAPD no sentido de procurar encontrar uma forma de gerar rapidamente uma quantidade apreciável de marcadores moleculares relativamente fiáveis em genomas pouco ou nada caracterizados. Inicialmente, os RAPD

(abreviatura de *Random Amplified Polymorphic DNA*) pretenderam ser esse instrumento, mas cedo se verificou que a simples utilização de *primers* aleatórios para amplificar regiões variáveis do genoma originava padrões de bandas muito complexos e geralmente não reprodutíveis, ainda que gerados no mesmo laboratório. Procurou-se, assim, amplificar apenas uma pequena fracção do DNA extraído de um indivíduo através da utilização de duas enzimas de restrição e subsequente ligação de alguns desses fragmentos a adaptadores específicos que vão depois condicionar a amplificação por PCR. Este tipo de metodologia está exemplificado na figura 3.4 e revelou-se bastante mais fiável do que a proporcionada pela utilização de RAPD. No entanto, a variabilidade normalmente detectada resulta em padrões de bandas ainda assim complexos, que devem ser interpretados de uma forma especialmente cuidadosa. Actualmente, os AFLP são ainda uma ferramenta muito útil quando se pretende ter uma visão geral sobre a variabilidade genética de genomas não caracterizados, especialmente no que se refere a espécies de plantas e muitos cultivares.

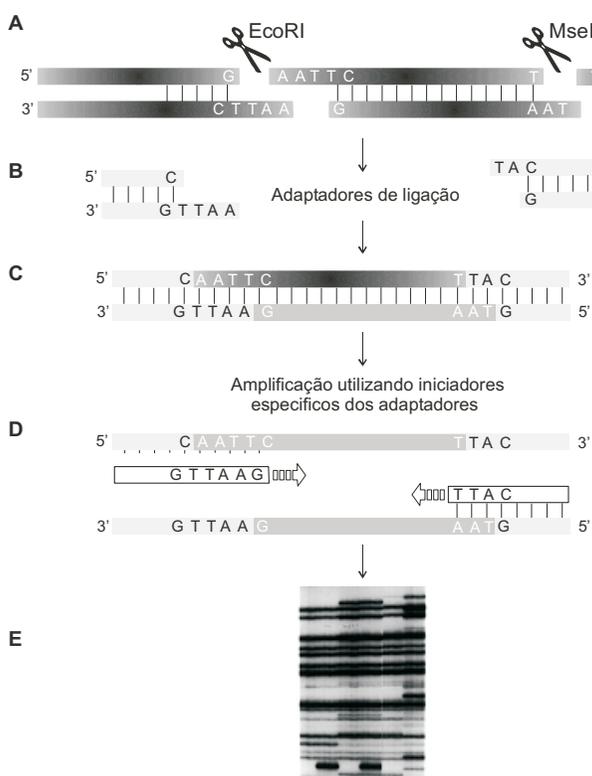


Figura 3.4 • Procedimentos experimentais destinados à obtenção de AFLP. **A.** o DNA total de um organismo é cortado por duas enzimas de restrição; **B e C.** nos locais de corte são adicionados adaptadores especiais que permitem a ligação de iniciadores específicos; **D.** procede-se à amplificação da porção do DNA à qual se ligaram adaptadores; **E.** padrões de bandas observados num gel de AFLP

OS MICROSSATÉLITES

Os microssatélites, ou STR (abreviatura de *Short Tandem Repeats*), são hoje os mais populares e mais utilizados dos marcadores moleculares disponíveis. Esta popularidade resulta principalmente da sua elevada variabilidade – podem ser encontradas mais de vinte formas diferentes numa única população – e abundância na maior parte dos genomas. Microssatélites são conjuntos de uma a seis bases repetidas em tandem que, no total, não ultrapassam geralmente o tamanho de 200 nucleótidos (figura 3.5). Este facto torna-os muito facilmente amplificáveis por PCR, mesmo quando se trata de DNA altamente degradado.

As sequências das regiões flanqueadoras permitem o desenho de *primers* específicos, pelo que muitas vezes é possível combinar numa mesma reacção de PCR a amplificação de vários microssatélites (PCR *multiplex*). Os diferentes tamanhos amplificados para cada microssatélite são depois separados em géis de poliacrilamida e corados com nitrato de prata, sendo a sua leitura normalmente muito simples (figura 3.6A). Alternativamente, a análise simultânea de muitos microssatélites pode ser mais eficazmente realizada através da utilização de um sequenciador automático, procedendo-se neste caso à sua detecção mediante fluorescência (figura 3.6B). O maior problema associado à utilização de microssatélites corresponde à sua identificação e subsequente desenvolvimento de *primers*. Este procedimento é, ainda hoje, lento e dispendioso, e implica a construção de uma biblioteca genómica enriquecida nos motivos repetidos pretendidos, seguida da clonagem dos fragmentos que têm microssatélites e da sua sequenciação.

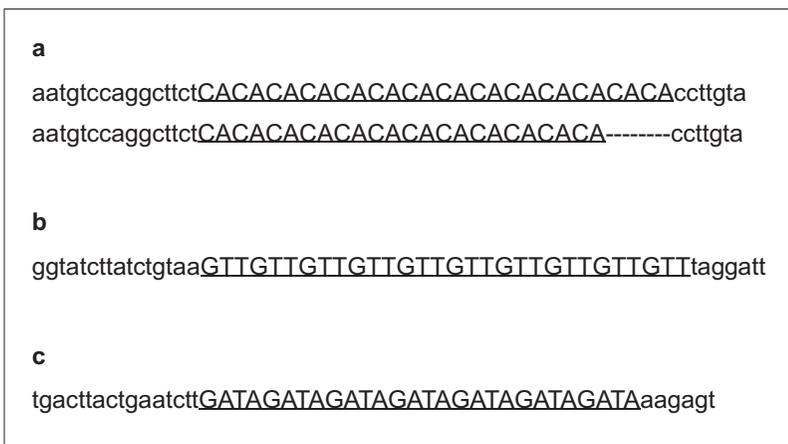


Figura 3.5 • Alguns exemplos de microssatélites. **(a)** di-nucleotídeo representado por duas formas, uma com 14 repetições do motivo CA, e outra com apenas 12. **(b)** tri-nucleotídeo. **(c)** tetra-nucleotídeo

O elevado grau de variabilidade dos microssatélites deve-se à sua alta taxa de mutação e crê-se que esta resulta da dificuldade que a polimerase de DNA tem em proceder à incorporação de nucleótidos em regiões muito repetitivas durante o processo de replicação do DNA. Assim, a polimerase de DNA salta ou acrescenta frequentemente um motivo na região repetida, originando novos tamanhos diferentes para o microssatélite. Mais raramente, podem também ser adicionados ou removidos dois ou mais motivos de repetição à sequência que constitui o microssatélite.

A abundância dos microssatélites na maior parte dos genomas, a sua elevada variabilidade e, ainda, a facilidade de análise em larga escala, tiveram um papel decisivo na construção dos primeiros mapas genéticos de alta resolução em muitas espécies. Por outro lado, este tipo de marcadores moleculares tornou-se, também, imprescindível para inúmeros laboratórios em todo o mundo que desenvolvem trabalhos de identificação individual e análise de parentesco em espécies domésticas, bem como de análise da variabilidade genética de raças autóctones. Deve realçar-se, por exemplo, que a FAO iniciou há alguns anos um programa especialmente dedicado à caracterização dos recursos genéticos animais tendo por base a adopção de um conjunto determinado de microssatélites para cada espécie doméstica.

A.

B.

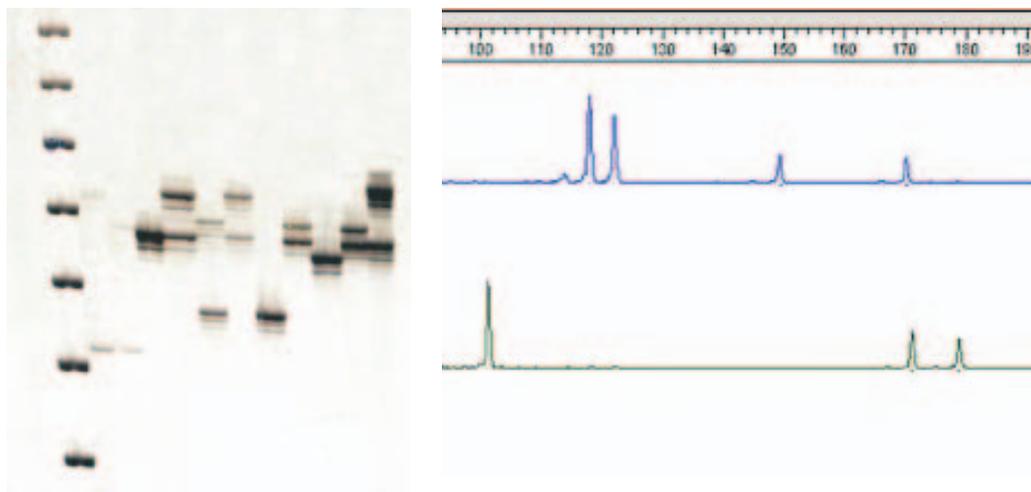


Figura 3.6 • Separação de um microssatélite (A) em gel de poliacrilamida e coloração com nitrato de prata e (B) em sequenciador automático

A SEQUENCIAÇÃO E OS POLIMORFISMOS NUCLEOTÍDICOS SIMPLES

No final dos anos setenta, Allan Maxam e Walter Gilbert, por um lado, e Fred Sanger, por outro, descobriram dois métodos diferentes de sequenciação do DNA. Estavam assim dados os primeiros passos no sentido de permitir a aquisição da informação definitiva sobre a caracterização genética dos organismos vivos. Contudo, a generalização da sequenciação só foi possível depois da descoberta da reacção de PCR e do desenvolvimento dos sequenciadores automáticos de elevada produtividade. Actualmente, a sequenciação de DNA é um procedimento de rotina em todos os laboratórios de genética e biologia molecular, muitas vezes automatizado com o auxílio de *robots*, desde a extracção de DNA, passando pela preparação das reacções de PCR, até terminar nos ficheiros de computador que mostram as sequências obtidas (figura 3.7).

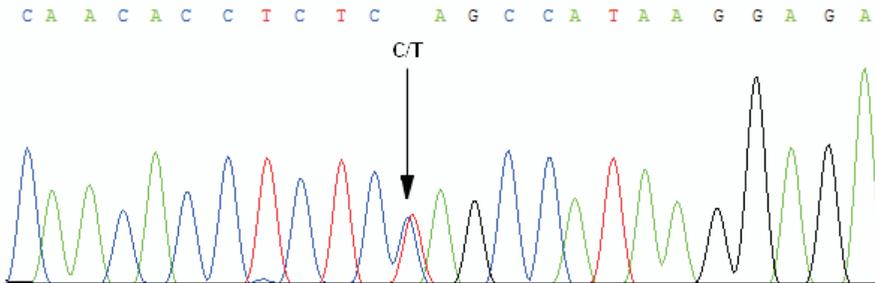


Figura 3.7 • Resultado de uma reacção de sequenciação de DNA em que os picos indicam os nucleotídeos que constituem uma das cadeias da molécula. A seta indica um polimorfismo nucleotídico simples (SNP) resultante da ocorrência simultânea das bases C e T

O genoma humano foi finalmente decifrado no ano 2000, existindo hoje várias espécies completamente sequenciadas. Nessas espécies incluem-se muitas bactérias, nemátodes, vários insectos como a abelha, o mosquito e as moscas-da-fruta, o arroz, peixes, a galinha, e outros mamíferos como o cão e o chimpanzé. Esta lista vai naturalmente crescer muito nos próximos anos, estando prevista para breve a disponibilização do genoma de uma rã, entre os grupos taxonómicos que têm lacunas grandes, bem como o do gado bovino, entre as espécies domésticas de maior interesse pecuário. Estes dados estão disponíveis em grandes bases de dados de acesso livre, e têm motivado o desenvolvimento paralelo de ferramentas bioinformáticas que procuram tirar partido de toda essa informação. Uma dessas bases de dados é o *GenBank*,

que tem hoje depositadas algumas dezenas de milhões de sequências correspondentes a mais de 100 000 organismos diferentes.

A acumulação de sequências obtidas a partir de indivíduos diferentes permitiu a emergência da designação SNP (abreviatura de polimorfismo nucleotídico simples) para referir o principal tipo de variação molecular existente no DNA. Os SNP resultam da ocorrência de variação num local da molécula de DNA (existem tipicamente duas bases alternativas, mas mais raramente podem encontrar-se três ou mesmo quatro), e podem encontrar-se em regiões não codificantes, ou então estar associados à modificação de uma proteína com eventuais consequências fenotípicas. No futuro, a abundância de SNP na maior parte dos genomas estudados associada à sua facilidade de análise quando comparada, por exemplo, com a dos microssatélites, poderá vir a tornar estes marcadores moleculares como os mais utilizados em estudos de genética fundamental e aplicada.

BREVES NOÇÕES DE GENÉTICA POPULACIONAL

A variabilidade genética que hoje se observa em populações naturais e domesticadas de plantas e animais resulta do balanço complexo entre os processos de mutação, recombinação, deriva genética e selecção.

O B J E C T I V O S

- Introduz-se o conceito de polimorfismo genético e define-se a forma de calcular frequências alélicas e genotípicas.
- Descreve-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg e introduz-se o conceito de heterozigotia.
- Enumeram-se os principais factores que determinam a mudança evolutiva.
- Comparam-se características de determinismo genético simples e complexo e refere-se o conceito de QTL.



ENQUADRAMENTO As populações naturais e domesticadas são geralmente caracterizadas por elevados níveis de variabilidade genética. A explicação para esta observação reside na identificação dos processos que geram diversidade, como a mutação e a recombinação, bem como dos processos que levam à sua erosão, como a deriva genética. Adicionalmente, os padrões de diversidade genética que caracterizam uma população, raça ou espécie podem ainda ser moldados pela selecção natural ou pela ocorrência de migração e miscigenação. Actualmente, a genética populacional é a área do conhecimento que estuda este tipo de fenómenos e que através de um elevado nível de sofisticação matemática permite compreender a trajectória evolutiva das populações.

POLIMORFISMO, FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS

Os métodos moleculares de análise da diversidade biológica permitem hoje gerar uma enorme quantidade de resultados em muito pouco tempo. Por esta razão, é fundamental conhecer algumas noções básicas de genética populacional que permitem sintetizar os resultados obtidos e traduzem de uma forma simples as características de uma população. O primeiro conceito central a esta temática é o de polimorfismo genético. Entende-se que um gene (ou *locus*) é polimórfico quando se caracteriza pela ocorrência de pelo menos duas formas alternativas com frequências superiores a 1%. Essas formas alternativas têm o nome de alelos e da sua combinação resultam os genótipos dos indivíduos. Quando dois alelos idênticos se juntam está-se na presença de um indivíduo homocigótico, enquanto se esses alelos forem diferentes então os indivíduos designam-se por heterocigóticos. Um gene que não tem variação diz-se monomórfico. Note-se que a adopção de um valor mínimo de 1% para considerar um determinado *locus* como polimórfico é feita com o objectivo de assegurar que ambos os alelos circulam na população com uma frequência apreciável e não resultam, apenas, da introdução repetida de novas mutações.

A noção de polimorfismo permite definir uma primeira aproximação à medida da diversidade genética de uma população. Assim, quando se examina um conjunto de proteínas através da aplicação de técnicas electroforéticas pode avaliar-se a percentagem de genes (ou *loci*) que se revelam polimórficos e utilizar esses valores para comparar as populações estudadas. Esta medida tornou-se, no entanto, menos utilizada com a emergência de

marcadores hiper-variáveis como os microssatélites porque, em geral, não se utilizam aqueles que se mostram monomórficos. Uma medida alternativa mais útil para caracterizar a variabilidade genética pode então ser dada pelo número médio de alelos por *locus*. Neste caso, conta-se em cada *locus* o número de alelos detectado, somam-se os valores obtidos e divide-se pelo total de *loci* estudado. Nos últimos anos, por exemplo, a investigação realizada sobre centenas de raças domésticas de espécies diferentes permitiu obter valores para o número médio de alelos em muitas populações, observando-se que aqueles variam tipicamente entre 2 a 3, no caso das proteínas, e 6 a 15, no caso dos microssatélites.

Contudo, o estudo mais detalhado de cada *locus* permite explorar de uma forma mais aprofundada a distribuição e dinâmica da diversidade numa determinada população, bem como elaborar medidas de variabilidade genética mais informativas para uma vasta área de conhecimentos. Para tal torna-se necessário proceder, em primeiro lugar, à estimativa das frequências alélicas de um *locus*. Considere-se, então, o resultado da análise de um conjunto de dez indivíduos de uma determinada população para uma proteína ou para um microssatélite, representado na figura 4.1



Figura 4.1 • Representação esquemática da separação electroforética de uma proteína ou de um microssatélite com dois alelos comuns, A e B. AA, AB e BB correspondem aos genótipos observados nos dez indivíduos estudados

É possível constatar, em primeiro lugar, que se trata de um *locus* polimórfico com dois alelos, designados por A e B. Em segundo lugar, observa-se também a ocorrência de três genótipos, sendo dois homocigóticos (AA e BB) e um heterocigótico (AB). As respectivas frequências genotípicas são facilmente calculáveis da seguinte forma:

$$f(AA) = 4/10 = 0.4 \quad f(AB) = 4/10 = 0.4 \quad f(BB) = 2/10 = 0.2$$

representando $f(AA)$, $f(AB)$ e $f(BB)$ as frequências dos três genótipos observados. No entanto, a informação mais importante que podemos retirar da distribuição de bandas esquematizada na figura 4.1 é a estimativa das frequências dos alelos A e B na população estudada. Assim, considerando que o alelo A tem na população total uma frequência simbolizada por p e o alelo B por q , a melhor estimativa das suas frequências é feita através de

uma contagem directa de genes na amostra de dez indivíduos, obtendo-se o seguinte resultado:

$$p \text{ (frequência de A)} = 12/20 = 0.6 \quad q \text{ (frequência de B)} = 8/20 = 0.4$$

Note-se que o valor observado de 12 genes A no total de 20 genes da amostra é o resultado da soma dos oito genes presentes nos quatro indivíduos homocigóticos AA com os quatro genes presentes nos quatro indivíduos heterocigóticos AB. O mesmo cálculo pode ser desenvolvido para os oito genes B.

O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Se agora se admitir que os dois genes A e B ocorrem na população com frequências p e q , e se juntam ao acaso para formar os indivíduos (neste caso com genótipos AA, AB e BB), então é possível prever a estrutura genotípica da população na geração seguinte:

$$AA = p^2 \quad AB = 2pq \quad BB = q^2$$

Este formalismo tem uma importância fundamental em genética das populações e designa-se por equilíbrio de Hardy-Weinberg. Procedendo à substituição dos valores de p e q pelas estimativas das frequências alélicas obtidas anteriormente, chega-se aos seguintes valores esperados para a distribuição genotípica na geração seguinte:

$$AA = 3,6 \quad AB = 4,8 \quad BB = 1,6$$

Como se pode constatar, estes valores são muito próximos dos observados inicialmente. Na verdade, é possível demonstrar que numa população em equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências alélicas mantêm-se constantes indefinidamente, pelo que a estrutura genotípica e os padrões de cruzamento podem ser previstos simplesmente através da sua utilização.

A apresentação do equilíbrio de Hardy-Weinberg permite, agora, introduzir a mais importante das medidas de diversidade genética de uma população: a heterozigotia. Em geral, este parâmetro é indicado através de duas formas, a heterozigotia observada (H_o) e a heterozigotia esperada (H_e). A primeira é calculada dividindo o número observado de indivíduos heterocigóticos pelo número total da amostra, pelo que no exemplo representado acima seria igual a $4/10 = 40\%$. A segunda corresponde ao valor de heterozigotia no caso de a

população verificar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, pelo que seria dada pela expressão $2pq$ e, portanto, igual a 48%. Em termos gerais, a heterozigotia de uma população, raça ou espécie depende do balanço entre os factores demográficos históricos que a caracterizaram e a taxa de mutação dos marcadores moleculares estudados. Assim, estudos que envolvam microssatélites chegam necessariamente a valores de heterozigotia superiores aos que são exibidos pelos que utilizam proteínas uma vez que a taxa de mutação do primeiro tipo de marcadores moleculares é muito superior à do segundo. Por outro lado, uma população que tenha mantido um elevado efectivo populacional ao longo da sua existência deverá mostrar maiores valores de heterozigotia do que uma população que tenha sofrido flutuações demográficas acentuadas (ver destaque neste capítulo). A explicação mais detalhada destes aspectos é desenvolvida nas secções seguintes deste capítulo.

Finalmente, deve referir-se que o equilíbrio de Hardy-Weinberg se aplica a populações de efectivo infinito e onde não ocorre mutação, selecção ou migração. Trata-se, pois, de uma situação idealizada em que não há evolução, aqui entendida como o processo de modificação das frequências alélicas ao longo do tempo. Neste contexto, interessa, agora, perceber quais são os principais factores de mudança evolutiva.

TAMANHO EFECTIVO DE UMA POPULAÇÃO

O número de animais que ocorre numa determinada área é da maior importância em ecologia, quando se trata de espécies selvagens, ou em produção animal, quando se trata de formas domesticadas, e é representado por N . Esta quantidade pode ser estimada de várias maneiras distintas e corresponde ao recenseamento de uma população, isto é, à determinação tão exacta quanto possível do número total de indivíduos que a compõe. No entanto, em termos evolutivos, o valor relevante para compreender a trajectória evolutiva de uma população é o seu tamanho efectivo, representado por N_e , e não a quantidade N . De facto, uma fracção significativa de qualquer população é, em geral, composta por indivíduos que não deixam descendência e, por

isso, não transmitem gâmetas para a geração seguinte. De uma forma simplificada, pode então definir-se N_e como correspondendo a uma população ideal em que todos os elementos têm uma probabilidade idêntica de serem progenitores de qualquer indivíduo da geração seguinte. O facto de tanto as populações naturais como as populações de animais domésticos se desviarem muito daquele modelo implica, em geral, que $N_e \ll N$. De entre os múltiplos factores que contribuem para que isso aconteça, referem-se seguidamente três dos mais importantes. Em primeiro lugar, a ocorrência de diferenças significativas no número médio de descendentes produzido por cada indivíduo diminui N_e relativamente a N , especialmente nos casos de organismos de

elevada fecundidade onde a amplitude da variação pode ser muito grande. Em segundo lugar, a existência de flutuações no efectivo populacional causadas, por exemplo, pela acção de doenças ou pela alteração da qualidade de recursos alimentares disponíveis, deixa uma marca muito acentuada no valor de N_e . Na verdade, é fácil demonstrar que N_e é dado pela média harmónica do tamanho das populações reprodutoras ao longo das gerações e pode ser calculado pela expressão

$$N_e = n / \sum (1 / N_i)$$

em que N_i representa o tamanho da população reprodutora na geração i e n o número de gerações. Como a média harmónica é muito mais afectada pelos valores baixos do que pelos valores altos, a existência de importantes flutuações demográficas é um dos factores que mais pode afastar N_e relativamente a N . Finalmente, a contribuição desigual dos dois sexos é também muito relevante para a divergência de N_e e N e assume especial importância na gestão dos recursos genéticos animais. Assim, se

N_M e N_F representarem, respectivamente, o número de machos e o número de fêmeas na população, o valor de N_e pode ser calculado através da expressão

$$N_e = 4N_M N_F / (N_M + N_F)$$

Nestas condições, $N_e = N$ apenas quando $N_M = N_F$ o que raramente acontece. Ao contrário, a introdução de novas práticas agrícolas como a inseminação artificial (ver Capítulo 7) pode levar a que o valor de N_M se aproxime de 1, o que transformaria a expressão anterior na forma

$$N_e = 4N_F / (N_F + 1)$$

Neste caso, que provavelmente representa muitas situações reais de gestão desadequada dos recursos genéticos animais, o valor de N_e não ultrapassa 4, independentemente do número de fêmeas que em cada geração se vai reproduzir. Está-se, assim, perante uma situação de forte erosão da diversidade genética por acção da deriva que só pode ser contrabalançada através da introdução de machos no sistema.

OS FACTORES QUE DETERMINAM A MUDANÇA EVOLUTIVA

A MUTAÇÃO

A mutação pode ser descrita como a fonte de toda a diversidade genética que entra numa população. Trata-se, por isso, do factor preponderante na criação da matéria-prima sobre a qual a evolução vai trabalhar. Os processos mutacionais são muito diversificados e podem implicar, entre outras modificações do DNA, simples substituições nucleotídicas (que, por sua vez, podem ser, ou não, codificantes) ou, então, a adição ou remoção de pequenas porções, como acontece com os microssatélites. Estes processos têm sido

estudados com muito detalhe, e existem hoje vários modelos mais ou menos sofisticados que procuram explicar a forma como variam e evoluem os diferentes tipos de marcadores moleculares.

A RECOMBINAÇÃO

A recombinação resulta da reprodução sexual e permite a redistribuição da diversidade genética que é introduzida nas populações por mutação. Na verdade, durante a divisão meiótica que leva à formação das células filhas, a informação genética proveniente de cada um dos progenitores é trocada, resultando em novas combinações a cada geração que passa. Assim, novas mutações que tragam alguma vantagem a um indivíduo são mais eficazmente disseminadas por todos os elementos de uma população, permitindo, em princípio, uma maior capacidade de adaptação dos organismos a um ambiente em permanente mudança. Por outro lado, o conceito de recombinação é também muito importante pelo facto de a informação genética de um organismo não se transmitir necessariamente de uma forma independente. Na verdade, os milhares de genes que caracterizam tipicamente uma determinada espécie estão distribuídos linearmente ao longo de um número muito reduzido de cromossomas, pelo que muitos deles partilham o mesmo suporte físico. Neste caso, a distância entre eles é determinante para saber se se comportam de forma independente (como se localizassem em cromossomas diferentes) porque ocorre sempre recombinação, ou se estão tão próximos que têm tendência a transmitir-se juntos. A análise dos padrões de associação entre marcadores moleculares não independentes de um organismo pode ser extremamente informativa sobre os factores que moldaram a sua diversidade genética actual.

A DERIVA GENÉTICA

Ao contrário dos mecanismos anteriormente descritos, a deriva genética provoca uma erosão da diversidade ao longo do tempo. De facto, como as populações têm efectivos finitos, cada geração é formada por uma amostragem aleatória de alelos presentes na geração anterior, o que leva necessariamente à modificação das suas frequências, que exibem flutuações de maior ou menor amplitude de acordo com as oscilações demográficas. Através de simulações realizadas em computador, é possível mostrar que esse processo leva inevitavelmente à perda de uns alelos e à fixação de outros, podendo mesmo resultar em populações sem qualquer variabilidade genéti-

ca (figura 4.2). É também importante salientar que as populações submetidas a fortes flutuações demográficas ficam sempre muito mais marcadas pelas suas fases de baixos efectivos populacionais, o que tem implicações da maior relevância para a gestão dos níveis de variabilidade genética em populações de espécies domésticas. Para além do problema da variação do tamanho populacional, a deriva genética em pequenas populações está também muito ligada ao conceito de consanguinidade. Tanto um como outro merecem um destaque especial neste capítulo.

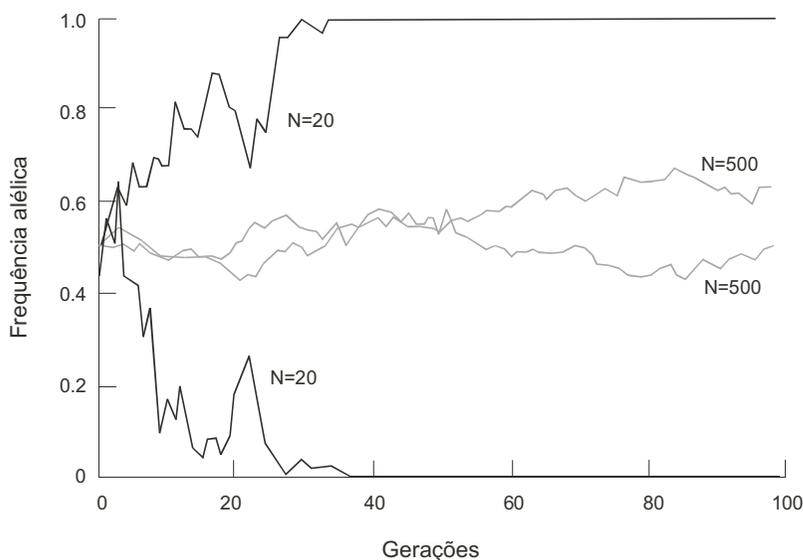


Figura 4.2 • Flutuações aleatórias das frequências alélicas em populações de efectivo (N) grande e pequeno ao longo das gerações. Note-se a rápida fixação dos alelos numa população de N=20 e, ao contrário, a manutenção do polimorfismo numa população de N=500

A SELECÇÃO

A selecção é o processo que explora e molda a diversidade genética que caracteriza um determinado organismo. As mais de trezentas raças de cães que existem actualmente derivam de uma única espécie ancestral, o lobo (*Canis lupus*), e exibem uma notável diversidade fenotípica que resultou da intensa pressão de selecção artificial exercida pelo homem nos últimos 10 000 anos. Na verdade, durante este período de tempo não houve introdução de mais diversidade genética através de mutação, mas apenas a sua reorganização. Assim, a modificação das características dos organismos pela selecção deve-se à reprodução diferencial dos vários genótipos que ocorrem numa população. A selecção pode promover a rápida fixação de um alelo na popu-

lação (selecção positiva), ou então determinar a sua remoção (selecção negativa), como acontece no caso das doenças genéticas. Um outro tipo de selecção implica a vantagem dos indivíduos heterozigóticos sobre os homozigóticos e designa-se por selecção equilibrada.

A CONSANGUINIDADE

A medida que os agricultores lutam para conseguir competir num mercado cada vez mais global, surgem novas estratégias para aumentar a intensidade de selecção das características genéticas associadas à produção. Devido a estas estratégias, muitas raças atingiram níveis elevados de consanguinidade nas últimas décadas. Por exemplo, a fim de reduzir a agressividade dos machos, muitos agricultores acabam por castrar ou abater a maior parte sem que estes cheguem à idade adulta, passando a utilizar inseminação artificial. Como o objectivo é melhorar uma determinada característica morfológica, muitas vezes a inseminação artificial é feita propositadamente com sémen de vários machos que tenham entre si um elevado grau de parentesco. A consanguinidade é, assim, a utilização de cruzamentos entre indivíduos aparentados para, de alguma forma, favorecer a fixação mais rápida de características desejáveis na população. No entanto, é importante não esquecer que um dos efeitos da consanguinidade é, também, a redução da heterozigotia. Uma população ou raça gerida de forma adequada é composta, maioritariamente, por indivíduos que, numa fracção significativa do seu genoma, têm duas variantes do mesmo gene (heterozigóticos). Note-se que existem, também, algumas variantes recessivas que causam doenças (como o BLAD ou o gene do halotano), ou então características indesejadas (agressividade, tamanho excessivo dos fetos à nascença). A maioria destes distúr-

bios só ocorre quando o indivíduo é portador de duas cópias da variante recessiva do gene (homozigótico recessivo). Assim, a probabilidade de nascerem indivíduos com estes problemas é muito baixa. Porém, como a maioria destas características não se manifesta senão em homozigotia, a sua erradicação de uma raça ou população é, também, muito difícil, uma vez que os indivíduos que possuem uma só cópia (portadores) não manifestam quaisquer sintomas. Se dois indivíduos portadores deste gene se cruzarem, existe a possibilidade de um quarto dos seus descendentes exibirem a característica. Assim, quanto mais aleatoriamente se derem os cruzamentos no seio de uma população, menor será a possibilidade de duas cópias de um gene indesejado se encontrarem num mesmo indivíduo. No entanto, quando existe consanguinidade numa população, o número de cruzamentos entre indivíduos portadores de uma destas variantes genéticas indesejáveis aumenta, resultando num acréscimo do número de indivíduos afectados por uma determinada doença. A manutenção desta situação concorre para a progressiva diminuição da diversidade, tornando o processo cada vez mais difícil de reverter. No limite, quando deixa de existir variabilidade dentro de uma raça ou população, esta perde a possibilidade de se adaptar a novas condições ou de responder a qualquer tentativa de melhoramento, por selecção, de uma determinada característica genética.

CARACTERÍSTICAS MONO E MULTIFACTORIAIS

Apesar dos grandes avanços do conhecimento sobre a organização e estrutura do genoma de muitos organismos e a evolução das suas populações, é de certa forma surpreendente como se sabe ainda tão pouco sobre a base molecular que determina a variação de características morfológicas, fisiológicas e comportamentais. Na verdade, enquanto os padrões de diversidade genética que são obtidos a partir da análise dos marcadores moleculares descritos no Capítulo 3 têm um modo de transmissão mendeliano e são facilmente interpretáveis à luz dos princípios da genética populacional enunciados anteriormente, o mesmo não se passa com as designadas características complexas, ou multi-factoriais. Estas são determinadas por QTL (abreviatura de *quantitative trait loci*), *loci* que contribuem para uma determinada característica (por exemplo, a gordura de um animal) através de pequenos efeitos, mas que são também influenciados por factores ambientais. Actualmente, existe um esforço muito significativo para dirigir a investigação no sentido de detectar marcadores de determinismo genético simples estreitamente associados a QTL por forma a conseguir localizá-los no genoma e, eventualmente, compreender melhor a base molecular das características que são alvo dos mecanismos de selecção natural e artificial.

A INTERPRETAÇÃO DOS PADRÕES DE DIVERSIDADE GENÉTICA

A aplicação de métodos de inferência permite compreender melhor os processos históricos que deram origem aos padrões de diversidade genética observados nas populações actuais.

O B J E C T I V O S

- Introduz-se o conceito de heterozigotia de uma população no equilíbrio e relaciona-se com os valores obtidos empiricamente.
- Introduz-se o conceito de subestruturação populacional e definem-se as partições da diversidade genética no seio de uma espécie.
- Salienta-se a possibilidade de medir a distância genética entre populações, raças ou espécies.
- Refere-se a utilidade dos estudos de sequências de DNA através de métodos filogenéticos e filogeográficos.
- Sugere-se a combinação de múltiplos marcadores moleculares na investigação dos processos de selecção e adaptação, que constituem a essência daquilo que é a domesticação.



ENQUADRAMENTO O espectacular desenvolvimento dos métodos moleculares de análise da diversidade biológica tem sido acompanhado por um igual desenvolvimento dos métodos de análise e inferência estatística, originando um estimulante processo de investigação na área dos recursos genéticos animais e vegetais. A possibilidade de comparar valores observados e esperados de diversidade genética permite compreender melhor a demografia histórica de muitos organismos e determinar com precisão a sua origem geográfica. Por outro lado, o desenvolvimento de medidas de distância genética entre populações ou raças permite avaliar de forma mais objectiva o carácter único de algumas delas e desenvolver, por isso, as correspondentes medidas de conservação. Finalmente, a combinação de marcadores moleculares com propriedades diferentes na investigação das características seleccionadas pelo homem durante a domesticação de animais e plantas promete revelar aspectos ainda desconhecidos deste processo, bem como desencadear importantes progressos na gestão dos recursos genéticos.

A VARIABILIDADE GENÉTICA

No capítulo anterior introduziram-se algumas das medidas fundamentais que permitem sumariar a diversidade genética, como o número médio de alelos ou a heterozigotia, bem como se procedeu a uma breve descrição dos factores que promovem a mudança evolutiva. Numa situação ideal, a variabilidade genética de uma raça, população ou espécie, tende para um valor de equilíbrio que resulta do balanço entre a introdução de novos alelos por mutação (que depende da taxa de mutação dos marcadores moleculares estudados) e a sua remoção por deriva genética (que depende das particularidades demográficas do organismo investigado). Neste contexto, a estimativa empírica da variabilidade genética pode ser fornecida pela heterozigotia esperada (H_e) calculada através da utilização de um conjunto representativo de marcadores moleculares (por exemplo, aloenzimas ou microsatélites). Se se proceder à extensão da análise de um *locus* com dois alelos para um *locus* com três alelos designados por A, B e C, e com frequências na população de, respectivamente, p , q e r , então a distribuição das frequências genotípicas é dada de acordo com o formalismo de Hardy-Weinberg

$$p^2 + 2pq + q^2 + 2pr + 2qr + r^2$$

pelo que H_e corresponderá à soma das parcelas $2pq + 2pr + 2qr$. Na generalização para situações com n alelos, o cálculo de H_e é efectuado através da expressão

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

sendo que p_i é a frequência do alelo i num determinado *locus*. O valor médio de H_e é finalmente obtido através da soma de todos os valores estimados por *locus* a dividir pelo número de *loci*.

Os valores de H_e determinados através de abordagens empíricas podem depois ser confrontados com os valores esperados numa situação de equilíbrio mutação-deriva. Deste ponto de vista, é possível demonstrar que a heterozigotia pode ser calculada utilizando a expressão

$$H = 4N_e\mu / (4N_e\mu + 1)$$

em que N_e corresponde ao número efectivo da população (ver destaque no Capítulo 4) e μ à taxa de mutação do marcador molecular estudado. As comparações realizadas até hoje entre os valores empíricos e teóricos de heterozigotia determinados numa ampla variedade de organismos mostram que as populações naturais são consistentemente menos variáveis em relação ao que seria de esperar. De entre as várias explicações sugeridas para esta questão deve destacar-se, por um lado, a ideia de que o tamanho efectivo da população poderá ter sido, ao longo do tempo, muito menor do que aquele que é na verdade estimado e, por outro lado, a importância que a selecção pode ter na diminuição da diversidade. As duas questões são de importância maior na caracterização e investigação dos recursos genéticos vegetais e animais.

A compreensão destes processos fornece, assim, uma ferramenta de grande utilidade para descrever e caracterizar, numa primeira fase, a diversidade genética em populações ou raças de espécies domésticas e proceder à sua comparação. De especial interesse é a inclusão, nestes estudos, da forma, ou formas, ancestrais selvagens a partir das quais foram domesticados os organismos de interesse. O passo seguinte corresponde à aplicação de métodos de inferência que permitam fornecer explicações plausíveis para os processos que determinaram os padrões de diversidade genética observados no presente. Actualmente, esta é uma área de investigação muito activa e que tem alcançado um elevado grau de sofisticação através do desenvolvimento de abordagens matemáticas que envolvem a determinação de um grande número de parâmetros. A título meramente ilustrativo, refira-se que a observação de baixos níveis de diversidade genética em várias raças de uma determinada espécie quando comparados com os exibidos pelas populações da sua forma ancestral podem

indicar um forte efeito de fundador durante o processo de domesticação ou, em alternativa, a amostragem de uma população que representava, apenas, um subconjunto da diversidade original. Por outro lado, a comparação dos valores de heterozigotia entre raças ou populações de uma determinada espécie permite uma primeira apreciação de como se distribui a diversidade entre elas e que tipo de processos históricos terão estado na origem dessa distribuição. Por exemplo, uma raça que mostre níveis de variabilidade genética significativamente inferiores aos de outras raças da mesma espécie poderá ter sido submetida a processos selectivos mais intensos (e ter, portanto, um mais baixo efectivo populacional nalgum ponto da sua história).

Esta discussão permite introduzir outro conceito fundamental, que é o de subestruturação populacional. Quando se apresentou o formalismo de Hardy-Weinberg, assumiu-se que os cruzamentos entre todos os elementos de uma população se dão ao acaso. Ora esta situação está longe de ser a regra nas populações naturais e não acontece, naturalmente, nas populações domesticadas. A existência de subestruturação tem como consequência principal a ocorrência ou a geração de diversidade genética que é própria de uma subpopulação mas que não existe nas outras subpopulações. Há, assim, uma fracção da diversidade genética que é devida a diferenças entre subpopulações e que, em geral, é directamente proporcional ao seu grau de isolamento. A forma mais adequada de estimar esta fracção é através do F_{ST} , uma medida que compara a média das diversidades genéticas observadas no seio das subpopulações com a diversidade genética da população global. Uma expressão simples para calcular o valor de F_{ST} pode ser dada por

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

em que H_T é a heterozigotia esperada na população global e H_S é a média das diversidades genéticas observadas no seio das subpopulações. O F_{ST} é uma medida muito conveniente porque se distribui entre 0 e 1, sendo que valores próximos de 0 significam um elevado fluxo génico e uma baixa diferenciação entre subpopulações, enquanto valores próximos de 1 indicam a ausência de fluxo génico e uma grande diferenciação entre subpopulações.

AS DISTÂNCIAS GENÉTICAS

A caracterização e análise da variabilidade genética de populações, raças e espécies através da utilização de marcadores moleculares permitem a elaboração de medidas de distância genética que traduzam o seu grau de

parentesco. Assim, elevadas distâncias genéticas entre populações reflectem, em geral, processos de diferenciação que se iniciaram há muito tempo, enquanto baixas distâncias genéticas sugerem a ocorrência de uma população ancestral recente. Este tipo de medidas é especialmente importante porque permite definir o carácter único de algumas raças ou populações e delinear medidas de conservação adequadas. Por esta razão, a FAO tem procurado aconselhar os laboratórios de genética animal a utilizar um conjunto padronizado de marcadores moleculares de maneira a facilitar as comparações entre trabalhos de investigação numa espécie, bem como entre espécies, e retirar daí importantes generalizações com implicações na conservação dos recursos genéticos.

As primeiras medidas de distância genética basearam-se apenas na utilização das diferenças entre as frequências alélicas exibidas por uma bateria de *loci* estudada num conjunto de subpopulações de uma determinada espécie. A medida F_{ST} , introduzida na secção anterior, pode ser considerada como uma distância genética e é, ainda hoje, muito utilizada. Mais recentemente, o conhecimento das sequências de DNA e a existência de modelos explicativos dos processos mutacionais (por exemplo, no caso dos microsatélites) permitiram a extensão da abordagem meramente frequencista à introdução das relações evolutivas entre alelos. Assim, é actualmente possível escolher entre distâncias genéticas mais apropriadas para processos evolutivos antigos, onde a mutação poderá ter um papel preponderante na geração de nova diversidade genética, e distâncias genéticas mais apropriadas para processos evolutivos recentes, onde a mutação não é importante e a deriva genética tem o papel essencial na redistribuição da diversidade e na diferenciação das populações. Na tabela 5.1 indicam-se, a título de exemplo, algumas das distâncias genéticas mais utilizadas.

DISTÂNCIA GENÉTICA	TIPO DE MARCADOR MOLECULAR	REFERÊNCIA
D_A , D_{NEI}	Aloenzimas	Nei, 1987
D_{CS}	Aloenzimas	Cavalli-Sforza <i>et al.</i> , 1994
F_{ST} e equivalentes	Aloenzimas, microsatélites, sequências de DNA	Wright, 1969; Excoffier <i>et al.</i> , 1992
$\delta\mu^2$	Microsatélites	Goldstein <i>et al.</i> , 1995
R_{ST}	Microsatélites	Slatkin, 1995
D_{SW}	Microsatélites	Shriver <i>et al.</i> , 1995

Tabela 5.1 • Exemplos de algumas distâncias genéticas, e respectiva adequação aos diferentes tipos de marcadores moleculares

FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA

A generalização da sequenciação do DNA proporcionou um desenvolvimento espectacular dos métodos filogenéticos baseados em dados moleculares e a sua confrontação com as interpretações provenientes da análise morfológica convencional e do registo fóssil. De facto, a análise das sequências de DNA permite elaborar relações de ancestralidade e descendência e reconstruir a sequência evolutiva mais plausível para um conjunto de organismos – por exemplo, a diversificação de um grupo de espécies dentro de um determinado género. Isto é possível porque os processos de análise e representação filogenética têm por base o conceito de árvore, que consiste essencialmente num conjunto de ramos, sendo os terminais correspondentes às diferentes unidades taxonómicas estudadas, e de nós, correspondentes a hipotéticas formas ancestrais (figura 5.1). Uma árvore filogenética traduz, assim, um processo de bifurcações sucessivas que não tem recuo, e que reflecte, de forma muito aproximada, o processo biológico de diversificação e formação das espécies para grande parte dos organismos vivos. Finalmente, a existência de momentos bem datados do registo fóssil permite efectuar uma calibração molecular para as diferentes sequências de DNA a que hoje se tem acesso o que, por sua vez, possibilita a datação de muitas espécies para as quais o registo fóssil é escasso ou inexistente.

A importação dos métodos de análise filogenética para o domínio intra-específico e a sua associação com a geografia resultaram na emergência de uma nova disciplina científica chamada filogeografia. Nos últimos anos, os estudos filogeográficos têm crescido de forma quase exponencial e têm permitido descrever uma quantidade de variação e subestruturação intra-específica que, na maior parte das espécies, era absolutamente insuspeitada. Contudo, este tipo de estudos encontra-se, ainda, numa fase muito descritiva porque não foi acompanhado de um concomitante desenvolvimento de metodologias estatísticas de análise. Na verdade, os processos evolutivos a nível intra-específico são muito mais complexos do que a sequência de bifurcações que caracteriza a sucessão temporal das espécies: as populações podem separar-se através de um processo de fissão, como as espécies, mas podem também misturar-se parcial ou totalmente em resultado, por exemplo, de expansões geográficas, naturais ou mediadas (ver destaque neste capítulo). Este tipo de processos, associado à possibilidade da sua repetição, complica muito a interpretação dos dados genéticos. De uma forma geral, a filogenia lida unicamente com a fracção da variabilidade genética que se distribui entre as espécies, considera o polimorfismo intra-específico como ruído, e busca um padrão de ancestralidade e descendência tipicamente representado por uma árvore. Ao contrário, a análise filogeográfica estuda o

polimorfismo intra-específico, ou seja, aquele que ocorre transitoriamente no seio das espécies, e procura encontrar um conjunto, por vezes muito complexo, de cenários que terão estado na sua origem. Neste contexto, não se deve falar da filogenia das populações ou das raças estudadas, mas sim da reconstrução das suas relações históricas.

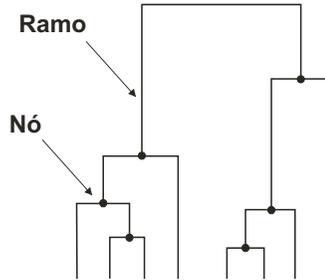


Figura 5.1 • Representação de uma árvore filogenética, com indicação dos ramos e dos nós

A MISCIGENAÇÃO DE POPULAÇÕES

As populações ou raças de uma determinada espécie são muitas vezes caracterizadas por histórias de hibridação e de miscigenação que podem resultar, por exemplo, de uma expansão natural, ou então de um acto deliberado mediado pelo homem, normalmente com um determinado objectivo. Nos animais domésticos, este tipo de análise é especialmente relevante por dois tipos de razões. Em primeiro lugar, porque a maior parte das espécies foi domesticada pelo menos duas vezes de forma independente, dando lugar a populações e raças de características bem distintas. Em segundo lugar, porque o homem sempre transportou consigo os seus animais, experimentando muitas vezes misturá-los com outros que encontrava em novas regiões, quer se tratasse de formas selvagens, quer se tratasse de formas domésticas. Reconstruir a história destes processos de miscigenação pode, por isso,

revelar aspectos muito interessantes sobre as espécies domésticas, e também sobre a própria espécie humana, mas não é tarefa fácil. Nos últimos anos, a utilização de marcadores moleculares tem permitido compreender melhor a dinâmica da hibridação e miscigenação de populações. Para se aplicar uma metodologia deste tipo, é necessário que as populações parentais que deram lugar a uma população miscigenada mostrem algum grau de diferenciação nas suas frequências alélicas. Em geral, um marcador genético é tanto mais informativo quanto mais assimétricas forem as frequências dos seus alelos nas populações parentais: idealmente, o grau de miscigenação de uma população seria dado directamente pelas frequências de dois alelos A e B que estivessem fixados alternativamente nas duas populações parentais. Como esta situação se verifica muito raramente, o valor de M (grau de miscigena-

ção) de uma população híbrida pode ser calculado notando que

$$p_H = p_A \times M + p_B \times (1-M)$$

em que p_H , p_A e p_B representam as frequências do alelo i na população híbrida H e nas populações parentais A e B, respectivamente, e M a contribuição da população A para a população híbrida. Depois, transformando em ordem a M, obtém-se:

$$M = (p_H - p_B) / (p_A - p_B)$$

O valor de M deve ser obtido a partir da análise de um número apropriado de marcadores, e não de apenas um marcador. Esse valor constitui uma estimativa da fração do genoma nuclear de uma raça miscigenada que provém da raça parental A

ou da raça parental B. A possibilidade de o processo de miscigenação de raças poder ser mediado em grande parte, ou mesmo exclusivamente, por apenas um dos sexos é passível de investigação através do estudo de marcadores moleculares que se transmitem unicamente pela linha materna ou pela linha paterna. Assim, o estudo de marcadores do cromossoma Y fornecerá uma perspectiva da miscigenação pelo lado masculino, enquanto o estudo de marcadores mitocondriais mostrará o lado feminino do processo. A miscigenação de raças bovinas taurinas e zebuínas em África e na América do Sul, aliás caracterizada por uma assimetria na contribuição dos dois sexos, constitui um excelente exemplo onde a aplicação de marcadores moleculares permite compreender melhor a história daquelas raças.

A introdução dos estudos filogeográficos na análise dos processos de domesticação causou grandes avanços no conhecimento sobre esta área, que envolve contribuições da evolução humana, da arqueologia e arqueozoologia, e da história, entre outras. Por exemplo, o reconhecimento de que todas as raças domésticas de coelho possuem, apenas, uma das duas linhagens mitocondriais existentes nas populações selvagens permitiu delimitar geograficamente o local de domesticação e concluir que a espécie tinha sido domesticada uma única vez (ver estudo de caso neste capítulo). Ao contrário, a descrição de duas linhagens mitocondriais diferentes em raças bovinas, cuja divergência terá precedido em muito a altura mais plausível para a ocorrência da domesticação – o início do Neolítico – conduziu os investigadores à conclusão de que terão ocorrido dois processos de domesticação independentes, um na região do Crescente Fértil (dando origem às raças taurinas, sem bossa), e outro no subcontinente Indiano (dando origem às raças zebuínas, com bossa). Em termos mais gerais, a combinação das análises filogeográficas de plantas e animais domesticados com os resultados provenientes de estudos de genética populacional clássica realizados com o auxílio de marcadores moleculares, como as aloenzimas e os microsátélites, têm permitido revelar uma complexidade insuspeitada nos processos que conduziram à domesticação, bem como mostrar facetas históricas do maior interesse na própria espécie humana. Finalmente, constituem ain-

da instrumentos preciosos na reconstrução da história das relações do homem com os seus animais em muitas regiões geográficas distintas, de entre as quais se pode destacar, pela sua importância e originalidade, a Península Ibérica (ver destaque neste capítulo).

A DOMESTICAÇÃO DO COELHO

O coelho (*Oryctolagus cuniculus*) é uma espécie originária da Península Ibérica que se expandiu para França, provavelmente depois da última glaciação, e que a partir dos tempos históricos, foi introduzida no Norte de África, Inglaterra, Europa Central, e mais tarde, Austrália, Nova Zelândia e América do Sul. As suas populações selvagens encontram-se fortemente estruturadas do ponto de vista genético, tendo sido descritas duas linhagens muito diferenciadas, tanto em relação ao DNA-mitocondrial (transmitido exclusivamente por via materna), como em relação ao cromossoma Y (transmitido exclusivamente por via paterna). A primeira linhagem, designada por A, ocorre exclusivamente em populações do sudoeste da Península Ibérica, enquanto a segunda, designada por B, caracteriza as populações do nordeste da Península, bem como todas as outras

populações não ibéricas. A análise daqueles marcadores moleculares em coelho-doméstico mostrou que todas as raças exibem apenas a linhagem B, sugerindo claramente uma domesticação única desta espécie. O estudo de um conjunto mais alargado de marcadores representativos de todo o genoma sugere, adicionalmente, que a diversidade genética encontrada nas populações domésticas é um subconjunto daquela que caracteriza a espécie e localiza o evento de domesticação no sul de França, o que é igualmente apoiado por alguns dados históricos. Esta evidência contraria, por outro lado, as interpretações que sugeriam a domesticação do coelho durante o período romano da Península Ibérica e indica, também, que a rápida dispersão e selecção das diferentes raças domésticas em todo o mundo terá acontecido apenas a partir do século XV.

A ORIGEM DOS PRINCIPAIS ANIMAIS DOMÉSTICOS DA PENÍNSULA IBÉRICA

Na sua maioria, as espécies de animais domésticos da Península Ibérica foram trazidas pelos primeiros povos de agricultores durante o Neolítico, há cerca de oito mil anos. Estes povos saíram do Crescente Fértil e espalharam-se por toda a Europa, revolucionando o modo de vida dos

povos locais, que até aí viviam como caçadores-recolectores. Porém, devido à sua posição geográfica, a Península Ibérica foi, ao longo dos tempos, ponto de passagem de várias civilizações que, de certa forma, terão também contribuído com os seus animais. Assim, as actuais raças domésti-



cas da Península Ibérica terão, provavelmente, tantas origens quantas os povos que por ela passaram. As raças de bovinos são um bom exemplo disso. Vários estudos genéticos sobre as actuais raças de bovinos Ibéricos sugerem a existência de duas linhagens diferentes. A primeira, representativa da maior parte das raças, tem origem no Crescente Fértil e é comum às restantes raças do continente europeu. A segunda está presente sobretudo no sul da Península Ibérica (por exemplo, as raças alentejana, mertolenga, preta, berrenda, mostrenga, retinta) e terá origem numa possível domesticação Africana. Os caprinos e ovinos são originários da domesticação ocorrida no Crescente Fértil, não existindo muitas diferenças entre as várias raças no seio de cada uma das duas espécies. O mesmo se aplica às raças porcinas, embora se possa detectar a ocorrência de hibridação histórica entre porcos domésticos e as populações de javalis desta região. As

raças ibéricas de cavalos constituem outro caso interessante. A domesticação do cavalo deu-se posteriormente à da cabra, vaca e ovelha, e terá acontecido nas estepes Euroasiáticas. A investigação sobre as raças ibéricas mostra que alguns indivíduos têm características genéticas, nomeadamente ao nível do DNA-mitocondrial, que as aproximam das raças de cavalos do Norte de África. Estes resultados têm sido interpretados como o resultado da invasão muçulmana da Península Ibérica durante a Idade Média. No entanto, esta interpretação é discutível, podendo pensar-se numa hipótese alternativa que considera um cenário de domesticação local do cavalo e posterior influência deste no Norte de África. Na Península Ibérica, o burro é o único animal doméstico que terá tido uma origem exclusivamente africana (actual Egipto, Sudão, Somália e Etiópia), de acordo com estudos recentes nos quais se incluíram amostras das raças ibéricas.

SELECÇÃO E ADAPTAÇÃO

Como se percebeu anteriormente, a origem, localização e multiplicidade dos eventos de domesticação para muitas espécies têm sido desvendadas através da combinação das propriedades dos diferentes tipos de marcadores moleculares. Contudo, a essência do processo de domesticação, isto é, a modificação da morfologia, da fisiologia e do comportamento das formas selvagens ancestrais e a sua transformação nas raças actuais, continua, em grande parte, por conhecer. Este facto resulta, essencialmente, do desconhecimento que ainda existe sobre a base molecular das características que foram alvo do processo de selecção imposto pela espécie humana durante a domesticação e que incluem, por exemplo, o tamanho (para produção de carne, por exemplo), a fertilidade (também para aumentar a produtividade), ou mesmo determinadas características comportamentais (por exemplo, a variabilidade da agressividade nas raças de cães). Apesar disso, alguns casos mais bem estudados, especialmente no

domínio das plantas, sugerem que as grandes modificações fenotípicas podem resultar da selecção de um número muito reduzido de genes de grande efeito. Por esta razão, a análise molecular de genes candidatos a desempenharem um papel preponderante nas características fenotípicas antes mencionadas será, seguramente, uma das áreas de investigação mais interessantes e de maior desenvolvimento nos próximos anos (ver destaque neste capítulo). Por outro lado, o facto de a domesticação de plantas e animais ter ocorrido num tão reduzido espaço de tempo e ter originado um conjunto tão diversificado de raças constitui uma experiência natural única, e fornece condições especialmente adequadas à investigação sobre a evolução de características complexas.



AS PROTEÍNAS DO LEITE

O leite tem um papel primordial na alimentação humana. O sector agro-alimentar a ele ligado, mais propriamente ao leite de vaca, é uma importante fonte de riqueza e desenvolvimento agrícola. Por isso, os factores que controlam a produção e qualidade do leite são dos mais estudados nas últimas décadas. As proteínas contidas no leite de vaca são, em conjunto com a gordura e os sais minerais, os constituintes mais importantes do leite. Estas proteínas são seis e dividem-se em duas fracções: quatro caseínas (alfa-s1, alfa-s2, beta e kapa) e duas proteínas do soro (alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulina). Além do seu valor nutritivo, estas proteínas estão ligadas ao rendimento tecnológico de alguns produtos lácteos, nomeadamente do queijo. São codificadas por seis genes que se caracterizam pelos seguintes aspectos: (1) as caseínas encontram-se localizadas numa pequena porção do cromossoma seis, a alfa-lactoalbumina no cromossoma cinco e a beta-lactoglobulina no cromossoma onze; (2) os genes das caseínas são transmitidos à descendência em bloco, sem ocorrência

significativa de recombinação genética. Estudos acerca dos genes responsáveis pela expressão das proteínas do leite revelaram uma forte associação entre certas variantes genéticas de algumas proteínas e o rendimento queijeiro, isto é, a quantidade de quilos de queijo por litro de leite. Por exemplo, sabe-se que a variante B da kapa-caseína está associada a uma maior qualidade do queijo e rendimento da sua produção, pelo que a sua detecção permitirá desenhar programas adequados de selecção. Também se demonstrou que algumas variantes das proteínas do soro estão associadas a uma maior rapidez de desenvolvimento das crias, por estarem relacionadas com a transmissão de resistência imunitária das mães para a descendência. Em alguns países (Dinamarca, Alemanha, Estados Unidos da América), as vacas leiteiras e os touros reprodutores são frequentemente testados e a sua escolha para determinados cruzamentos é feita consoante as variantes genéticas de que são portadores. Estes testes genéticos podem ser feitos directamente numa amostra de leite, sangue ou sêmen.

A selecção artificial exercida pela espécie humana é do tipo direccional, isto é, procura modificar uma determinada característica sempre num determinado sentido. Do ponto de vista teórico, este tipo de selecção deverá deixar uma marca inequívoca no genoma através da diminuição da diversidade no *locus* (bem como nas regiões fisicamente mais próximas) que é alvo de interesse. Isto acontece porque se procura fixar uma determinada característica, eliminando a diversidade pré-existente. Por outro lado, a direcção e intensidade da selecção podem ser diferentes de raça para raça no seio de uma mesma espécie, o que promove a fixação de características distintas e a percepção de que uma fracção muito significativa da diversidade genética dessa mesma espécie possa dever-se a diferenças entre as raças. Contudo, o facto de as modificações trazidas pela domesticação envolverem, apenas, um número reduzido de genes, associado à história muito recente das raças e variedades domésticas, tem como consequência um baixo grau de divergência genética e a partilha da maior parte da variação encontrada no genoma. Um exemplo muito interessante que permite ilustrar estes processos é o da variação da cor da pelagem nas espécies domésticas de mamíferos (ver destaque neste capítulo). Embora se conheçam actualmente algumas dezenas de genes que podem ter implicações na determinação desta característica, a sua base molecular é, em geral, de fácil interpretação, o que permite o estabelecimento de relações simples entre um genótipo e o correspondente fenótipo. Nas formas selvagens, a cor da pelagem é, em geral, invariável e adaptada às condições ambientais em que ocorrem, o que permite, por exemplo, escapar melhor aos predadores. Há, assim, uma pressão da selecção natural no sentido de manter essa característica. Durante o processo de domesticação, porém, o aparecimento das primeiras mutações de cor poderá ter fornecido à espécie humana uma forma primitiva de marcação dos animais ou de determinados *stocks*, que posteriormente viria a ser adoptada em múltiplas espécies e ficaria associada ao nascimento de muitas raças bem definidas. Surgiu, assim, uma pressão de selecção artificial diversificadora, essencialmente conducente à fixação de uma determinada coloração numa raça específica e, portanto, tendo como consequência a ampliação das diferenças genéticas entre as raças e a homogeneização do genoma nas regiões dos *loci* seleccionados para cada raça. A utilização combinada de marcadores moleculares do tipo SNP e STR estreitamente ligados aos *loci* que determinam a cor da pelagem é uma das principais estratégias que estão hoje a ser utilizadas para compreender os processos selectivos durante a domesticação e avaliar o tipo de marca que deixam no genoma.



A DETERMINAÇÃO GENÉTICA DA COR DA PELAGEM NOS MAMÍFEROS

A cor da pelagem dos mamíferos é, possivelmente, um dos aspectos fenotípicos sobre o qual o homem exerce selecção há mais tempo. Actualmente, a cor da pelagem é uma característica chave na identidade de uma raça, seja ela de vacas, cabras, ovelhas, cavalos, cães ou coelhos. A pressão de selecção sobre ela exercida foi de tal forma acentuada que, por vezes, é possível identificar um indivíduo em relação à sua população de origem com base, apenas, num dos genes que determina a cor da pelagem. Em meados dos anos 90, começou a surgir informação sobre a sequência de um gene que actua como receptor da hormona estimuladora de melanócitos (MC1R), e que depois se verificou ter um papel fundamental na ocorrência de variação da coloração de mamíferos domésticos. Em bovinos, este gene tem duas variantes principais que são responsáveis pelas cores castanha e preta. Com o avanço das metodologias moleculares, surgiram os primeiros testes genéticos capazes de identificar as mutações responsáveis por alguma dessa variação a partir de uma amostra de tecido e através da técnica de PCR. A chegada da encefalopatia espongiforme bovina (BSE) trouxe maiores exigências de segurança em relação à identificação da origem da carne de vaca e dos seus derivados, e os testes genéticos para detecção da cor da pelagem revelaram-se muito úteis no rastreio dos produtos derivados da raça Hols-

tein, a primeira a ser atingida pela BSE. Estudos sobre este gene foram, também, utilizados para detectar a adição fraudulenta de leite desta raça no fabrico de certos queijos tradicionais da região dos Alpes Franceses. Como as raças locais dessa zona eram de pelagem castanha, a mistura de leite de Holstein (malhada de preto) seria facilmente detectável através da análise deste gene. Isso foi de facto possível porque no leite de vaca são excretadas células do epitélio da glândula mamária, tornando exequível a extracção de DNA a partir de leite e a realização dos respectivos testes. O gene MC1R desempenha um papel muito relevante na variação da coloração noutras raças de animais como, por exemplo, em porcos e em coelhos, e a pressão de selecção exercida pelo homem é, nestes dois casos, especialmente compreendida porque é possível confrontar os padrões de diversidade genética observados em estirpes domésticas com aqueles descritos para as respectivas formas selvagens ancestrais. Adicionalmente, têm sido encontrados e descritos molecularmente outros genes implicados na variação da cor da pelagem de mamíferos, como o *agouti*, o *kit*, ou a tirosinase. A utilização de toda esta informação pode, actualmente, ser aplicada na previsão da cor da pelagem de futuras crias em várias espécies, e é especialmente relevante quando a cor se encontra associada a alguma outra característica desejável.

Finalmente, refira-se também o grande interesse que existe no estudo da dispersão da maior parte das espécies domesticadas por regiões geográficas de características muito diferentes, e que proporcionaram adaptações também necessariamente diferentes, cujos processos estão ainda por investigar. O transporte do gado bovino, mas sobretudo do gado ovino e caprino, para regiões com amplas diferenças ambientais e ecológicas em termos de temperatura, humidade, disponibilidade de água e recursos alimentares deverá ter estado na origem de processos selectivos muito diferentes, que por sua vez terão deixado marcas distintas no genoma das diferentes raças. Futuramente, a utilização de diferentes tipos de marcadores genéticos e a compreensão das bases moleculares da variação das características sob selecção, permitirão, certamente, o aprofundamento do conhecimento sobre a história das populações, raças e espécies que o homem tem modificado e utilizado desde o Neolítico.

IDENTIFICAÇÃO E PARENTESCO

A utilização de métodos moleculares é hoje indispensável na identificação específica e rastreabilidade de produtos de origem animal e vegetal, na verificação de relações genealógicas, e na identificação de populações ou raças de origem.

O B J E C T I V O S

- Definem-se e exemplificam-se as principais estatísticas utilizadas na identificação individual e análise da paternidade/maternidade.
- Referem-se algumas das metodologias disponíveis para proceder à identificação da população ou raça de origem de um indivíduo.



ENQUADRAMENTO Nos últimos anos, os grandes avanços no conhecimento de muitos genomas de espécies animais e vegetais domésticas permitiram a emergência de um conjunto de ferramentas moleculares e estatísticas que são hoje absolutamente indispensáveis na caracterização, gestão e conservação dos recursos genéticos. De entre os vários tipos de marcadores moleculares disponíveis, os microssatélites são aqueles que encontram uma mais vasta aplicabilidade em questões como a identificação individual, a rastreabilidade de produtos de origem animal e vegetal, a verificação e estabelecimento de relações genealógicas e avaliação do grupo de origem de um determinado indivíduo. No futuro, é previsível que este domínio da utilização dos marcadores moleculares continue a expandir-se rapidamente e a encontrar novas aplicações.

IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL E RASTREABILIDADE

Durante muito tempo, o polimorfismo dos grupos sanguíneos e das proteínas foi utilizado como apoio aos métodos de identificação animal. Contudo, a generalização e aplicação em larga escala deste tipo de métodos só se tornou possível com a descoberta dos microssatélites e a sua análise rápida através da utilização de um sequenciador automático. Na verdade, os microssatélites são marcadores moleculares muito variáveis que normalmente exibem mais de dez alelos por população, pelo que uma bateria relativamente reduzida permite obter valores de probabilidade de identificação individual para lá de qualquer dúvida razoável (ver destaque neste capítulo). No entanto, para poder efectuar este tipo de cálculos, é necessário determinar previamente as frequências alélicas dos microssatélites utilizados para caracterizar as raças de interesse. Este é um trabalho bastante moroso porque a obtenção de estimativas adequadas das frequências alélicas em marcadores hiper-variáveis requer amostragens bastante elevadas que, em geral, envolvem pelo menos algumas centenas de indivíduos.

CÁLCULO DA PROBABILIDADE DE IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL

Nos últimos anos, realizaram-se em Portugal vários trabalhos em que se procedeu à caracterização genética de raças

bovinas autóctones através da utilização de microssatélites. A título de exemplo, indicam-se as frequências alélicas (f) determinadas



em cinco microssatélites – ETH3, INRA23, INRA37, TGLA44 e HEL9 – na raça bovina | Barrosã e calcula-se a probabilidade de encontrar um determinado perfil genético.

LOCUS	ALELO	f	LOCUS	ALELO	f	LOCUS	ALELO	f
ETH3	109	0.04	INRA23	199	0.13	INRA37	118	0.01
	117	0.24		201	0.03		122	0.02
	119	0.17		207	0.17		124	0.19
	121	0.01		209	0.15		126	0.18
	123	0.04		211	0.05		128	0.08
	125	0.43		213	0.05		130	0.13
	127	0.04		215	0.20		132	0.37
	129	0.02		217	0.22		136	0.01
	133	0.01					138	0.01

LOCUS	ALELO	f	LOCUS	ALELO	f
tgla44	160	0.05	HEL 9	147	0.02
	162	0.31		149	0.01
	164	0.07		151	0.01
	166	0.29		153	0.18
	168	0.09		155	0.09
	170	0.03		157	0.01
	172	0.10		159	0.06
	174	0.02		161	0.30
	176	0.02		163	0.29
	178	0.02		165	0.02
				167	0.01

Se agora se considerar, por exemplo, a ocorrência do perfil genético ETH3 (117/127) - INRA23 (209/209) - INRA37 (124/136) – TGLA44 (168/170) – HEL9 (153/163), | é possível calcular a sua probabilidade de ocorrência na população assumindo o equilíbrio de Hardy-Weinberg:

$$2 \times 0.24 \times 0.04 \times 0.15 \times 0.15 \times 2 \times 0.19 \times 0.01 \times 2 \times 0.09 \times 0.03 \times 2 \times 0.18 \times 0.29 = 9,2 \times 10^{-10}$$

Como se pode observar, a utilização de apenas cinco microssatélites permite dizer que este perfil genético particular tem uma probabilidade aproximada de um num bilião. Naturalmente que a adição de mais alguns | microssatélites igualmente variáveis resulta em valores de probabilidade ainda mais baixos, o que torna este método de identificação extremamente fiável.

Com o surgimento de doenças como a encefalopatia espongiforme bovina e conseqüente instalação de um clima de desconfiança no mercado agroalimentar, os consumidores começaram a exigir a certificação dos produtos alimentares e a sua rastreabilidade, isto é, a capacidade de poder seguir o

circuito percorrido, por exemplo, pela carne do gado bovino, desde o nascimento dos animais junto dos criadores, passando pelos locais de abate e, finalmente, até aos postos de distribuição e venda. Esta rastreabilidade é, em princípio, assegurada pelo sistema de identificação e registo animal, mas como este sistema não está livre de fraudes e outro tipo de problemas, a utilização de microssatélites para a determinação de perfis genéticos permite verificar, sem margem para dúvidas, a origem de um animal.

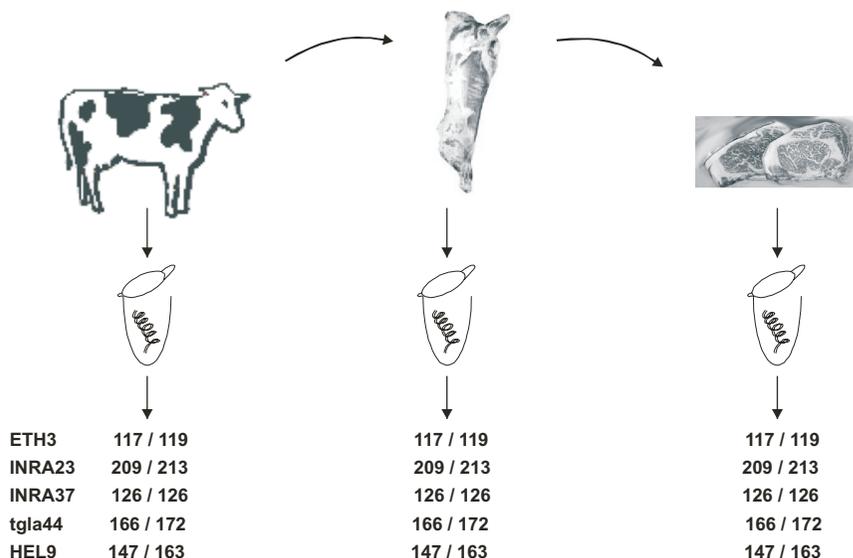


Figura 6.1 • Rastreabilidade da carne bovina desde o criador até à venda ao consumidor. Neste caso, a utilização de cinco microssatélites permitiu confirmar que as amostras de material biológico retiradas em diferentes momentos daquele percurso tinham origem no mesmo indivíduo.

ANÁLISE DA FILIAÇÃO BIOLÓGICA

Os microssatélites são, também, os marcadores moleculares mais úteis para proceder a análises de parentesco, ou de controlo da filiação biológica. Actualmente, uma bateria de 6 – 10 microssatélites hiper-variáveis é suficiente para responder à maior parte dos casos em que se torna necessário estabelecer a paternidade e/ou maternidade de um animal numa determinada população. A utilização destes testes é hoje uma rotina em muitas raças autóctones para efeitos de inscrição dos novos animais nos respectivos Livros Genealógicos, e também em raças de produção, como é o caso da Frísia.

A análise de um caso de investigação da paternidade segue um procedimento muito simples, em que se comparam duas hipóteses:

H1: o presumível pai é, de facto, o pai

H0: o pai é outro indivíduo da população

De posse de amostras de material biológico do trio pai-mãe-filho, procede-se à determinação dos respectivos genótipos e subsequente interpretação de acordo com as seguintes probabilidades:

X – probabilidade de observar o conjunto de resultados obtidos no filho dados os genótipos dos pais e assumindo H1; e

Y – probabilidade de observar o conjunto de resultados obtidos no filho dados os genótipos dos pais e assumindo H0.

Calcula-se, em seguida, o índice de paternidade, dado por

$$L = X/Y,$$

e a sua transformação percentual,

$$W = L / (L+1),$$

designada por probabilidade de paternidade. Os valores de L são calculados para cada microsatélite e podem ser interpretados como a avaliação de quantas vezes é mais provável explicar os resultados através da assunção de uma verdadeira relação genealógica do que do acaso. O valor final de L é simplesmente o produto dos seus valores parcelares. Finalmente, a interpretação dos valores de W é auxiliada por uma tabela de predicados verbais que procura simplificar a informação que se quer transmitir.

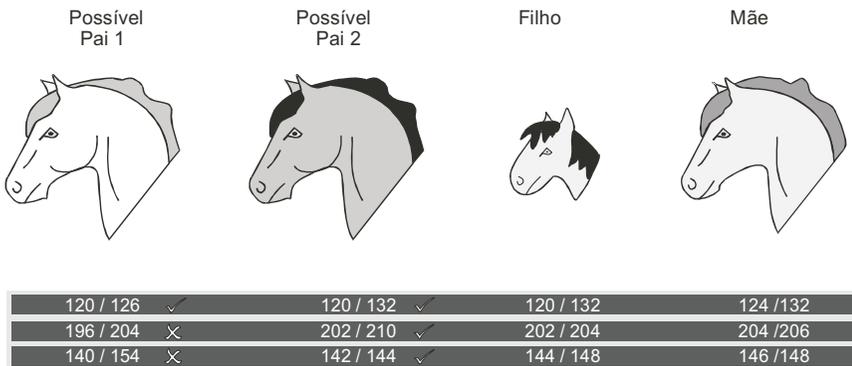


Figura 6.2 • Exemplo de um processo de investigação da paternidade com dois possíveis pais e assumindo como verdadeira a ligação mãe-filho. Com apenas três microsatélites, verifica-se que o possível pai 1 mostra duas exclusões enquanto o possível pai 2 tem um perfil genético compatível com a paternidade. A utilização das frequências alélicas que caracterizam a raça em questão permite depois calcular o valor da probabilidade de paternidade (W)

Em geral, o elevado grau de polimorfismo dos microssatélites tem como consequência o aparecimento de valores muito altos de W , confirmando a paternidade, ou então de múltiplas incompatibilidades, que indicam a exclusão do indivíduo analisado. Contudo, deve referir-se que, em virtude da alta taxa de mutação dos microssatélites, é possível acontecer que um indivíduo que é de facto verdadeiro pai seja excluído da paternidade num determinado microssatélite. Actualmente, estão disponíveis expressões para o cálculo da probabilidade de paternidade que incluem a possibilidade de ocorrer uma mutação precisamente no caso que está a ser examinado, evitando-se assim incorrer em erros de análise genealógica.

IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO OU RAÇA DE ORIGEM

A identificação da população ou raça de origem de um determinado indivíduo, ou ainda de um produto de origem animal, é uma questão que se coloca cada vez com mais frequência e cuja resolução não é tão simples como a das referidas anteriormente. De facto, a maior parte da diversidade genética das espécies domésticas existe no seio das populações e não entre as populações, em resultado da história muito recente da domesticação e da diferenciação das raças. Este aspecto é ainda mais acentuado quando se trata, por exemplo, do conjunto de raças de uma determinada espécie num determinado país, que são, necessariamente, muito mais aparentadas entre si. Na verdade, como a única possibilidade de estabelecer com um elevado grau de probabilidade que um indivíduo é proveniente de uma determinada população ou raça é explorar as pequenas diferenças existentes entre raças nas frequências alélicas de um conjunto de microssatélites, torna-se necessário analisar uma quantidade muito significativa deste tipo de marcadores. Se a este facto se associar o já referido trabalho requerido para determinar com precisão as frequências alélicas desses marcadores em dez ou mais raças diferentes, percebe-se facilmente que a resposta à questão da identificação da população ou raça de origem de um indivíduo seja, na maior parte dos casos, muito difícil de obter actualmente, ou pelo menos bastante imprecisa.

De uma forma geral, a metodologia utilizada para proceder a este tipo de análise baseia-se, também, na obtenção de um perfil genético para o indivíduo de origem desconhecida e, posteriormente, na estimativa da verosimilhança da sua proveniência de cada uma das populações ou raças existentes. Esta estimativa é efectuada recorrendo, precisamente, às bases de dados onde estão armazenadas as respectivas frequências alélicas. Actualmente,

existem diversos programas de computador que permitem fazer estes cálculos de uma forma relativamente rápida e que se tornaram, por isso, preciosos auxiliares nesta área da gestão dos recursos genéticos.

No futuro, à medida que as bases de dados genéticas sobre as populações e raças domésticas forem sendo enriquecidas com dados provenientes de mais marcadores moleculares, será talvez possível escolher criteriosamente aqueles que mostrem um maior grau de diferenciação entre elas e sejam, por isso, mais informativos no que se refere à filiação populacional de um indivíduo.

AS TRANSFORMAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Nos últimos anos, o desenvolvimento da biotecnologia e a emergência de técnicas como a inseminação artificial, a obtenção de plantas e animais transgênicos e a clonagem transformaram definitivamente a forma tradicional de fazer agricultura.

O B J E C T I V O S

- Explicam-se as principais consequências do desenvolvimento da biotecnologia na agricultura.
- Refere-se a importância e inovação dos programas de selecção assistida por marcadores.
- Discutem-se as implicações relacionadas com a utilização de inseminação artificial, produção de transgênicos e clonagem nas práticas agrícolas contemporâneas.



ENQUADRAMENTO Os avanços na área das ciências biológicas após o final da Segunda Guerra Mundial culminaram no aparecimento ou emancipação de certas disciplinas que até então eram praticamente desconhecidas ou pouco desenvolvidas. A biotecnologia foi precisamente um dos casos que mais sucesso obteve a partir dos finais dos anos setenta. Esta disciplina nasce da interacção entre diferentes áreas da biologia (bioquímica, biologia celular, microbiologia, genética) e da engenharia moderna (materiais, electrónica, robótica, física, química) para o processamento de materiais ou sistemas de origem biológica. Quando aplicada ao desenvolvimento agrícola sustentável, a biotecnologia pode revelar-se uma ferramenta bastante útil. A sua acção no campo agrícola estende-se desde as técnicas reprodutivas, como a inseminação artificial e a manipulação, transferência genética e clonagem, até às técnicas de biologia molecular destinadas à quantificação e apoio à conservação dos recursos genéticos. Assim, a aplicação de técnicas biotecnológicas tem um enorme potencial no aumento da produtividade agrícola e na melhoria das condições de vida dos animais e das pessoas. Por exemplo, o desenvolvimento de vacinas contra doenças endémicas que assolam os animais ou plantas de certas regiões tem permitido o aumento da produção agrícola. O mesmo tipo de acção pode ser desenvolvido de forma a melhorar as condições de vida, e em especial de saúde, dos povos de algumas regiões marginais mais desfavorecidas. Por exemplo, a manipulação genética permitiu incorporar pró-vitamina A (beta-caroteno) e ferro no arroz, conseguindo-se, assim, minorar as carências destes oligoelementos em algumas populações humanas com acesso a recursos alimentares de baixa qualidade.

A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Designa-se por inseminação artificial o acto não natural de colocar sémen no tracto reprodutivo da fêmea com o intuito de a fecundar. A utilização desta técnica remonta ao século XIV, altura em que alguns criadores de cavalos árabes introduziam uma esponja embebida em sémen, acabado de colher de um garanhão, na vagina das éguas. Ao longo dos tempos, esta técnica tem vindo a ser progressivamente aperfeiçoada, podendo referir-se a primeira inseminação artificial feita na cadela por Spallanzani. Foi, aliás, este fisiologista italiano quem demonstrou, pela primeira vez, que só os espermatozóides eram responsáveis pela fertilização do óvulo. Mais tarde, já no século XX (1914), um cientista russo de nome Ivanov aplicou esta técnica aos bovinos. Mas só 1937, quando Sorensen, um veterinário dinamarquês, desenvolveu a técnica de inseminação retro-vaginal, esta passou a ser prática comum, mantendo-se até aos dias de hoje. Mais recentemente, os avanços biotecnológicos permitiram a síntese de algumas hormonas sexuais, nomeadamente as

que intervêm no ciclo ovulatório das fêmeas, permitindo a sincronização do estro de forma a tornar mais efectivo o controlo e detecção do cio e facilitar o maneio reprodutivo. Finalmente, a identificação de zonas específicas do cromossoma Y (que está presente unicamente nos machos) veio permitir a determinação molecular do sexo no sémen através da utilização da técnica de PCR (ver Capítulo 3).

Mas o desenvolvimento e posterior adaptação da técnica de inseminação artificial a cada uma das espécies domésticas, não só trouxe vantagens no dia-a-dia da produção animal, como também se tornou numa preciosa ajuda à conservação dos recursos genéticos animais. A possibilidade de armazenar sémen em condições artificiais (normalmente por congelamento em contentores de azoto líquido) permite, por exemplo, a preservação de um número maior de machos sem ser necessária a sua presença nas explorações. Consegue-se, assim, evitar casos de endogamia (ver Capítulo 4), principalmente em populações muito pequenas, que dispõem de muito poucos machos, ou em sistemas agrícolas cujas características não permitem a manutenção de machos adultos. Esta tecnologia possibilita, ainda, a escolha dos machos a usar em emparelhamentos controlados, e a eliminação de problemas de contágio de doenças sexualmente transmissíveis que podem baixar a fertilidade das fêmeas.

No entanto, esta técnica também pode trazer desvantagens, nomeadamente por facilitar a miscigenação entre animais de raças exóticas e autóctones, ou acelerar a endogamia no caso de o sémen do mesmo macho ser excessivamente usado. Não pode, na verdade, esquecer-se que o uso descontrolado da inseminação artificial foi um dos factores que mais contribuiu para a quase extinção, por miscigenação, de um grande número de raças locais (inclusivamente de algumas portuguesas).

A SELECÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES

A informação genética contida na molécula de DNA é a base da vida de todos os organismos. Esta informação encontra-se compilada em pequenas unidades denominadas genes que, por sua vez, estão organizados num conjunto mais complexo chamado genoma. Assim, a descodificação do genoma de uma espécie pode constituir uma etapa fundamental para entender uma série de processos biológicos a ela associados. Na última década, tem sido feito um esforço enorme nas áreas da biologia molecular e da biotecnologia para descodificar os genomas das principais espécies domésticas, estando

actualmente concluídos, ou em fase de conclusão, o do cão, o da galinha, o do arroz e o do milho, e espera-se que dentro de dois anos estejam completos os da vaca, do porco, do cavalo e da ovelha.

Porém, enquanto o processo de sequenciação do genoma de algumas espécies não está terminado, não estão disponíveis os elementos necessários para procurar compreender a base genética da expressão de muitas características de interesse. Por exemplo, a capacidade de produção de leite, o tamanho do ciclo de vida de uma planta, ou a resistência a determinadas doenças, são algumas das características que se procura conhecer melhor. Em geral, ainda se desconhece se uma determinada característica resulta da expressão de um ou mais genes, se estão todos localizados na mesma região do genoma, ou qual o resultado da interacção entre o meio ambiente e a expressão desses genes.

Há muito tempo que os agricultores estão habituados a avaliar a expressão de alguns caracteres em relação ao meio ambiente e a utilizar essa informação em programas de selecção. Mas, em virtude da complexidade que envolve a expressão de alguns desses caracteres, apenas a intervenção de especialistas capazes de os quantificar poderá ajudar, efectivamente, a perceber essas interacções. Estes especialistas trabalham no domínio da genética quantitativa e servem-se de modelos estatísticos para separar os factores genéticos dos factores ambientais, por forma a estabelecer a melhor estratégia de selecção tendo em vista o aumento ou a diminuição da frequência de uma determinada característica.

Até à década de noventa do século passado, a maior parte dos dados avaliados pelos geneticistas quantitativos provinha de medidas obtidas após a expressão das características de interesse, ou seja, da análise do fenótipo estudado (por exemplo, o ganho diário de peso, o número de litros de leite produzidos por lactação, a produção de trigo por hectare, a capacidade de resistência a pragas). Com o extraordinário desenvolvimento da biologia molecular e o surgimento da técnica de PCR (ver Capítulo 3), passou a ser possível gerar centenas, ou mesmo milhares, de marcadores moleculares definidos pela ocorrência de pequenas variações na sequência de DNA. Como na maior parte das vezes estes marcadores não se encontravam dentro do gene envolvido na manifestação de uma determinada característica, tornou-se necessário avaliar o grau de associação entre eles. Nos casos em que se demonstrou uma estreita ligação entre um determinado marcador molecular e o gene implicado na expressão de uma característica sob selecção, passou a ser possível utilizar esse marcador no processo de selecção, resultando naquilo que se conhece hoje como selecção assistida por marcadores. Actualmente, os marcadores moleculares, e em especial os microssatélites (ver Capítulo 3), são largamente utilizados em programas de melhoramento genético das espécies animais e vegetais domésticas. A título de exemplo, refira-se a descoberta, na

década de noventa, de vários microssatélites localizados no cromossoma 1 de *Bos taurus* associados à presença ou ausência de cornos, a certas doenças e a um aumento da produção de leite (ver figura 7.1). Isto permitiu encurtar a área de pesquisa na região cromossômica de interesse, e encontrar rapidamente os genes responsáveis por aquelas características.

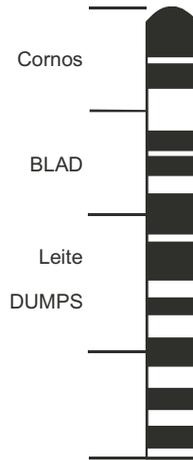


Figura 7.1 • Localização aproximada, no cromossoma 1 de *Bos taurus*, dos genes relacionados com a presença/ausência de cornos, algumas doenças genéticas (DUMPS e BLAD) e aumento da produção de leite

OS ANIMAIS E PLANTAS TRANSGÊNICOS

Segundo os últimos cálculos da FAO, a população mundial atingirá brevemente oito bilhões de pessoas, dois terços das quais serão habitantes de países em vias de desenvolvimento. Este crescimento demográfico da espécie humana necessita de um concomitante aumento da produção agrícola, esperando-se que o recurso à biotecnologia possa auxiliar formas mais adequadas de aumentar os recursos alimentares em determinadas regiões do globo. A criação de organismos transgênicos é uma das várias possibilidades técnicas desenvolvidas pela biotecnologia que permitem acelerar o melhoramento de determinadas características genéticas nos animais e nas plantas. Designa-se por organismo transgênico todo o animal, planta ou microorganismo no genoma do qual foi inserido, artificialmente, um ou mais genes. Em geral, os genes inseridos visam o melhoramento de uma característica específica ou a possibilidade de produção de uma determinada proteína que não seria naturalmente expressa pelo organismo nativo. Por exemplo, a produção, no leite de cabra, de insulina destinada a diabéticos, ou a resistência do milho a um

determinado vírus, herbicida ou insecto, constituem bons exemplos da aplicação da tecnologia dos organismos transgênicos. Actualmente, esta técnica é particularmente utilizada em produção vegetal, estimando-se que no ano 2000 existissem 44 milhões de hectares cultivados com plantas transgênicas.

Nas plantas, a técnica de inserção artificial de genes pode ser feita de duas maneiras distintas. A primeira consiste em disparar microprojecteis impregnados com o material genético que se pretende inserir sobre a planta que se quer modificar, e é especialmente usada na produção de milho e arroz transgênicos (ver figura 7.2). A segunda baseia-se na utilização de certas bactérias – por exemplo, *Agrobacterium tumefaciens* - como vectores de transferência. Estas bactérias têm a capacidade de infectar algumas plantas, transferindo partes do seu DNA para dentro das células das plantas hospedeiras e levando a planta a expressar alguns dos seus genes. Esta técnica é utilizada em plantas de folha larga, como o tomateiro e a soja.

Mais recentemente, uma das mais arrojadas experiências no campo dos transgênicos consiste na inclusão, em algumas plantas como o tomate ou a alface, de genes capazes de expressar certas proteínas que, quando ingeridas, activam o sistema imunitário do consumidor e funcionam como vacinas contra um determinado agente infeccioso. Embora este tipo de projectos esteja ainda numa fase experimental, outros já começaram a produzir resultados, podendo destacar-se a já referida transferência de genes responsáveis pela retenção de ferro e pela produção da pró-vitamina A no arroz.

Porém, não é demais referir que o uso de plantas transgênicas poderá trazer alguns riscos ambientais no caso de estas removerem ou competirem com outras plantas naturais, não as deixando desenvolver na sua presença, ou perturbando o ciclo natural de espécies animais (por exemplo, algumas borboletas). As plantas transgênicas também podem afectar a saúde humana, nomeadamente devido à produção de substâncias alergénicas, ao facto de causarem resistência a certos antibióticos por transferência genética horizontal, e ainda por reduzirem a qualidade nutritiva das plantas originais (por exemplo, a couve-flor). É necessário, por isso, desenvolver meios de monitorização eficientes e capazes de assegurar que o cultivo de plantas transgênicas não implica riscos acrescidos.

Nos animais, a produção de transgênicos é utilizada, sobretudo, com funções farmacêuticas. Neste caso, pretende-se que um determinado animal transgénico passe a funcionar como um bio-reactor, produzindo uma determinada substância (proteína) que excreta pelo leite, ovos ou carne, e que depois de purificada possa ser utilizada no fabrico de medicamentos (por exemplo, insulina). Esta técnica desenvolve-se pela incorporação de material genético no ovo, através de uma micro-injecção (ver figura 7.3). Como todas as células que vão formar o novo animal resultam desta célula

inicial, assegura-se assim que o gene inserido esteja presente no organismo transgénico, que deverá poder expressar uma determinada proteína sem que isso prejudique o seu bem-estar.

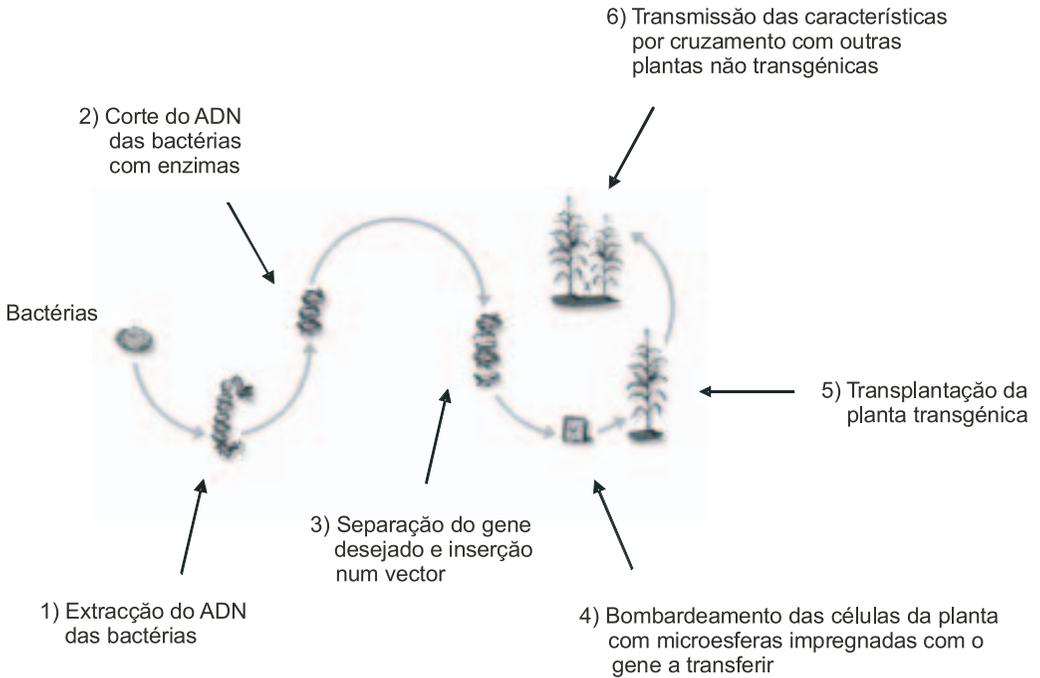


Figura 7.2 • Criação de uma planta transgénica pelo método de microprojecteis

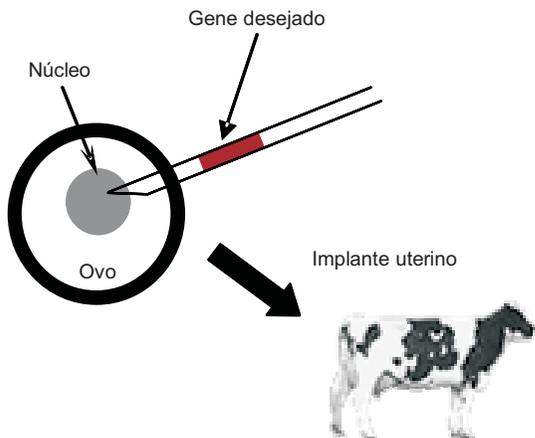


Figura 7.3 • Um dos métodos de produção de animais transgénicos por micro-injecção

A CLONAGEM

Entende-se por clonagem o processo de criar um organismo geneticamente idêntico a um outro, pré-existente, sem recorrer à reprodução sexual, ou seja, não envolvendo a participação de um dos progenitores (masculino ou feminino). Um clone é, então, geneticamente igual ao organismo a partir do qual foi originado. A descoberta da clonagem perde-se no tempo, uma vez que algumas técnicas de reprodução há muito utilizadas pelo homem, como, por exemplo, a enxertia das árvores ou a replantação dos dentes de alho, não são mais do que a aplicação da clonagem para melhorar as características de uma planta.

Nos animais domésticos, a utilização desta técnica é bastante mais complexa e recente. A clonagem tornou-se do domínio público com o nascimento da famosa ovelha Dolly, em 1997. Seguiram-se, depois, outras espécies, como a vaca, o cavalo e o cão. O procedimento utilizado baseia-se na transferência do núcleo de uma célula somática para dentro de uma célula germinal à qual o núcleo fora previamente retirado. Note-se que células somáticas são todas as células que constituem o corpo com excepção das células reprodutivas, ou germinais (óvulo e espermatozóide). Nos mamíferos, todas as células somáticas possuem, no seu núcleo, duas cópias de cada um dos cromossomas, enquanto que nas células germinais existe apenas uma cópia. Para criar a ovelha Dolly, os investigadores isolaram uma célula somática de uma ovelha adulta e, seguidamente, transferiram o núcleo dessa célula para um ovo desprovido de núcleo. Depois de alguns procedimentos químicos, o ovo contendo o núcleo acabado de transferir começa a dividir-se como se tratasse de um ovo logo após a fertilização. A partir daí desenvolve-se até à fase de embrião, e é depois implantado numa ovelha adulta, previamente preparada para o acolher até ao seu desenvolvimento completo. Assim, a ovelha Dolly foi uma cópia exacta da ovelha adulta à qual tinha sido retirada a célula somática inicial.

Actualmente, a clonagem pratica-se num número ainda muito restrito de laboratórios e o seu sucesso é reduzido. No entanto, é possível que esta situação venha a mudar futuramente com o progresso da investigação, abrindo amplas possibilidades de aplicação no domínio da agricultura.

A CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS GENÉTICOS

A combinação de técnicas de conservação *in-situ* e *ex-situ* associada a sistemas de monitorização do efectivo populacional das raças ameaçadas de extinção e ao desenvolvimento de bancos de germoplasma permite encarar com optimismo o futuro dos recursos genéticos animais e vegetais.

O B J E C T I V O S

- Introduzem-se as circunstâncias que determinaram o reconhecimento da importância dos recursos genéticos.
- Descrevem-se os diferentes tipos de conservação dos recursos genéticos animais e vegetais.



ENQUADRAMENTO O progressivo empobrecimento da diversidade biológica a todos os seus níveis descrito nas últimas décadas tem vindo a estimular a comunidade internacional a lançar várias iniciativas no âmbito da conservação dos recursos genéticos domésticos e selvagens. Em 1992, a Organização das Nações Unidas (ONU) promoveu a Conferência Internacional do Rio de Janeiro, na qual se assinou o primeiro tratado sobre a conservação da biodiversidade do planeta. Portugal e a União Europeia foram dois dos signatários deste acordo, que reconhece a importância da salvaguarda dos recursos genéticos domésticos. Algum tempo depois, a União Europeia lançou um programa de apoio à conservação das raças e variedades locais. Com este programa, duas grandes linhas de acção foram empreendidas. A primeira foi dirigida aos agricultores e suas organizações sociais com o fim de recensear e catalogar as raças e variedades locais. Dela faz parte o apoio à constituição de associações de criadores capazes de instituir e gerir os livros genealógicos das raças animais, bem como à criação de bancos de germoplasma para catalogar e perpetuar as espécies e variedades locais de plantas domésticas. A segunda lançou um programa de financiamento de projectos científicos que visam o estudo e caracterização genética, através da utilização de marcadores moleculares, das raças e variedades domésticas locais.

No âmbito desta iniciativa internacional, cada país é responsável por eleger as espécies e variedades que devem ser inseridas em programas de conservação, fornecendo a FAO apoio logístico (no caso dos países mais pobres e subdesenvolvidos) e consultivo (no caso dos países em vias de desenvolvimento) na definição das estratégias de programação. O primeiro passo para a elaboração de um programa de conservação começa com a catalogação e realização de estimativas do número de indivíduos que constituem as variedades e raças existentes num país. Para cada raça, ou variedade, deve ser feita uma descrição fenotípica detalhada, bem como elaborada a distribuição dos indivíduos que a constituem definindo, sempre que possível, a respectiva região de origem. Deverão, também, ser anotados os principais usos de cada uma delas, bem como a caracterização dos sistemas agrícolas de origem e o impacto cultural e ambiental que cada uma destas variedades tem no meio em que se insere. Deve-se, ainda, numa primeira fase, proceder à identificação dos principais factores que contribuem para a erosão dos recursos genéticos. A hibridação com outras raças ou variedades exóticas é uma das principais causas de declínio dos recursos genéticos nativos (ver destaque neste capítulo).



A DESPISTAGEM E ELIMINAÇÃO DO GENE DO HALOTANO EM PORCOS

A síndrome do stress porcino (PSS), vulgarmente associada ao gene do halotano, manifesta-se devido à sensibilidade que alguns indivíduos desenvolvem na presença de anestésicos voláteis (isto é, halotano). Esta síndrome é consequência de uma deficiência no canal libertador de cálcio do retículo sarcoplasmático das células musculares que, por sua vez, resulta de uma mutação no gene que codifica o receptor da riadonina (RYR1). A deficiência provoca um aumento anormal de iões Ca^{2+} no interior do sarcoplasma em virtude da perda de capacidade de controlo do fluxo destes iões, causando uma subida abrupta da temperatura, tremores musculares, taquicardia, e terminando na maior parte das vezes com a morte do indivíduo. A PSS está na origem de carcaças com um pH baixo, isto é, carnes de baixa qualidade, pálidas, moles e exsudativas, vulgarmente designadas por carnes PSE. Nas décadas de 20 e 30 do século XX, surgiram na Alemanha as primeiras descrições de casos de morte por hipertermia, seguida de fortes contracções musculares e paragem cardíaca. Como a maioria dos casos detectados envolvia animais da raça Pietran, esta passa a estar ligada à origem desta síndrome. Na década de 70, surge o primeiro teste de despistagem desta síndrome baseado na exposição dos animais à presença do gás halotano. Este teste permitia identificar os indivíduos predispostos à PSS uma vez que, na presença daquele gás, os animais sensíveis entravam em hipertermia, contracção muscular e taquicardia seguida de paragem cardíaca. Mais tarde, durante a década de 80, vários estudos mostraram que a sensibilidade ao halotano tem origem genética, passando esta característica a ser designada por *gene do halotano* devido às razões atrás invocadas. Só no início da dé-

cada de 90, um grupo de geneticistas japoneses conseguiu isolar o gene e detectar, na sequência de DNA, a mutação responsável pela ocorrência da PSS. Actualmente, para identificar esta síndrome, é apenas necessário colher uma amostra de material biológico do animal (sangue, pele, pelos), proceder a uma extracção de DNA e amplificar por PCR um pequeno fragmento do DNA extraído contendo o local onde ocorre a mutação. Após a reacção de PCR, a presença ou ausência da mutação é feita através da utilização de uma enzima de restrição que tem a capacidade de reconhecer a sequência mutante, cortando-a. No caso do gene RYR1, cada indivíduo é portador de dois genes, um herdado do pai e outro herdado da mãe. O gene normal, ou seja, aquele que não sofreu mutação, é aqui designado por **N**(egativo), enquanto que o *gene do halotano*, ou seja, aquele que contém a mutação, é designado por **P**(ositivo). Quando um indivíduo tem os dois genes iguais, como por exemplo **NN** ou **PP**, diz-se **homozigótico**. Quando os dois genes são diferentes, isto é **NP**, o indivíduo diz-se **heterozigótico**. Nestas condições, e de acordo com a sua constituição genética, um indivíduo é (1) *halotano resistente NN*, (2) *halotano sensível PP*, e (3) *halotano portador NP*, em que o animal é menos susceptível do que os indivíduos **PP**. Nos últimos anos, esta metodologia tem sido aplicada num programa de recuperação e conservação da raça Bísara, existente no Norte de Portugal. Na verdade, durante muito tempo esta raça local foi cruzada com outras raças exóticas que trouxeram o gene do halotano e colocaram em risco a sua conservação. A aplicação de um teste RFLP permitiu identificar todos os indivíduos portadores do gene não desejado e decidir pela sua não utilização como reprodutores.

OS RECURSOS ANIMAIS

Terminado o processo de inventariação das populações de animais domésticos, os principais agentes envolvidos no meio (agricultores, criadores) devem ser convidados e incentivados a participar no estabelecimento de um plano de recuperação (se for caso disso) e conservação de cada população. Assim, logo que uma determinada população se inclua num determinado padrão biométrico e morfológico, todos os indivíduos incluídos no levantamento que se insiram nesse padrão devem passar a estar registados num livro zootécnico como fundadores.

De acordo com o tamanho efectivo (número de animais adultos reprodutores) de cada uma das populações, estas passam a estar classificadas quanto ao seu risco de extinção. A FAO propôs a categorização do risco de extinção em seis escalões, que se descrevem seguidamente.

Extinta – quando não resta nenhum reprodutor (feminino ou masculino), nem existem armazenados *in-vitro* células reprodutivas (óvulos e espermatozóides) ou embriões.

Em estado crítico – quando existem menos de cinco machos ou o número total de indivíduos não excede os 100.

Criticamente estável – quando, ainda em estado crítico, passa a ter um plano de conservação em execução.

Em risco – todas as raças com menos de 1000 fêmeas reprodutoras, ou menos de 20 machos reprodutores, ou ainda se o total do efectivo for próximo de 1000 mas o número de fêmeas constituir mais de 80% desse efectivo.

Em risco mas estável – quando, ainda em risco, passa a estar protegida por um plano de conservação

Não ameaçada – todas as raças cujo efectivo de fêmeas reprodutoras seja superior a 1000 e o de machos superior a 20.

As estratégias de conservação passam, então, a ser definidas conforme o risco de extinção atribuído e a diversidade genética dessa raça. As estratégias de conservação *in vivo* classificam-se em dois grupos e designam-se por métodos *in-situ* e métodos *ex-situ*. No primeiro caso, os animais não são retirados do seu meio e organizam-se registos de dados de produção para estabelecer programas de melhoramento genético e incentivos à criação de sistemas de produção sustentada através da atribuição de mais-valias aos criadores. No segundo caso, a conservação é feita fora do habitat e sistema de produção de origem da raça e pode incluir a criação de animais, ou recor-

rer à biotecnologia, especialmente no que se refere à criopreservação de gâmetas (sêmen e óvulos) e/ou embriões. Na maior parte dos países em vias de desenvolvimento, a escolha da estratégia de conservação é muitas vezes aplicada apenas *in-situ*, não existindo qualquer meio de preservação *ex-situ*. No entanto, a melhor forma de assegurar efectivamente a realização de um programa de conservação, em particular para as populações em risco de extinção, passa pela combinação de ambas as estratégias.

A aplicação de marcadores moleculares na determinação dos níveis de variabilidade genética e de endogamia (ver Capítulo 5) em raças locais constitui mais uma das técnicas de biologia molecular que se mostrou uma ferramenta útil no delineamento dos programas de conservação, e especialmente na escolha dos indivíduos reprodutores. A FAO, em colaboração com outras organizações científicas, recomenda a utilização de uma bateria de microssatélites para estudos deste tipo. O número e a localização destes microssatélites varia consoante a espécie em questão, mas a sua aplicação é actualmente bastante simples e de custos moderados.

OS RECURSOS VEGETAIS

Nas plantas, o estabelecimento de programas de conservação é, de uma forma geral, mais complexo. Na verdade, as plantas podem propagar-se por forma vegetativa ou sexual, sendo mesmo capazes de utilizar os dois processos. Como o tamanho efectivo das suas populações é extraordinariamente maior do que nos animais, este não pode ser um factor de classificação de uma população em relação ao seu nível de risco. Por outro lado, a inventariação das espécies é, também, mais difícil uma vez que requerem por parte dos especialistas muito mais conhecimentos de sistemática e de taxonomia do que no caso dos animais. Porém, a sua conservação é mais fácil de realizar já que encontra suporte em métodos bem estabelecidos de cultura de tecidos vegetais. Tal como nos animais, o primeiro passo para o estabelecimento de um programa de conservação dos recursos vegetais passa pela inventariação e recolha de material biológico (por exemplo, sementes e/ou frutos). Este passo deve ser apoiado, simultaneamente, por bancos de germoplasma capazes de recolher, identificar e catalogar as variedades vegetais de um país ou região. Os bancos de germoplasma devem recolher todos os recursos genéticos vegetais, independentemente de estes se propagarem de forma reprodutiva ou vegetativa. Por esta razão, devem ser recolhidas e estudadas todas variedades cultivadas actualmente ou que venham a ser de-

sempre envolvidas, aquelas que já deixaram de ser cultivadas (obsoletas), as autóctones, as espécies e variedades selvagens muito próximas das domésticas, e ainda as variedades mutantes. Embora a conservação *ex-situ* seja uma técnica bastante utilizada na conservação dos recursos vegetais, a conservação *in-situ* deve ser fomentada tal e qual como para os recursos animais.

Finalmente, refira-se que no estado actual do conhecimento, a disponibilidade de marcadores moleculares para o estudo da diversidade genética das plantas domésticas é muito mais reduzida do que nos animais. Isto deve-se, sobretudo, à complexidade dos genomas de muitas plantas e à grande diversidade de géneros e espécies domesticadas que, por estarem, em geral, filogeneticamente muito afastados, não permitem a fácil transposição de marcadores moleculares de umas espécies para outras. Por estas razões, o principal impacto resultante da aplicação de marcadores moleculares na caracterização, utilização e conservação dos recursos genéticos vegetais está, ainda, por acontecer.



Publicações em Língua Inglesa

- Avise J. (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2nd. Edition, Sinauer Associates.
- Beja-Pereira A., England P. R., Ferrand N., Jordan S., Bakhiet A. O., Abdalla M. A., Mashkour M., Jordana J., Taberlet P. & Luikart G. (2004). African origins of the domestic donkey. *Science* **304**, 1781.
- Beja-Pereira A., Luikart G., England P. R., Bradley D. G., Jann O. C., Bertorelle G., Chamberlain A. T., Nunes T. P., Metodiev S., Ferrand N. & Erhardt G. (2003). Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature genetics* **35**, 311-313.
- Beja-Pereira A., Alexandrino P., Bessa I., Carretero Y., Dunner S., Ferrand N., Jordana J., Laloe D., Moazami-Goudarzi K., Sanchez A. & Cañon J. (2003). Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. *Journal of Heredity* **94**, 243-250.
- Beja-Pereira A., Erhardt G., Matos C., Gama L & Ferrand N. (2002). Evidence for a geographical cline of casein haplotypes in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics* **33**, 295-300.
- Bradley D. G., MacHugh D. E., Cunningham P. & Loftus R. T. (1996). Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**, 5131-5135.
- Cañon J., Alexandrino P., Bessa I., Carleos C., Carretero Y., Dunner S., Ferrand N., Garcia D., Jordana J., Laloe D., Pereira A., Sanchez A. & Moazami-Goudarzi K. (2001). Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genetics Selection Evolution* **33**, 311-332.
- Cavalli-Sforza L., Menozzi P. & Piazza A. (1994). *History and geography of human genes*. - Princeton University Press
- Clutton-Brock J. (1999). *A Natural History of Domesticated Mammals*, Cambridge University Press.
- Cymbron T., Loftus R. T., Malheiro M. I. & Bradley D.G. (1999). Mitochondrial sequence variation suggests an African influence in Portuguese cattle. *Proc Royal Soc. Lond. B* **266**, 597-603.
- Diamond J. (2002). Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* **418**, 700-707.
- Diamond J. & Bellwood P. (2003). Farmers and their languages: the first expansions. *Science* **300**, 597-603.
- Excoffier L., Smouse P. E. & Quattro J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- FAO (1992). *United Nations Environment Programme Convention on Biological Diversity*, Organização para Agricultura e Alimentação, Roma.

- FAO (1996). *Primary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans (MODAD)*, Organização para Agricultura e Alimentação, Roma.
- Falconer D. S. & Mackay T. F. C. (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th Edition. Longman.
- FAO (2000). *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. Organização para Agricultura e Alimentação, Roma.
- Fox P. F. & McSweeney P. L. H., *Advanced Dairy Chemistry*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque.
- Frankham R., Ballou J. D. & Briscoe D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Fries R., & Ruvinsky A. (2000) *The Genetics of cattle*. CAB, Londres.
- Goldstein D. & Schlötterer C. (1999). *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Cambridge.
- Goldstein D. B., Ruiz Linares A., Gavalli-Stovza L. L. & Feldman M. W. (1995). Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **92**, 6723-6727.
- Giuffra E., Kijas J. M., Amarger V., Carlborg O., Jeon J. T. & Andersson L. (2000) The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* **154**, 1785-1791.
- Hall S. J. G. (2004). *Livestock Biodiversity. Genetic Resources for the Farming of the Future*. Blackwell Science, Oxford.
- Hanotte O., Bradley D. G., Ochieng J. W., Verjee Y., Hill E. W. & Rege J. E. (2002). African pastoralism: genetic imprints of origins and migrations. *Science* **296**, 336-339.
- Hartl D. L. & Clark A. G. (1997). *Principles of Population Genetics*. 3rd Edition, Sinauer Associates.
- Hemmer H. (1990). *Domestication: the decline of environmental appreciation*. Cambridge University Press.
- Kijas J. M., Wales R., Tornsten A., Chardon P., Moller M. & Andersson L. (1998). Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics* **150**, 1177-1185.
- Lindgren G., Backstrom N., Swinburne J., Hellborg L., Einarsson A., Sandberg K., Cothran G., Vilà C., Binns M. & Ellegren H. (2004). Limited number of patrilineages in horse domestication. *Nature Genetics* **36**, 335-336.
- Loftus R. T., MacHugh D. E., Bradley D. G., Sharp P. M. & Cunningham P. (1994). Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **91**, 2757-2761.
- Luikart G., Gielly L., Excoffier L., Vigne G. D., Bouvet J. & Taberlet P. (2001). Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **98**, 5927-5932.
- MacHugh D. E., Shriver M. D., Loftus R. T., Cunningham P. & Bradley D. G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* **146**, 1071-86.

- Mason I. L. (1996). *A World Dictionary of Livestock Breeds, Types and Varieties*. 4th Edition. CAB, Londres.
- Nei M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Oldenbroek J. K. (1999). *Genebanks and the conservation of farm animal resources*, DLO Inst Anim Scien Health, Lelystad.
- Price T. D. (2000). *Europe's First Farmers*. Cambridge University Press.
- Shriver M. D., Jin L., Boevwinkle E., DeKa R., Ferrell R. E. & Chakraborty R. (1995). A novel measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat loci. *Mol. Biol. Evol.*, **12**, 914-920.
- Slatkin M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.
- Troy C. S., MacHugh D. E., Bailey J. F., Magee D. A., Loftus R. T., Cunningham P., Chamberlain A. T., Sykes B. C. & Bradley D. G. (2001). Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature* **410**, 1088-1091.
- Vilà C., Leonard J. A., Gotherstrom A., Marklund S., Sandberg K., Liden K., Wayne R. K. & Ellegren H. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* **291**, 474-477.
- Vilà C., Savolainen P., Maldonado J. E., Amorim I. R., Rice J. E., Honeycutt R. L., Crandall K. A., Lundeberg J. & Wayne R. K. (1997). Multiple and ancient origins of the domestic dog. *Science* **276**, 1687-1689.
- Wright S. (1969). Evolution and the genetics of populations. Vol. 2. *The theory of gene frequencies*. University of Chicago Press.
- Zaohary D. & Hopf M, (2000) *Domestication of Plants in the Old World*. Oxford University Press, Cambridge.

Publicações Nacionais

- Caldeira, R. M. E. & Portas, M. C. P. (1999). Contributo para a classificação dos tipos de pelagens de equinos. *Veterinária Técnica*, **4**:18-32.
- Diamond J. (2003). *Armas, germes e aço : os destinos das sociedades humanas*. Relógio d'água.
- Direcção-Geral de Pecuária (1987). *Recursos Genéticos - Raças autóctones, espécies ovina e caprina*. Direcção Geral da Pecuária, Lisboa.
- Farias R. & Botelho A. (1996) *Actas das Comunicações da 1.ª Conferência Técnica sobre Recursos Genéticos Vegetais*, Banco Português de Germoplasma, Braga.
- Matos C. A. P. (2000). Recursos genéticos animais e sistemas de exploração tradicionais em Portugal. *Archivos de Zootecnia* **49**, 363-383.
- Miranda do Vale J. (1934) *Exterior dos bovinos e suínos*. Colecção Rústica - Folhetos do Agricultor. Empresa Nacional de Publicidade, Lisboa.
- Miranda do Vale J. (1976). *O exterior do cavalo*. Colecção Rústica, Editorial Notícias, Lisboa.

- Reis J. (1995). *Acerca do porco*. Federação Portuguesa de Associações de Suinicultores, Lisboa.
- Rodrigues A. (1981). *Bovinos em Portugal*. Direcção-Geral dos Serviços Veterinários, Lisboa.
- Sanchez-Belda A. (1984). *Razas bovinas españolas*, Ministério de Agricultura, Madrid.
- Santos E. & Bettencourt E. (2002). Manual de apoio à formação e treino em Conservação *ex situ* de Recursos Fitogenéticos, Instituto Internacional dos Recursos Fitogenéticos (IPIGRI), Nairobi, Quênia, e Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA), Lisboa. Disponível em formato pdf via Internet: <http://www.ipgri.cgiar.org/Themes/exsitu/RecursosFitogeneticos/PDF/Prelims.pdf>
- Serra J. L. (1979). *Anatomia, fisiologia e exterior dos animais domésticos*. Coleção Agros, Livraria Popular de Francisco Franco. Lisboa.
- Yenes-Garcia J. E. (2000) *Catálogo de raças autóctones de Castela e Leão (Espanha) – Região Norte de Portugal. I. Espécies bovina e equina*. Fundação Rei Afonso Henriques, Zamora-Matosinhos.

Portais da Internet

- Agroportal: notícias e artigos de opinião sobre a agricultura em Portugal <http://www.agroportal.pt>
- Conferência Internacional sobre a Biodiversidade, Ciência e Governança, UNESCO 24 a 26 Janeiro 2005, Paris <http://www.recherche.gouv.fr/biodiv2005paris/en/index.htm>
- Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS) Portal de Internet da FAO com informação sobre os recursos genéticos animais de todo o mundo <http://dad.fao.org/en/Home.htm>
- FAO statistics database website: Portal onde se podem pesquisar todos os dados estatísticos sobre a agricultura, alimentação e produção animal em todo o mundo, <http://faostat.fao.org>
- Portal Internet da FAO com informação sobre as políticas de saúde e produção animal de todo o mundo http://www.fao.org/waicent/faoinfo/agricult/aga/AGADA_en.asp
- Portal Internet da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN). Podem pesquisar-se todas as informações sobre espécies animais e vegetais ameaçadas e sob protecção. Disponibiliza os critérios utilizados para a conservação e classificação das espécies animais e vegetais. <http://www.iucn.org/>
- Portal Internet do Ministério da Agricultura e Pescas, <http://www.min-agricultura.pt/>

Programas de Computador

Os seguintes programas são grátis e comumente utilizados para calcular alguns parâmetros utilizados em genética de populações, que permitem avali-

ar a diversidade genética de populações, raças ou espécies a partir de frequências alélicas ou sequências de DNA.

- ARLEQUIN – Analisa frequências alélicas e sequências de DNA. Concebido por Schneider e Excoffier. Inglês. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>
- MEGA – Analisa sequências de DNA. Concebido por Kumar, Tamura e Nei. Inglês <http://www.megasoftware.net/>
- GENETIX – Analisa frequências alélicas. Concebido por Belkhir, Borsa, Chikhi, Raufaste e Bonhomme. Francês. <http://www.univ-montp2.fr/~genetix/genetix/genetix.htm>
- GENEPOP – Analisa frequências alélicas. Disponível em duas versões, online <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>, e DOS. Concebido por Raymond e Rousset. Inglês.
- CERVUS – Calcula as relações de parentesco através da utilização de perfis genotípicos. Concebido por Slate, Marshall e Pemberton <http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/cervus/cervus.html>
- Programas *on-line* para aprendizagem interactiva dos conceitos de genética de populações a partir de cenários criados pelo utilizador: Population Biology Simulations – Inglês, <http://darwin.eeb.uconn.edu/simulations/simulations.html>



AFLP • Marcadores moleculares do tipo polimorfismo de tamanho dos fragmentos amplificados. Correspondem a polimorfismos anónimos detectados através de uma combinação de enzimas de restrição, adaptadores e *primers* adequados. Normalmente, associados a um modo de transmissão com dominância/recessividade.

Alelo • Formas alternativas que podem ocupar um *locus*.

Aloenzimas • Conjunto de *loci* enzimáticos polimórficos, isto é, que exibem dois ou mais alelos comuns.

Aminoácidos • Os constituintes das proteínas. Existe 20 aminoácidos diferentes que entram na sua formação através do estabelecimento de ligações peptídicas. Uma proteína de tamanho médio tem cerca de 300-400 aminoácidos ligados em sequência.

Árvore filogenética • Representação gráfica obtida através da análise de um conjunto de sequências de DNA, correspondente a um processo de sucessivas bifurcações.



Biblioteca genómica • Conjunto de informação correspondente ao genoma de uma espécie digerida através de enzimas de restrição, e que pode ser explorada para identificar um gene ou obter uma bateria de microssatélites.

Bioinformática • Disciplina que resulta do cruzamento entre a biologia e a informática e cujo principal objecto de estudo é a análise de sequências de DNA e de proteínas contidas em grandes bases de dados.

Biotecnologia • Disciplina que investiga as aplicações tecnológicas resultantes do desenvolvimento da biologia.



Calibração molecular • Obtenção de uma taxa de divergência molecular para uma determinada sequência de DNA através da utilização de um ponto bem definido do registo fóssil.

Característica complexa • Característica cujo modo de transmissão não é mendeliano e na qual estão envolvidos factores genéticos e ambientais.

Células germinais • Células que estão implicadas na passagem da informação genética ao longo das gerações.

Células somáticas • Todo o tipo de células que constitui um organismo, com exclusão das células germinais.

Clonagem • No sentido molecular, representa a inserção de fragmentos de DNA – em geral obtidos por PCR – num vector, a que se segue a sua sequenciação. É um processo utilizado na identificação e selecção de microssatélites, ou na determinação inambígua de haplótipos em genes nucleares. No sentido reprodutivo, refere-se à obtenção de um indivíduo que é uma cópia idêntica de outro a partir de material genético de uma célula somática.

Cloroplasto • É um organelo celular que existe no citoplasma das células vegetais. Possui um pequeno genoma próprio.

Codão • Uma série de três bases na molécula de DNA (e de RNA mensageiro) a que vai corresponder um aminoácido específico.

Código genético • Código de três letras, formado a partir das quatro bases que entram na constituição do DNA, que permite a tradução da informação transportada pelo RNA mensageiro numa sequência de aminoácidos que formam as proteínas.

Consanguinidade • Reprodução entre indivíduos geneticamente aparentados.

Cromossoma • Conjunto de DNA e proteínas que se localiza no núcleo celular e cujo número é típico de cada espécie.

Cromossoma Y • Pequeno cromossoma que existe apenas nos machos dos mamíferos e tem um modo de transmissão exclusivamente paterno.



Deriva genética • Flutuação aleatória das frequências alélicas ao longo das gerações devido ao número finito de indivíduos numa população.

Desenvolvimento sustentável • Possibilidade de conciliar o desenvolvimento e bem-estar das sociedades humanas com um consumo adequado dos recursos naturais.

Desnaturação • Processo de separação das cadeias de DNA, ou das proteínas, através de métodos físicos ou químicos. A amplificação do DNA por PCR envolve, num dos passos do seu ciclo, a desnaturação do DNA através da temperatura.

Determinação molecular do sexo • Utilização de marcadores moleculares amplificáveis por PCR a fim de determinar o sexo em mamíferos e aves.

Distância genética • Corresponde a uma medida do grau de parentesco entre duas ou mais populações, raças ou espécies, ou ainda entre duas ou mais moléculas de DNA.

DNA • Ácido desoxiribonucleico, uma macromolécula de cadeia dupla e anti-paralela constituída por bases azotadas, um açúcar e fósforo, que contém a informação genética.



Encefalopatia espongiforme bovina • Doença muito contagiosa que afecta o gado bovino e é causada por uma variante modificada de uma proteína designada por príão.

Electroforese • Técnica de separação de macromoléculas – proteínas, DNA – que envolve a aplicação de um campo eléctrico e utiliza como matriz de separação um gel (amido, agarose ou poliacrilamida).

Enzimas de restrição • Enzimas isoladas a partir de bactérias que cortam o DNA em sequências específicas, normalmente com um tamanho compreendido entre 4-6 bases.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg • Situação em que as frequências genotípicas observadas e esperadas através da associação aleatória dos alelos numa população não é significativamente diferente.



Fenótipo • Característica observável de um organismo, que resulta da interacção entre o genótipo e o ambiente.

Filogenia • O conjunto de relações de ancestralidade e descendência que unem um determinado conjunto de unidades taxonómicas (espécies, géneros, famílias) e que é representado através de uma árvore filogenética.

Filogeografia • Análise da associação entre as linhagens e a geografia.

Fluxo génico • Quantidade de transferência de genes entre populações.

Focagem isoeléctrica • Técnica de separação de proteínas através da aplicação de um campo eléctrico a um gradiente de pH. As proteínas são separadas de acordo com o seu pI (ponto isoeléctrico).

Frequência alélica • Frequência de um alelo numa população.

F_{ST} • Medida de subdivisão populacional que reflecte quanto da diversidade genética de uma raça ou espécie se deve a diferenças entre populações.



Gene • Região da molécula de DNA que determina uma proteína.

Genética quantitativa • Ramo da genética que se dedica ao estudo das características complexas, determinadas por QTL.

Genoma • O conjunto de informação contida na molécula de DNA, que se organiza em cromossomas, no núcleo da célula. Inclui, ainda, os pequenos genomas que ocorrem nas mitocôndrias e nos cloroplastos.

Genómica • Disciplina que investiga a organização e evolução dos genomas.

Genótipo • Combinação de dois alelos num *locus*.



Heterozigotia • Medida da diversidade genética de um *locus* ou de uma população. Pode ser determinada pela contagem de indivíduos heterozigóticos na população (H_o , heterozigotia observada) ou através da utilização das frequências alélicas (H_e , heterozigotia esperada).

Heterozigótico • Ocorrência de dois alelos distintos num *locus*.

Hibridação • Cruzamento entre indivíduos claramente identificáveis como provenientes de populações, raças ou espécies diferentes.

Histoquímica • Conjunto de técnicas de coloração que são aplicadas na separação electroforética de proteínas a fim de detectar a sua posição no gel.

Homólogo • Característica fenotípica ou genotípica que é possível descrever em pelo menos duas espécies distintas e que partilharam um ancestral comum, do qual descendem.

Homozigótico • Ocorrência de dois alelos idênticos num *locus*.



Inseminação artificial • Colocação de sêmen no tracto reprodutivo das fêmeas com o intuito de as fecundar.



Linhagens mitocondriais • Sequência parcial ou total do DNA mitocondrial que se transmite através das fêmeas ao longo das gerações sem ocorrência de recombinação.

Locus • Qualquer região da molécula de DNA que pode ser ocupada por uma ou várias formas alternativas de um determinado estado (diferentes nucleótidos ou diferentes tamanhos de motivos repetidos, por exemplo).



Mapa genético • A sequência ordenada de um conjunto de marcadores genéticos determinada através do estudo da quantidade de recombinação entre eles. A sua associação aos diferentes cromossomas de uma espécie permitiu, depois, a construção de mapas físicos.

Marcadores moleculares • Correspondem, normalmente, a regiões polimórficas da molécula de DNA que permitem o agrupamento dos indivíduos em classes discretas, representando a variação de um *locus*. Incluem, também, os grupos sanguíneos e as aloenzimas, e são especialmente úteis na definição de mapas genéticos, em estudos de diversidade, ou em investigação de filiação biológica.

Meiose • Processo de divisão celular que culmina na produção de gâmetas haplóides.

Microssatélites • Marcadores moleculares também conhecidos por STR, e que resultam da variação do número de pequenos motivos (1 a 6 bases) repetidos múltiplas vezes – por exemplo, $(CA)_n$.

Migração • Deslocação de indivíduos entre populações, onde se incorporam e reproduzem.

Miscigenação • Formação de uma população a partir da mistura de duas ou mais populações parentais.

Mitocôndria • É um organelo celular que existe no citoplasma, e que desempenha um papel primordial na geração de energia. Possui um pequeno genoma circular próprio que é, normalmente, transmitido por via materna.

Mutação • Uma alteração na molécula de DNA, que pode ser muito simples (uma base substituída por outra) ou muito complexa (inserções ou deleções de milhares de bases, ou mesmo afectando um cromossoma inteiro).



Neolítico • Início da sedentarização da espécie humana, acompanhada pelo aparecimento de novos instrumentos de pedra e da cerâmica, bem como da domesticação de plantas e de animais.

Núcleo • Região isolada por uma membrana no citoplasma da célula que contém os cromossomas.

Nucleótidos • São os elementos que entram na formação das sequências de DNA e de RNA. Cada nucleótido é constituído por uma base (A, C, T – U, no caso do RNA - ou G), um açúcar e um grupo fosfato.



Organismos transgênicos • Organismos cujos genomas foram alterados através da inserção de um ou mais genes de diferente proveniência.



PCR • Reacção em cadeia da polimerase, que consiste na amplificação, em tubo de ensaio, de uma sequência de DNA através de utilização de um par de *primers*, uma polimerase de DNA termostável e um protocolo experimental adequado que envol-

ve ciclos de desnaturação, ligação e extensão.

Perfil genético • Conjunto de génotipos obtido para um número adequado de marcadores moleculares – em geral microssatélites – que permite caracterizar a identidade de um indivíduo.

Polimerase do DNA • Enzima capaz de sintetizar uma cadeia de DNA adicionando nucleótidos a outra, complementar, que lhe serve de molde. As polimerases de DNA utilizadas nas reacções de amplificação por PCR são termoestáveis, isto é, não desnaturam quando expostas a elevadas temperaturas.

Polimorfismo genético • Existência, num marcador molecular, de duas ou mais formas distintas em frequências superiores a 1% na população.

Ponto isoeléctrico • Propriedade físico-química característica de cada proteína, e que corresponde ao ponto em que o balanço de cargas positivas e negativas é zero.

Primers • Ou iniciadores, são pequenas sequências de DNA de cadeia simples (tipicamente entre 20-24 bases), sintetizados quimicamente no laboratório, que são complementares e flanqueiam a região do DNA que se pretende amplificar por PCR.



QTL • *Locus* polimórfico que determina uma característica complexa e na qual pode ser visível a influência de vários genes, bem como do meio ambiente.



RAPD • Marcadores moleculares do tipo polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente. Correspondem a polimorfismos anónimos detectados através da utilização simples de pequenos *primers* (8-10 bases de comprimento). O seu modo de

transmissão (dominância/recessividade) associado à sua baixa reprodutibilidade levou, praticamente, ao seu abandono.

Rastreabilidade • Possibilidade de seguir o circuito percorrido por uma determinada amostra de material biológico e assegurar a sua identificação através de métodos moleculares.

Recombinação • Troca de material genético entre um par de cromossomas, que ocorre na meiose.

Recursos genéticos • Conjunto de populações, raças e variedades locais de plantas e animais domesticados pelo Homem.

Região codificante • Região da molécula de DNA que significa alguma coisa, ou seja, que é transcrita em RNA-mensageiro e, muitas vezes, traduzida numa sequência de aminoácidos (proteína).

Região não codificante • Região da molécula de DNA que não é transcrita nem traduzida, frequentemente associada a material repetitivo.

Replicação • A cópia de uma molécula de DNA de cadeia dupla que resulta em duas cópias-filhas.

Revolução Industrial • Período histórico iniciado em Inglaterra, no século XIX, que ficou caracterizado pela industrialização das sociedades humanas e, consequentemente, pelo êxodo populacional do campo para a cidade.

RFLP • Marcadores moleculares do tipo polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição. Correspondem a polimorfismos determinados por alterações nas sequências reconhecidas pelas enzimas de restrição, ou então por diferenças de tamanho na sequência de DNA situada entre dois locais de corte.



Seleção assistida por marcadores • Utilização de marcadores moleculares como auxiliares dos processos de seleção artificial.

Seleção natural • Processo de modificação das características dos organismos causado pela reprodução diferencial dos vários genótipos que ocorrem numa população em virtude dos seus diferentes graus de aptidão biológica.

Sequenciação • Determinação da sequência de nucleótidos que compõe uma determinada região da molécula de DNA, e que hoje se faz através da utilização de sequenciadores automáticos. Também pode designar a determinação da sequência de aminoácidos que entra na constituição de uma proteína.

Subestruturação populacional • Descrição de uma população através de duas ou mais subunidades nas quais o cruzamento dos indivíduos ocorre de forma aleatória.



Teoria Mendeliana da Hereditariedade • Teoria desenvolvida por Gregor Mendel para explicar os padrões de transmissão das características de determinismo genético simples nos organismos.

Transferência genética horizontal • Transferência de material genético entre espécies diferentes, normalmente microorganismos, na mesma geração.



INTRODUÇÃO	5	CAPÍTULO 4	
CAPÍTULO 1		BREVES NOÇÕES DE GENÉTICA	
A BIOLOGIA DA DOMESTICAÇÃO	7	POPULACIONAL	37
A DOMESTICAÇÃO DAS PRIMEIRAS		POLIMORFISMO, FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	
PLANTAS	8	E FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS	38
A DOMESTICAÇÃO DOS PRIMEIROS		O EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG	40
ANIMAIS	9	OS FACTORES QUE DETERMINAM A	
A EXPANSÃO AGRÍCOLA NA EUROPA	10	MUDANÇA EVOLUTIVA	42
O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO		A MUTAÇÃO	42
DAS RAÇAS	11	A RECOMBINAÇÃO	43
CAPÍTULO 2		A DERIVA GENÉTICA	43
OS RECURSOS GENÉTICOS E O		A SELECÇÃO	44
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL	15	CARACTERÍSTICAS MONO E	
UMA BREVE INTRODUÇÃO		MULTIFACTORIAIS	46
HISTÓRICA	16	CAPÍTULO 5	
OS RECURSOS GENÉTICOS E O		A INTERPRETAÇÃO DOS PADRÕES DE	
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL	18	DIVERSIDADE GENÉTICA	47
CAPÍTULO 3		A VARIABILIDADE GENÉTICA	48
MÉTODOS MOLECULARES NA ANÁLISE		AS DISTÂNCIAS GENÉTICAS	50
DA DIVERSIDADE BIOLÓGICA	23	FILOGENIA E FILOGEOGRAFIA	52
OS GRUPOS SANGUÍNEOS E AS		SELECÇÃO E ADAPTAÇÃO	56
ALOENZIMAS	24	CAPÍTULO 6	
A DESCOBERTA DA REACÇÃO		IDENTIFICAÇÃO E PARENTESCO	61
EM CADEIA DA POLIMERASE	27	IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL E	
OS POLIMORFISMOS DE TAMANHO		RASTREABILIDADE	62
DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO	29	ANÁLISE DA FILIAÇÃO BIOLÓGICA	64
OS POLIMORFISMOS DE TAMANHO		IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO OU	
DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	31	RAÇA DE ORIGEM	66
OS MICROSSATÉLITES	33	CAPÍTULO 7	
A SEQUENCIAÇÃO E OS		AS TRANSFORMAÇÕES	
POLIMORFISMOS NUCLEOTÍDICOS		BIOTECNOLÓGICAS	69
SIMPLES	35		

A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	70
A SELECÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES	71
OS ANIMAIS E PLANTAS TRANSGÊNICOS	73
A CLONAGEM	76

CAPÍTULO 8

**A CONSERVAÇÃO DOS RECURSOS
GENÉTICOS**

.....	77
OS RECURSOS ANIMAIS	80
OS RECURSOS VEGETAIS	81
Referências	83
Glossário	89