UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Aplicação de Microssatélites na Crioconservação da Diversidade Genética do Cavalo Lusitano

Sofia Margarida dos Reis Daniel de Abreu Ferreira

Orientação: Maria Susana Barbosa R. P. Lopes, *Ph.D.*

Mestrado em Biologia da Conservação

Dissertação

Évora, 2016

UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Aplicação de Microssatélites na Crioconservação da Diversidade Genética do Cavalo Lusitano

Sofia Margarida dos Reis Daniel de Abreu Ferreira

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia da Conservação conferido pela Universidade de Évora, no dia 18 de Junho de 2016, perante o Júri:
Presidente: Professor Doutor Paulo Sá Sousa, Departamento de Biologia, Universidade de Évora.
Arguente: Doutora Cristina Luís, Museu Nacional de História Natural e da Ciência, Museus da Universidade de Lisboa.
Orientadora: Doutora Susana Lopes, Centro de Biotecnologia do Açores, Universidade dos Açores.

Nota Prévia

Neste estudo, foram utilizados os dados obtidos até maio de 2013, pelo Laboratório de Genética Molecular de Alter, cedidos pela ex-Fundação Alter Real à Universidade dos Açores, no âmbito do protocolo celebrado entre as duas instituições.

"The problem with the gene pool is that there is no lifeguard."

Steven Wright

Índice

Índice de Figuras viii

Índice de Tabelas ix

Abreviaturas x

Agradecimentos xi

Resumo xiii

Summary xiv

1 Introdução 1

1.1 O Cavalo 1

1.1.1 Origem do Cavalo na Península Ibérica 2

1.1.2 Domesticação do Cavalo 3

1.1.3 Conceito de Raça 4

1.2 A raça Lusitana 5

1.3 Testes de Paternidade 6

1.4 Gestão e Conservação da Biodiversidade dos Recursos Genéticos Animais 6

1.4.1 Diversidade Genética 6

1.4.2 Conservação da Diversidade dos Recursos Genéticos Animais 8

1.4.3 Definir Prioridades em Conservação 9

1.4.4 Estratégias de conservação: métodos *in situ* e *ex situ* 10

1.4.4.1 Conservação *in situ* 10

1.4.4.2 Conservação *ex situ* (*in vivo* e *in vitro*) 10

1.5 Banco de Genes 12

1.6 Análise da Diversidade Genética com Base em Marcadores Moleculares: Microssatélites 13

1.6.1 Marcadores Moleculares 13
1.6.2 Microssatélites 13
1.6.2.1 Mutações 14
1.6.2.2 Alelos Nulos 15
1.6.2.3 Homoplasia 16
1.6.2.4 Modelos Mutacionais 16
1.7 Seleção de Reprodutores para Banco de Genes 17
1.7.1 Material biológico a Crioconservar 17
1.7.2 Criobanco Nacional Francês: Um caso-estudo 18
1.8 Objetivos 19
2 Material e Métodos 20
2.1 Análise da diversidade genética de machos da raça Lusitana 20
2.1.1 Amostras 20
2.1.2 Extração de DNA 20
2.1.3 Amplificação e Genotipagem para 6 e 9 microssatélites 21
2.1.4 Amplificação e Genotipagem para 17 microssatélites 22
2.1.5 Análise Estatística 23
2.2 Seleção de animais a criopreservar 23
2.2.1 Definição de Critérios a aplicar à raça Lusitana 23
2.2.1.1 Genótipos extremos (portadores de alelos muito raros) 23
2.2.1.2 Genótipos representativos (portadores de alelos muito frequentes) 23
2.2.2 Amostras 24
2.2.3 Análise de dados 24
3 Resultados 25
3.1 Análise da diversidade genética de machos reprodutores da raça Lusitana 25
3.2 Seleção de animais a criopreservar 31
4 Discussão e Conclusão 35

5 Referências Bibliográficas 39

6 Considerações Finais 47

7 Anexos 48

Anexo I - Frequências Alélicas 48

Anexo II - Lista de genótipos de 644 amostras de machos reprodutores alvo de seleção para crioconservação 56

Anexo III -Algoritmo de quantificação de amostras por tipo de alelos 70

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema resumo da Conservação dos Recursos Genéticos Animais (Adaptada de Simianer H. 2006). 11

Figura 2 - Exemplo de um microssatélite com repetição de um par de bases de AC (n)..... 14

Figura 3 - Análise de imagem com o software RFLPscan v.3.1 na identificação de fragmentos para o *locus VHL20*..... 21

Figura 4 - Análise de imagem com o software Genemapper 4.0 de um perfil de DNA para 17 *loci*. 22

Figura 5 - Frequência alélica do *locus HMS3*. 48

Figura 6 - Frequência alélica do *locus HMS7*. 48

Figura 7 - Frequência alélica do *locus HTG4*. 49

Figura 8 - Frequência alélica do *locus HTG10*. 49

Figura 9 - Frequência alélica do *locus VHL20*. 50

Figura 10 - Frequência alélica do *locus ASB2*. 50

Figura 11 - Frequência alélica do *locus AHT4*. 51

Figura 12 - Frequência alélica do *locus AHT5.* 51

Figura 13 - Frequência alélica do *locus HMS6*. 52

Figura 14 - Frequência alélica do *locus HTG6*. 52

Figura 15 - Frequência alélica do *locus HTG7*. 53

Figura 16 - Frequência alélica do *locus HMS2*. 53

Figura 17 -Frequência alélica do *locus ASB17*. 54

Figura 18 - Frequência alélica do *locus HMS1*. 54

Figura 19 - Frequência alélica do *locus UCDEQ425* (*CA425*). 55

Figura 20 - Frequência alélica do *locus ASB23*. 55

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Espécies existentes do género *Equus* (Adaptada de Bailey & Binns 1998). 1

Tabela 2 - Painel de microssatélites analisados com respectiva localização cromossómica, referência e sequência dos *primers* (*forward* e *reverse*). 26

Tabela 3 - Variabilidade genética da população analisada para 16 *loci*. N º de alelos *per locus* (*n*); número de indivíduos analisados (N); Heterozigotia observada (H_O); Heterozigotia esperada (H_E); Conteúdo de informação polimórfica (PIC). 27

Tabela 4 - Valores obtidos para 16 *loci* para o teste do Equilíbrio Hardy-Weinberg (Genepop 3.4) com P <0.05 . Probabilidade (P); *Deficit* de Heterozigotia (F_{IS}). 28

Tabela 5 - Alelos muito raros e raros *per locus* presentes na população em análise. 29

Tabela 6 - Alelos muito frequentes *per locus* presentes na população em análise. 30

Tabela 7 - Grupo de 32 amostras de animais portadores de genótipos com alelos muito raros (AMR) numa população de 644 machos reprodutores (*-Alelo presente em homozigotia)..... 32

Tabela 8 - Grupo de 30 amostras de animais portadores de genótipos com alelos muito frequentes (AMF) numa população de 644 machos reprodutores. 33

Tabela 9 - Frequência alélica do *locus HMS3.* 48

Tabela 10 - Frequência alélica do *locus HMS7*. 48

Tabela 11 - Frequência alélica do *locus HTG4*. 49

Tabela 12 - Frequência alélica do *locus HTG10*. 49

Tabela 13 - Frequência alélica do *locus VHL20*. 50

Tabela 14 - Frequência alélica do *locus ASB2*. 50

Tabela 15 - Frequência alélica do *locus AHT4.* 51

Tabela 16 - Frequência alélica do *locus AHT5*. 51

Tabela 17 - Frequência alélica do *locus HMS6*. 52

Tabela 18 - Frequência alélica do *locus HTG6*. 52

Tabela 19 - Frequência alélica do *locus HTG7*. 53

Tabela 20 - Frequência alélica do *locus HMS2*. 53

Tabela 21 -Frequência alélica do *locus ASB17*..... 54

Tabela 22 - Frequência alélica do *locus HMS1*. 54

Tabela 23 - Frequência alélica do *locus UCDEQ425*. 55

Tabela 24 - Frequência alélica do *locus ASB23*..... 55

Tabela 25 - Lista de genótipos das amostras dos 644 machos reprodutores alvo de seleção para crioconservação. 56

Abreviaturas

ABI - Applied BioSystems

AF - Alelos Frequentes

AMF - Alelos Muito Frequentes

AMR - Alelos Muito Raros

AR - Alelos Raros

bp- Base pair (par de bases)

BPGA - Banco Português de Germoplasma Animal

DGAV - Direção Geral de Alimentação e Veterinária

EBV - Estimated Breeding Value

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations

FAR - Fundação Alter Real

GSM - Generalized Stepwise Model

HWE - Hardy-Weinberg Equilibrium

IA - Inseminação Artificial

IAM - Infinite Allele Model

INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

KAM - K-Allele Model

LGM - Laboratório de Genética Molecular de Alter

MNA - Número Médio de Alelos

PCR - Polimerase Chain Reaction

RGAn - Recursos Genéticos Animais

SMM - Stepwise Mutation Model

STR - Short Tandem Repeats

TPM - Two Phase Model

Agradecimentos

À Doutora Susana Lopes, Investigadora no Centro de Biotecnologia dos Açores, da Universidade dos Açores, por me ter dado a honra de ter aceite ser minha orientadora neste estudo.

Ao Dr. João da Costa Ferreira, ex-diretor do Serviço Nacional Coudélico, por tão bem me ter acolhido na Coudelaria de Alter, que é a minha casa há 18 anos. Bem-haja, por todo o convívio, amizade e partilha de conhecimento, sobre tantos assuntos e matérias ao longo de 10 anos, que me permitiram aguçar o gosto pelos cavalos.

À Ilustre Professora Doutora Maria do Mar Oom, ex-Coordenadora Científica do Laboratório de Genética Molecular de Alter, por ter possibilitado a minha vinda para o laboratório e por tudo o que me ensinou ao longo dos seus brilhantes anos de coordenação. Nunca me esquecerei dos nossos jantares com a famosa frase "à mesa não se envelhece". Deve ter sido por isso que estamos todos tão bem conservados!

À Doutora Cristina Luís, por tudo o que ensinou aquando da minha vinda para o laboratório e pela sua franca e alegre amizade. Obrigada pelos artigos cedidos. Mesmo depois de tantos anos, pude contar contigo!

A todos os ex-presidentes da Fundação Alter Real, em especial ao Eng. Vítor Barros que sempre acreditou e acarinhou o Laboratório de Genética Molecular de Alter e nos permitiu a compra do Sequenciador Capilar e, também, ao Eng. António Pimentel Saraiva por todo o apoio e competência na fase de transição FAR/DGAV/INIAV.

Ao Sr. Presidente do INIAV, Professor Doutor Nuno Canada, por ter acreditado no Laboratório de Genética Molecular de Alter e tê-lo achado meritório para integrar a ilustre instituição que Preside.

Ao Doutor António Vicente por me ter dado *feed-back* do seu brilhante trabalho com a "base de dados de Alter" e me ter convidado para assistir à sua tese de Doutoramento sobre o Cavalo Lusitano. Foi inspirador.

Aos meus colegas, estagiários e bolseiros que trabalharam no Laboratório de Genética Molecular de Alter e contribuíram para a rotina e para a implementação de novas técnicas de diagnóstico, em especial ao Ricardo Alves e à Ana Henriques. A amizade, o companheirismo e a lealdade caiem sempre bem, em qualquer equipa.

À Maria Casquilho-Ribeiro Ramalho e à Maria dos Anjos Gonçalves, pelo apoio, incentivo e amizade. Juntas há mais de 18 anos no e pelo Laboratório de Genética Molecular de Alter.

Aos meus Pais, por todo o apoio. À minha Mãe, por me ter ensinado a vantagem em sermos metódicos e ao meu Pai, por sempre me dizer que uma licenciatura é pouco! Pode ser, Pai, que ainda venha o Doutoramento…

Ao Carlos Ferreira, meu marido e colega no Laboratório de Genética Molecular de Alter. Este trabalho, também, é teu.

Ao meu Filho, por toda a surpreendente compreensão que demonstrou, apesar dos seus tenros quatro anos de idade, pela mãe nem sempre poder brincar com ele por estar a fazer um trabalho para a "escola dos crescidos". Muito obrigada Dinis! Espero que te fique o exemplo de que quando queremos muito uma coisa, temos que nos focar e trabalhar para a conseguirmos.

Aplicação de Microssatélites na Crioconservação da Diversidade Genética do Cavalo Lusitano

Resumo

O género *Equus* teve origem na América do Norte e alguns exemplares migraram para a Eurásia pelo Estreito de *Bering*, durante a última glaciação. No fim da glaciação, todos os cavalos do continente americano extinguiram-se, mas sobreviveram nas estepes da Eurásia, na Península Ibérica e nas florestas da Europa Ocidental e Central.

O cavalo Lusitano teve a sua origem em cavalos selvagens e domesticados da Península Ibérica, ocorrendo uma mistura com outros animais trazidos por eventos migratórios ocorridos no passado. Os cavalos deste *gene pool* contribuíram para o desenvolvimento de outras raças modernas na Europa e foram mais tarde introduzidos e dispersos pelo continente Americano, tornando-se fundadores de numerosas raças do novo mundo.

A raça Lusitana é uma raça equina autóctone portuguesa, com especial relevância económica no panorama nacional e internacional. Apesar de não ser uma raça ameaçada, alguns autores defendem que a informação genealógica disponível (*pedigrees*) indica que uma utilização excessiva de um reduzido número de reprodutores machos está a diminuir a diversidade genética da raça, tendo como consequência o aumento da consanguinidade e a diminuição do tamanho efetivo da população para cerca de metade dos valores recomendados pela FAO.

No entanto, a análise da diversidade genética com base em 16 microssatélites (Marcadores de DNA) a um grupo de 2699 machos da raça Lusitana, nascidos entre 1985 e 2010 e inscritos como reprodutores no Livro Genealógico da raça, revelou um elevado nível de diversidade, idêntico ao encontrado na maioria das raças equinas.

Dada à crescente relevância da Crioconservação, como estratégia complementar para a conservação da diversidade genética *in situ,* e tendo em conta que não existe criopreservação de oócitos, embriões ou sémen, do cavalo de raça Lusitana em Banco de Genes, selecionaram-se 62 machos reprodutores (garanhões) com interesse genético para a criopreservação de sémen, quer no sentido de preservar a diversidade da raça quer no da salvaguardar em caso de calamidade.

Palavras-Chave:

Cavalo Lusitano, microssatélites, diversidade, crioconservação, banco de genes

Cryoconservation of the Lusitano Horse Genetic Diversity Based on Microsatellite

Summary

The genus *Equus* originated in North America and some exemplary migrated to Eurasia through the Bering Strait during the last glaciation. By the end of the last glaciation, all horses on the American continent became extinct but the genus survived in the steppes of Eurasia, in the Iberian Peninsula and on the Central and West Europe forests.

The Lusitano horse breed has its origins in wild and domesticated horses of the Iberian Peninsula, where a mixture with other animals brought by migratory events in the past occurred. The horses of this gene pool contributed to the development of other modern breeds in Europe and were later introduced and spread throughout the American continent, becoming founders of numerous breeds of the New World.

The Lusitano horse breed, is a Portuguese native equine breed, with special economic relevance in the national and international scene. Although not being an endangered breed, some authors argue that the available genealogical information (pedigrees) indicates that an excessive use of a limited number of stallions is decreasing the genetic diversity of the breed, resulting in the increase of inbreeding and on the decrease of the effective population size to about half of the values recommended by FAO.

However, the analysis of genetic diversity based on 16 microsatellites (DNA markers) in a group of 2699 males of the Lusitano horse breed, born between 1985 and 2010 and registered as Stallions in the Studbook, revealed a high level of diversity similar to that found in the majority of equine breeds.

Given the growing relevance of Cryopreservation as a complementary strategy for the conservation of genetic diversity *in situ* and, taking into consideration the inexistence of criopreservation for oocytes, embryos and semen, in a Gene Bank, for the Lusitano horse breed, 62 breeding males (stallions) with genetic interest for semen cryopreservation were selected in order either to preserve the diversity of the breed or as safeguard in case of calamity.

Keywords:

Lusitano Horse, microsatellite, diversity, cryopreservation, gene bank

1 Introdução

1.1 O Cavalo

A espécie *Equus caballus*, vulgarmente designada por cavalo, pertence à ordem *Perissodactyla* cujos animais se caracterizam por terem um número impar de dedos (um ou três) (Hickman *et al*. 2001). Os perissodáctilos são mamíferos placentários, ungulados, de médio e grande porte, que apresentam um esqueleto pós-cranial adaptado para a marcha (Oom 1992). Segundo Gonzaga (2004), é no Eocénio que surge o primeiro representante da família *Perissodactyla*, o *Hyracotherium*. A esta ordem pertencem, também, as famílias *Tapiridae, Rhinoceratidae* e a *Equidae.* O género *Equus* pertence à família *Equidae* e é composto por nove espécies incluindo os cavalos, os burros e as zebras. Segundo Bailey & Binns (1998) a evolução do género *Equus*, é um exemplo de evolução associado a uma rápida mudança de cariótipo, onde as espécies são diferenciadas pelo número de cromossomas, variando entre 32 da zebra *Hartmann* (*Equus zebra hartmannae)* até 66 do cavalo de *Przewalski (Equus przewalskii)* (Tabela 1). As únicas espécies sujeitas ao processo de domesticação foram o burro (*Equus asinus*) e o cavalo (*Equus caballus*) (Clutton-Brock 1987 *in* Oom 1992).

Tabela 1 - Espécies existentes do género *Equus* (Adaptada de Bailey & Binns 1998).

Género/ espécie	Nome Comum	Nº de Cromossomas
Equus przewalskii	Cavalo de P*rzewalskii*	66
Equus caballus	Cavalo doméstico	64
Equus asinus	Burro/Asno	62
Equus hemionus onager	Onagro da Pérsia	56
Equus hemionus kulan	*Kulan*	54/55
Equus kiang	Asno selvagem Asiático	51/52
Equus grevyi	Zebra de *Grevy*	46
Equus burchelli	Zebra comum	44
Equus zebra hartmannae	Zebra de *Hartmann*	32

Os cavalos são animais sociais não territoriais. A unidade social e de reprodução é a manada, que consiste numa associação estável de éguas, a sua descendência e um ou mais garanhões não parentes que defendem o grupo de fêmeas, e as suas oportunidades reprodutivas, de outros garanhões (Linklater 2000 *in* Heitor 2007).

1.1.1 Origem do Cavalo na Península Ibérica

Segundo Mills & Nankervis (1999), o género *Equus* teve origem na América do Norte e alguns exemplares migraram para a Eurásia pelo Estreito de *Bering*, durante a glaciação, no fim do Pliocénico. No final da última glaciação, há 10.000 anos, todos os equinos na América extinguiram-se, possivelmente, por causas climáticas e pela caça intensiva realizada pelos humanos. No entanto, a evolução dos equinos continuou no Velho Mundo, onde o desenvolvimento de extensas florestas criou áreas isoladas de pastagens, isolando as populações em termos reprodutivos (Oom 1992; Mills & Nankervis 1999).

Após a era glacial, os cavalos sobreviveram nas estepes da Eurásia, na Península Ibérica e, talvez, em menor número nas florestas da Europa Ocidental e Central (Oom 1992; Uerpmann 1995; Lopes 2011). Os cavalos viveram, assim, na Ibéria desde os tempos pré-históricos mais distantes e não deixaram de existir, mesmo durante o Mesolítico quando, aparentemente, se extinguiram a norte dos Pirenéus (Eisely 1943; Gonzaga 2004; Lira *et al*. 2010). Os cavalos Ibéricos foram posteriormente selecionados para atividades de guerra, por muitas tribos indígenas que viviam na Península (Oom 1992).

A tática de cavalaria típica da Ibéria universalmente conhecida como Gineta, tipo de combate que dependia das características dos cavalos, teve o controlo quase total do processo de seleção, sendo responsável pelo cavalo Ibérico, tal como o conhecemos atualmente (Andrade 1954 *in* Oom 1992).

Segundo Oom (1992), os cavalos da Península Ibérica foram classificados em dois grupos étnicos diferentes: Os póneis “Celtas” e os cavalos “Ibéricos”. O primeiro grupo é constituído por cavalos do tipo pónei, com pequena estatura, com perfil recto ou côncavo, de regiões frias, húmidas e montanhosas, distribuídas ao longo da região da Cantábria, nas regiões do Norte Atlântico da Península Ibérica e que evoluíram na sequência dos avanços e recuos dos Glaciares, durante o Paleolítico. Os representantes vivos deste grupo estão subdivididos em raças, ou populações, como o Garrano, em Portugal e o *Asturcón* e *Pottoka*, em Espanha. O segundo grupo é constituído por cavalos maiores, de perfil convexo, de planícies secas e quentes do Sul da Península Ibérica, que escaparam aos efeitos da última glaciação. O cavalo típico do sul da Península, ao contrário do primeiro, sofreu uma forte intervenção humana, no sentido de uma constante adaptação às necessidades das sucessivas guerras que assolaram a região, cruzando-se muito frequentemente com cavalos das tropas invasoras. Este grupo inclui duas linhas de pura raça Espanhola (Andaluzes e *Cartujanos)* e os *Marismeños*, em Espanha e os Lusitanos e os Sorraia, em Portugal. Os cavalos deste *gene pool* contribuíram para o desenvolvimento de outras raças modernas na Europa e foram mais tarde introduzidos e dispersos pelo continente Americano, tornando-se fundadores de numerosas raças do novo mundo (Luís *et al.* 2006).

1.1.2 Domesticação do Cavalo

É do consenso geral, que a domesticação constitui um processo cultural e biológico pois inicia-se pela integração dos animais na estrutura social das comunidades humanas e termina no isolamento total das novas populações relativamente às formas selvagens. Para a maioria dos animais domésticos, tais como o carneiro, a cabra, o porco, o cão e, em particular, o gado bovino, ocorreram reduções bem visíveis no tamanho do esqueleto e na região craniana imediatamente após a domesticação (Clutton-Brock 1992). O mesmo não se verificou com o cavalo, dificultando a distinção, através de vestígios fósseis, entre as formas selvagens e as domésticas que lhe sucederam. Estes apresentam-se, geralmente, mal conservados dada a acentuada porosidade de grande parte dos ossos destes animais, aliada à fragmentação apresentada pelos respetivos esqueletos, na sua maioria constituindo "restos" de uma fonte de alimentação humana (Anónimo 1989b; Anónimo 1989c; Attenborough 1988; Clutton-Brock 1987; Hemmer 1990 *in* Oom 1992). Assim, a origem e evolução do cavalo doméstico, *E. caballus,* são questões que, ainda, suscitam dúvidas. Os indícios existentes elegem o Tarpan, *Equus ferus*, como o mais provável ancestral selvagem e apontam para que o processo de domesticação se tenha iniciado há 6000 anos, a partir de animais que se dispersavam pelas agrestes regiões de estepes da Eurásia, com a Península Ibérica a constituir um segundo centro de domesticação (Oom 1992; Sponenberg 2000; Vilà *et al*. 2001; Lopes *et al*. 2005, Lira *et al*. 2010).

Segundo Jansen *et al.* (2002), existem duas hipóteses para a domesticação do cavalo, a hipótese de origem restrita e a de origem múltipla. A restrita, propõe que a domesticação do cavalo resulte de cruzamentos seletivos de um número de fundadores capturados de uma única população selvagem e subsequentemente distribuídos por outras regiões A múltipla, assenta no pressuposto que foram capturados vários cavalos de diferentes populações selvagens existentes na Eurásia e que teriam sido independentemente domesticados, durante um longo período de tempo, sendo que estudos baseados em DNA mitocondrial apontam para que a hipótese de origem múltipla seja a mais provável. O Cavalo foi a última espécie a ser domesticada e a menos afetada pela seleção artificial (Clutton-Brock 1999). Os humanos apenas exploraram e desenvolveram o potencial natural do cavalo como meio de transporte que é baseado na velocidade e força, características que foram moldadas, naturalmente, pela evolução (Levine 2002).

As populações de *E. caballus* que vivem, atualmente, em liberdade tiveram origem em cavalos domésticos que foram libertados na natureza ou indivíduos que escaparam da condição doméstica (Mills & Nankervis 1999). Estes indivíduos são designados pelo termo *feral*, termo que designa uma população auto-sustentável (Clutton-Brock 1999).

1.1.3 Conceito de Raça

O termo raça tem sido usado nas mais diversas situações, na maioria das vezes carecendo de qualquer valor biológico para além de exprimir variabilidade entre populações, cujas diferenças não atingirão, em média, o nível proposto para uma diferenciação subespecífica (Mayr & Ashlock 1991). A base para a formação de uma raça é a mesma para todos os indivíduos de reprodução sexuada, ou seja, reside no facto de não haver dois indivíduos, nem duas populações locais, que sejam idênticos. Uma raça forma-se a partir de um grupo reduzido de indivíduos (efeito fundador) ao qual se impõe um isolamento reprodutor (Clutton-Brock 1992 *in* Oom 1992)**.** Constitui um conceito genético que abrange populações de indivíduos semelhantes por uma ascendência comum. Estes indivíduos partilham uma ou mais características, tanto a nível morfológico como cariológico, e/ou nas frequências relativas de genes de diferentes *loci*. Estas características étnicas individualizam-na de outras raças da mesma espécie, mas não inviabilizam o seu cruzamento (Sinnot *et al.* 1977 *in* Oom 1992).

Uma raça apresenta todas as características gerais da espécie a que pertence, mas individualiza-se das restantes por determinadas particularidades próprias e hereditárias, fixadas ou variáveis (dentro de determinados limites) e que deverão constar na sua caracterização (padrão da raça) (Oom 1992). Os indivíduos de determinada raça são identificáveis pelo fenótipo que os caracteriza ou pela genealogia (pedigree) (Hill 1971 *in* Oom 1992). Constituem, no fundo, uma população fechada (ou semi-fechada), com um fundo genético próprio (Lima-Pereira 1978 *in* Oom 1992).

No entanto, falar de *raça pura* carece de significado biológico uma vez que a variabilidade é inerente a toda a população natural, ou seja, todas as populações revelam ser polimórficas para muitos *loci* (French *et al*. 1967; Lasker & Tyzzer 1982; Mayer 1974 *in* Oom 1992). Teoricamente, uma raça teria de ser uma população mendeliana infinitamente numerosa, onde não ocorresse qualquer forma de seleção, fechada sobre si e em que os acasalamentos se processassem ao acaso (Ollivier 1982 *in* Oom 1992). Como é sabido, os princípios desta definição não são propriamente respeitados em Melhoramento Animal, dando lugar a um conceito zootécnico de raça.

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), as raças têm sido criadas para satisfazer a alimentação humana e as necessidades agrícolas de acordo com diferenças geográficas e culturais. Assim, no conceito zootécnico, define-se raça como uma população de gado doméstico com um fenótipo definido que permite a sua distinção de outras da mesma espécie, ou qualquer grupo de animais, em que a separação geográfica e/ou cultural leve à aceitação da sua identidade separadamente (Scherf 2000). Atualmente, existem cerca de 500 raças de cavalos (Petersen *et al*. 2013). Estas raças são grupos de cavalos com características distintas, transmitidas de forma consistente à descendência tais como a conformação, a cor e/ou desempenho físico (Van de Goor *et al*. 2011).

1.2 A raça Lusitana

Em 1891, foi implementado um sistema de registos de todos os equinos de Portugal, mas a maioria foi destruída em 1910 aquando da implementação da República (Lopes 2011). Assim, os primeiros registos para o cavalo Lusitano surgem em 1967 (Costa Ferreira & Oom 1989) com a implementação de um *Stubook* oficial. Neste estava inscrita uma população fundadora constituída por 189 garanhões e 672 éguas, de diferentes origens (Lopes 2011). Estas 672 éguas eram descendentes de 192 linhas matriarcais, das quais existem apenas 145 (Lopes *et al.* 2005). Até à constituição do livro Genealógico, o Lusitano e a Pura Raça Espanhola eram designados como Andaluzes, Ibéricos ou cavalos Peninsulares (APSL 2010).

A intenção deste *Studbook* era recuperar a raça originária do sul da Península na sua muito particular vocação de cavalo de sela pois, Portugal, ao manter de forma continuada e ininterrupta a prática de combate com os touros, conservou um núcleo da sua criação cavalar especialmente vocacionada para este fim. Estes animais são tidos pelos mais próximos do antigo cavalo Ibérico, posto que a sua utilização no combate com os touros, prática exaltada da vocação do antigo "Ginete Hispânico", é por si só avessa e expurgante de cruzamentos com outras raças (Costa Ferreira & Oom 1989). No entanto, o *Studbook*, atendendo a que os cavalos lusitanos e espanhóis têm a mesma origem e características, aceitou os cavalos espanhóis que estivessem inscritos no *Registro Matrícula de Caballos y Yeguas de Pura Raza Española,* apesar destas duas populações ibéricas terem sido selecionadas com diferentes objetivos ao longo do tempo, *i.e*., a Pura Raça Espanhola, selecionada, maioritariamente, pela beleza, conformação e andamentos, e a Lusitana, por aspetos funcionais (Bowling e Ruvinsky 2000), como já referido anteriormente.

O *Studbook* esteve aberto até 1989, sendo permitido o registo da descendência de animais não registados, desde que correspondessem ao padrão da raça e tendo em conta a sua genealogia. Depois de 1989, foi fechado, passando a permitir apenas o registo de descendentes de reprodutores já registados.

Atualmente, a raça Lusitana é, para além do Garrano, do Sorraia e, mais recentemente, do Pónei da Terceira (Lopes *et al*. 2015), economicamente, a raça equina autóctone portuguesa mais importante.

Vicente *et al*. (2009) refere que existem cerca de 5000 éguas reprodutoras registadas no Livro Genealógico, em que metade se encontra em Portugal e que a popularidade da raça tem aumentado, mas no seu todo os censos continuam a ser modestos. Também, segundo Vicente (2015), a análise de informação genealógica (*pedigrees*) mostra um aumento da consanguinidade na raça Lusitana nos últimos 20 anos, sendo que todos os poldros nascidos em 2008, mostram um coeficiente de consanguinidade de 11.6 % devido, em parte, ao livro genealógico ter fechado. Ainda, segundo Vicente (2015) o tamanho efetivo da população estimado a partir da taxa de consanguinidade *per* ano e pelo intervalo de gerações (11 anos para machos e 10 anos para fêmeas) é de 28 *i.e*., metade do valor recomendado pela FAO. Este valor de consanguinidade contrasta com os 9,03 % estimados por Costa Ferreira & Oom, num estudo realizado em 1989.

1.3 Testes de Paternidade

Desde 1992, que o regulamento da raça obriga à realização de testes de paternidade para confirmação das genealogias declaradas dos animais a inscrever no *Studbook* da raça. Assim, entre 1992 e 1997, os testes de paternidade foram realizados por técnicas baseadas em grupos sanguíneos e polimorfismos proteicos.

Com a tecnologia do DNA a evoluir de uma forma prodigiosa, a maioria dos laboratórios começou a implementar técnicas de biologia molecular, adicionando marcadores de DNA, como os microssatélites, aos testes de rotina, incrementado a probabilidade de exclusão (PE) de falsos progenitores.

É neste contexto que surge, em 1997, o Laboratório de Genética Molecular de Alter, do Ministério da Agricultura, com o objetivo de realizar testes de paternidade a partir da aplicação de microssatélites. Quais os microssatélites e quantos se devem utilizar em testes de paternidade, depende das características de cada *locus* e da raça a estudar (Double *et al*. 1997).

Os testes de paternidade realizam-se através da comparação do genótipo do descendente, com os genótipos dos seus presumíveis progenitores. Assim, para um determinado *locus*, os dois alelos presentes no descendente têm de advir um do pai e o outro da mãe, uma vez que os microssatélites são codominantes e seguem as leis da hereditariedade. Se um dos alelos, ou ambos, não estiverem presentes nos seus presumíveis progenitores, estamos perante um caso de exclusão de paternidade, vulgo incompatível.

Este rigor científico contribui como crivo à entrada de animais no Livro Genealógico que não são da raça e proporciona o apuramento da fidedignidade das genealogias dos que entram.

1.4 Gestão e Conservação da Biodiversidade dos Recursos Genéticos Animais

1.4.1 Diversidade Genética

A diversidade dos seres vivos não parece assentar apenas no número de genes presentes em cada espécie, ou no aparecimento de novos genes com o emergir de novas espécies. Em particular, o aumento da complexidade de uns seres vivos em relação a outros terá muito a ver com a seleção de formas mais sofisticadas de regulação da expressão génica e com a duplicação de genes já existentes. Os fatores que mais contribuem para a diversidade de uma espécie são as mutações, a recombinação genética e a imigração (Regateiro 2003).

Ao longo do genoma, há regiões com maior ou menor variabilidade, havendo genes, em que se observa uma maior variabilidade entre indivíduos. Os principais contributos para a diversidade genética são o *crossing-over*, a segregação independente, o polialelismo e os

polimorfismos de DNA (Regateiro 2003). Após ocorrer a replicação (na meiose), os cromossomas homólogos de cada par juntam-se e ocorre o *crossing-over*, com troca de material entre si. Contudo, os locais em que ocorre o *crossing-over* não são constantes, pelo que um mesmo par de cromossomas pode originar cromossomas com informação diferente da célula que lhe deu origem, em células diferentes. Durante a formação do fuso acromático, na metáfase da meiose, os dois cromossomas de cada par de cromossomas homólogos ligam-se a fibras do fuso: um a fibras de um dos pólos da célula e o outro, a fibras do outro pólo da célula, sem qualquer seletividade. Trata-se de uma distribuição ao acaso que está na base da segregação independente que fundamenta a 2ª lei de Mendel e permite que haja recombinação do complemento cromossómico das células filhas, por mistura de cromossomas de origem paterna e materna. À diversidade resultante do *crossing-over* e da segregação independente, junta-se a do polialelismo. Para cada *locus*, há dois alelos, *i.e*., duas formas alternativas de um gene. No entanto, numa população, podem existir múltiplos alelos em "competição" para um mesmo *locus*. As leis de Mendel permitem múltiplas combinações de pares de alelos (genótipos) para um determinado *locus*, em indivíduos diferentes, de acordo com a fórmula x= [n(n+1)]/2, em que x é o número de genótipos e n representa o número de alelos alternativos para o *locus* em causa. Os dois alelos presentes nuns locus podem encontrar-se em homozigotia ou em heterozigotia (Regateiro 2003).

Quando as formas alternativas de um gene ou de uma sequência intergénica, têm uma frequência igual ou superior a 1% numa população são designadas de polimorfismos de DNA. Os polimorfismos são considerados variações normais numa população, pelo que nenhuma das formas afeta significativamente o seu portador. No que respeita aos genes, um terço apresenta sequências polimórficas. Os polimorfismos de DNA são herdados de uma forma mendeliana e fonte de uma grande diversidade interindividual. As mutações que ocorrem em DNA intergénico (não codificante), por não estarem habitualmente associadas a pressão de selecção, estão na base de um maior polimorfismo observado nestas regiões do genoma (Regateiro 2003).

Assim, a variabilidade genética mede as variações de nucleótidos nos alelos de um mesmo gene, numa dada população (Primack 2006). A capacidade de uma população para se adaptar a alterações no meio depende da variabilidade genética (Frankham *et al.* 2002). Indivíduos com determinados alelos, ou combinações de alelos, podem ter precisamente as características necessárias para sobreviverem e se reproduzirem sob novas condições (Wayne & Morin 2004 *in* Primack 2006), pois essas variações podem ser determinantes na codificação de proteínas específicas, que podem conduzir a diferenças bioquímicas, morfológicas ou, mesmo, etológicas, e influenciar os indivíduos em termos reprodutivos e de sobrevivência. Geralmente, quanto maior é a população, maior a sua variabilidade genética, quanto menor a população, menor é a sua variabilidade genética. A perda de variabilidade genética é considerada como o principal fator de ameaça à sobrevivência das pequenas populações (Hedrick & Miller 1992; Frankham1995; Rochambeau *et al*. 2000). No entanto, e principalmente em populações que sofreram seleção artificial, pode existir um número elevado de indivíduos, mas baixa variabilidade. Em conservação genética, o principal objetivo é a preservação da variabilidade dentro das populações assente na hipótese da correlação

entre a variação genética e a viabilidade da população (Hall & Bradley 1995; Cañon *et al.* 2000).

A diversidade genética dos recursos animais domésticos é necessária para manter a produção em diferentes ambientes, para permitir um melhoramento genético sustentável e facilitar a rápida adaptação às mudanças de paradigmas da seleção das raças, que levam por vezes à perda de alelos únicos ou de combinações alélicas (Toro *et al*. 1999). Permite, ainda, à raça, ou população, responder à seleção, por aumento da produtividade e a adaptar-se a mudanças ambientais, incluindo não só a condições associadas ao clima mas, também, as relacionadas com os mercados, com a gestão agrícola e com os desafios das doenças (Boettcher *et al*. 2010). A forma mais correta de medir a diversidade é através da heterozigosidade e da diversidade génica (Nei & Li 1979). A heterozigotia observada (Ho) consiste no número de indivíduos heterozigóticos para determinado *locus*, enquanto a esperada (He) consiste no número de indivíduos heterozigóticos que se obteriam numa situação em que os acasalamentos ocorressem ao acaso (Frankham *et al*. 2002). As raças autóctones, além de serem relevantes a nível cultural, são um importante reservatório de variabilidade genética, devendo por isso ser conservadas (Cañon & Dunner 1995). A raça Lusitana tem uma gestão baseada na utilização seletiva de reprodutores, o que poderá estar a comprometer a sua variabilidade genética. Esta perda de variabilidade constitui uma preocupação em Biologia da Conservação.

1.4.2 Conservação da Diversidade dos Recursos Genéticos Animais

A Conservação dos recursos genéticos animais (RGAn) é relevante para a preservação da biodiversidade, para além de permitir a fixação das populações em áreas rurais, promovendo a agricultura sustentável e o desenvolvimento rural integrado. Outras razões para a sua preservação prendem-se, ainda, com a segurança genética para as espécies e para a agricultura, fatores históricos e culturais e preocupações relacionadas com a extinção de variantes que possam ter valor científico e comercial (Sponenberg 2000).

Na maioria das espécies animais domésticas, o aumento global da produção está associado a uma perda de diversidade genética e a consanguinidade está associada ao aumento da frequência de doenças hereditárias, malformações ou disfunções, sendo assim fundamental a manutenção da diversidade genética, como ferramenta da produção animal *(*Woelders *et al*. 2004).

Na Europa, várias organizações governamentais, não-governamentais e privadas, tentam preservar a diversidade genética das espécies pecuárias *in situ.* Muitos países assinaram a Convenção para a Diversidade Biológica no Rio de Janeiro, em 1992 (CBD 1992) e, desde então, têm desenvolvido políticas no sentido da conservação e do uso sustentável dos recursos genéticos animais e vegetais *(*Woelders *et al* 2006). Mais recentemente, em Setembro de 2007, com a Declaração de *Interlaken*, adotou-se um Plano Global para os RGAn, com estratégias para prevenir a erosão genética e promover a sua sustentabilidade (FAO 2007).

Portugal, possui uma considerável riqueza de Recursos Genéticos Animais, traduzida no número de raças autóctones atualmente reconhecidas. Contudo, muitas destas raças encontram-se em risco de extinção, o que confere uma responsabilidade acrescida em assegurar a sua conservação a longo prazo. Neste sentido, importa promover a preservação das raças autóctones pelos criadores, bem como o desenvolvimento de programas de conservação de germoplasma que permitam a salvaguarda do património genético ameaçado (INIAV 2013). Assim, a gestão de RGAn requer um conhecimento profundo das características das raças, incluindo dados sobre o tamanho das populações, estrutura, distribuição geográfica, ambiente de produção e diversidade genética intra e inter raças (Groeneveld *et al* 2010a *in* Vicente 2015). Requer, ainda, métodos de seleção e estratégias de acasalamento, no sentido de optimizar a resposta genética a longo prazo, mesmo podendo pôr em causa eventuais ganhos a curto prazo (Boettcher *et al*. 2010). A FAO recomenda uma descrição molecular comparativa, com recurso a marcadores moleculares, no sentido de investigar a diversidade genética, de diferentes raças e, consequentemente aplicar as melhores ações de conservação possíveis. A caracterização genética é o primeiro passo na conservação de uma raça e pode ter implicações em estratégias de conservação e gestão futuras (Solis *et al*. 2005).

Como noutros *taxa,* os equinos sofrem de uma erosão genética e a sua conservação torna-se complicada pela extinção das populações selvagens.

1.4.3 Definir Prioridades em Conservação

A Conservação envolve custos. Para as raças que são economicamente sustentáveis, os custos tornam-se imperceptíveis, para as que não são, tornam-se necessários subsídios, ou incentivos, para se tornar viável a sua conservação. Sabendo que existem mais de 7500 raças de animais domésticos, a conservação de todas tornar-se-ia insustentável, sobretudo quando os fundos disponíveis são limitados. Nos países industrializados, onde se localizam grande parte dos recursos genéticos animais e as grandes multinacionais detêm o controlo da produção animal, com fins estritamente lucrativos, maximiza-se a produção para uma resposta genética no imediato, não se considerando a conservação genética a longo prazo. No entanto, a conservação de todas as raças pode não ser necessária, ou cientificamente justificável, dependendo do objectivo dos programas de conservação. Assim, assumindo que nem todos os RGAn podem ser conservados, torna-se necessário estabelecer prioridades (Boettcher *et al*. 2010).

Vários fatores podem contribuir para definir prioridades na conservação. Geralmente, o primeiro objetivo é preservar o máximo de diversidade genética possível. Para os recursos genéticos animais, este objetivo, geralmente, refere-se a conservar a maior diversidade intra-específica possível. No entanto, é importante conservar intra e inter-raças. Para avaliar a diversidade genética da raça, pode-se utilizar a informação da genealogia, ou o conhecimento da história da raça, o que nem sempre é possível, particularmente, nos países em vias de desenvolvimento. Alternativamente, pode-se utilizar a informação obtida por genética molecular, em particular, a obtida a partir de microssatélites (Boettcher *et al*. 2010). No entanto, outras variáveis podem ser tidas em conta como a demografia da população. As

raças que têm, geralmente, um reduzido efetivo e um elevado risco de extinção, têm prioridade em programas de conservação, mas quando o efetivo é muito reduzido e o risco de extinção muito elevado, pode não se justificar a sua conservação, pois a probabilidade de extinção é demasiado elevada em relação ao custo-benefício despendido na sua conservação (Ruane 2000).

1.4.4 Estratégias de conservação: métodos *in situ* e *ex situ*

Existem diferentes opções para conservar a diversidade genética. Geralmente, a conservação *in situ* é a preferida como mecanismo de conservação de raças ou de espécies em perigo (Boettcher *et al*. 2010). Uma raça tem de evoluir e adaptar-se às mudanças ambientais e o esforço para criar determinados produtos, ou funções, devem ser promovidos (Hiemstra *et al*. 2006). A Conservação de uma raça sem um plano de desenvolvimento de futuro, não é uma estratégia desejável. Contudo, em complemento à conservação *in situ*, existem métodos, ou técnicas, que mantêm os animais vivos fora da sua produção (figura 1), ou ambiente natural, como é o caso da conservação *ex situ* (*in vivo*) ou através da criopreservação de germoplasma (*in vitro*) (Bozkurt 2011).

No entanto, a conservação *in situ* deve ser complementada com ações de conservação *ex situ,* como a preservação de animais fora do seu local de origem, ou através da criopreservação de Gâmetas em Bancos de Germoplasma (FAO 2007). De facto, o Cavalo Lusitano encontra-se conservado *ex situ*, uma vez que existe em diferentes partes do mundo, no entanto não existe criopreservação de sémen e ovócitos no Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA), nem desta raça nem de outras raças de equinos. O BGPA, no caso da raça Lusitana, só tem criopreservado réplicas de DNA (Vicente 2015).

1.4.4.1 Conservação *in situ*

A conservação *in situ,* pressupõe a manutenção dos animais a preservar no seu local de origem, desenvolvendo planos de conservação e mantendo-os como um grupo dinâmico. É o método mais adequado para as espécies, ou raças, em perigo. As diferentes espécies de plantas cultivadas, peixes de viveiro e gado, são denominados, por convenção, de recursos genéticos *in situ,* quando se localizam em quintas nos arredores de onde são naturais (FAO 2007). Assim, a conservação *in situ* destes recursos, significa uma produção ativa de populações de animais para alimentação e produção agrícola, onde a diversidade é utilizada no curto prazo e mantida a longo prazo. Este método de conservação pressupõe o desenvolvimento de programas de melhoramento e gestão da diversidade genética dentro das populações, onde se inclui a gestão dos ecossistemas para a produção sustentável de alimentos e agricultura (FAO 2007).

1.4.4.2 Conservação *ex situ* (*in vivo* e *in vitro*)

A conservação *ex situ* pressupõe a preservação de material vivo (*in vivo*) com interesse cultural, histórico ou ecológico fora do seu lugar de origem, como acontece, por exemplo, na preservação de animais selvagens ou domésticos em Jardins Zoológicos ou parques

ecológicos. No contexto dos recursos genéticos animais, significa conservar fora do *habitat* e dos sistemas de produção que desenvolvem o recurso, ou seja, é o armazenamento de germoplasma em forma de animais vivos (FAO 2007). No entanto, tal como a conservação *in situ*, é aceite que o melhoramento e a seleção natural fora do ambiente original, possa alterar as frequências génicas no *gene pool* da população. A questão-chave para esta estratégia, é saber se haverá, ou não, financiamento a longo-prazo para manter o compromisso de manter gerações de animais, com as normas exigidas, para a conservação ser bem-sucedida (FAO 2007).

A conservação *ex situ* engloba, ainda, a Crioconservação (criopreservação) de material biológico em banco de genes (*in vitro*). A Criopreservação permite o armazenamento, praticamente, ilimitado, de material biológico, sem sofrer deterioração, numa escala de tempo de vários milhares de anos (Mazur 1985). Assim, vários países desenvolveram métodos de crioconservar em banco de genes raças raras e as mais utilizadas comercialmente *(*Woelders *et al* 2006). A crioconservação de material genético permite a sua introdução *a posteriori*, com o propósito de incrementar a diversidade nas populações.

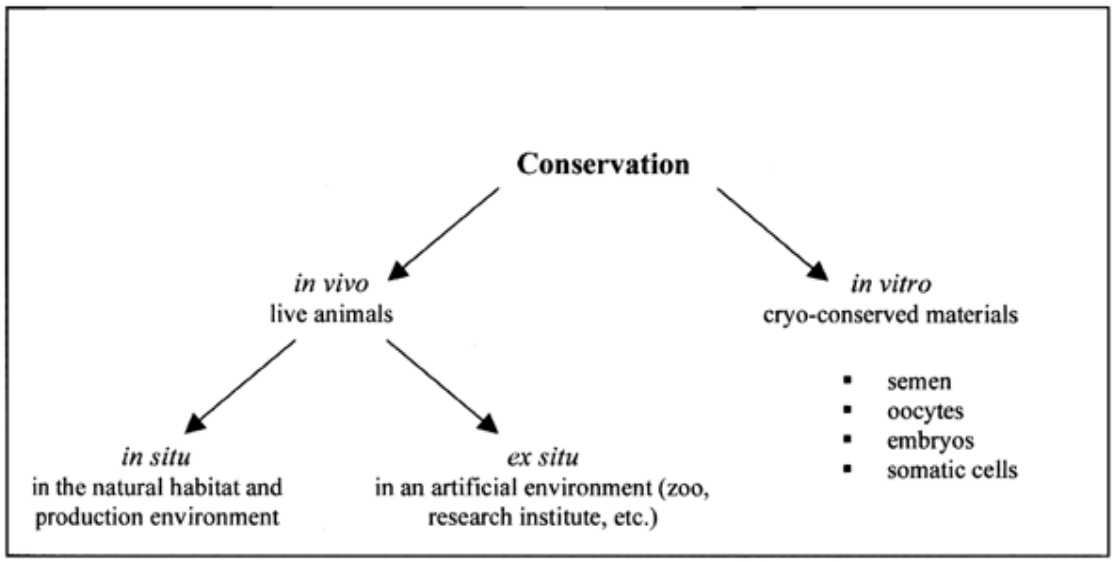

Figura 1 - Esquema resumo da Conservação dos Recursos Genéticos Animais (Adaptada de Simianer H. 2006).

Em muitos países, a conservação *ex situ* representa uma componente importante nas estratégias de conservação. Algumas focam-se, principalmente, na preservação de germoplasma de raças raras mas, em geral, há o consenso de que as colecções *ex situ* devem ser realizadas para todas as raças, com o propósito de capturar o máximo de diversidade alélica e génicas possíveis, em programas de conservação (Hiemstra *et al*. 2006).

A conservação *in situ,* ou a utilização dos recursos genéticos animais, não estão, necessariamente, dependentes de abordagens de alta tecnologia, no entanto a eficácia das estratégias da conservação *ex situ*, certamente beneficiarão destes avanços quer na criopreservação quer na reprodução. Uma vez que a conservação *ex situ*, em geral, tem um

custo mais elevado, está aberto o debate sobre as prioridades, as diferentes metodologias, a futura utilização e os benefícios da criopreservação e de tecnologias da reprodução (Hiemstra *et al.* 2006).

1.5 Banco de Genes

Os bancos de genes têm como principal função a conservação dos recursos genéticos no curto, médio ou longo termo. O material genético criopreservado, pode ser utilizado para introduzir diversidade genética nas populações *in vivo* e para reduzir os níveis de consanguinidade em eventos relacionados, por exemplo, com o efeito gargalo ou para redirecionar estratégias de seleção a nível da produção animal (FAO 2010).

Em Portugal, em 2010, foi criado o Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA), que tem como objetivo principal assegurar a recolha e manutenção de germoplasma, nomeadamente sémen, embriões, células somáticas e DNA, de todas as raças nacionais de animais domésticos, de forma a garantir a sua conservação a longo prazo, de acordo com as recomendações das organizações internacionais competentes, assegurar a sua disponibilidade para utilização nos programas de seleção e conservação *in situ* de raças autóctones e promover o intercâmbio de informação e troca de material genético, com bancos congéneres estrangeiros (Horta *et al* 2012; INIAV 2013). Este confere, ao material genético recolhido, o indispensável enquadramento, respeitando as recomendações internacionais, garantindo a salvaguarda a longo prazo do património genético das raças autóctones portuguesas.

Um repositório de germoplasma pode servir diferentes propósitos (Woelders *et al*. 2004). Um dos objectivos destes repositórios de germoplasma é proporcionar a possibilidade de recrear raças, ou linhagens, em caso de perda como, por exemplo, em consequência de uma calamidade (Woelders *et al*. 2004; Hiemstra *et al*. 2006; FAO 2010). Se uma raça se extinguisse, seria possível recreá-la a partir de amostras adequadas de germoplasma criopreservado, realizando sucessivos retrocruzamentos (Woelders *et al*. 2004; FAO 2007). O armazenamento de germoplasma com este propósito seria realizado a longo-termo, sem a necessidade de uma atualização constante da coleção (Woelders *et al*. 2006; FAO 2007).

Uma segunda forma de utilizar os recursos de um banco de genes, é dar suporte à conservação *in situ.* Em pequenas populações, podem ser utilizados sémen congelado e embriões, para minimizar a consanguinidade e a deriva genética. A combinação de animais vivos com germoplasma criopreservado, pode ser uma poderosa ferramenta na conservação de pequenas populações (Woelders *et al*. 2006; FAO 2007).

Adicionalmente, os recursos de um banco de genes podem ser utilizados como *back-up* em caso de ocorrência de problemas genéticos, como a perda de diversidade alélica, consanguinidade, ocorrência de combinações de genes deletérios (ERFP 2003). Este fenómeno não acontece apenas em populações pequenas, ou raças raras, mas, também, em grandes raças comerciais em que, por exemplo, um pequeno número de reprodutores

masculinos seja responsável por uma elevada descendência. Nestes casos, o *gene pool* da população é muito reduzido. Assim, pode ser utilizado sémen com diferentes genótipos, para refrescar a raça (Woelders *et al*. 2006; FAO 2007).

Uma quarta utilização para os recursos genéticos criopreservados, é a possibilidade de permitirem o desenvolvimento de novas linhagens, ou raças, para modificar, ou reorientar rapidamente, a evolução, ou seleção, da população. Assim, a criopreservação de genótipos extremos (raros) ou originais (de fundadores) pode servir para modificar ou reorientar a evolução, ou seleção, de uma dada população (Verrier *et al*. 2003; ERFP 2003; Woelders *et al*.2006; FAO 2007).

Como quinta, e última utilização, os recursos de um banco de genes podem ser utilizados para fins de investigação (ERFP 2003).

1.6 Análise da Diversidade Genética com Base em Marcadores Moleculares: Microssatélites

1.6.1 Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são marcadores do genoma, com sequências de DNA identificáveis, localizados em zonas específicas e seguem as leis da hereditariedade. Contrastam com os marcadores morfológicos, baseados em caracteres visíveis e com os marcadores bioquímicos, baseados em proteínas (Ruane & Sonnino 2007).

Quando o objetivo é a conservação de espécies, ou raças, torna-se necessário determinar e quantificar a variação existente inter e intra indivíduos de uma população (Aranguren-Méndez *et al*. 2004). Assim, a aplicação de marcadores moleculares neutros é extremamente útil para a análise genética de populações, comparação dos níveis de variação entre populações, avaliação geral da variação genética e para determinar o nível de subestrutura, incluindo a quantidade de migração e as relações genéticas entre subpopulações (Dovc *et al*. 2004). No entanto, a utilidade dos marcadores ultrapassa as experiências de mapeamento, ou de *fingerprinting,* em genética de populações onde, por vezes, as frequências alélicas, mais que os indivíduos, servem de objeto de estudo. Assim, as variações das frequências alélicas em espécies domésticas podem interessar aos criadores pois é "matéria-prima" onde pode atuar a seleção. Os marcadores de DNA, distribuídos aleatoriamente pelo genoma, podem ser representativos de *loci* que codificam caracteres fenotípicos que estão sob seleção (Labate 2000).

1.6.2 Microssatélites

Os microssatélites são marcadores moleculares com unidades de repetição entre 1 a 5 pares de bases (Schlötterer & Pemberton 1994), também, denominados de STR (*Short Tandem Repeats*) que se repetem em *tandem*, e de forma aleatória, no genoma (figura 2).

São considerados ferramentas úteis para estudos genéticos, pois apresentam um elevado grau de polimorfismo, têm hereditariedade mendeliana e são codominantes (permitindo a diferenciação entre homozigotas e heterozigotas). Estes marcadores encontram-se, geralmente, em regiões não codificadores do genoma (regiões intrónicas) apesar de existirem, também, em regiões codificadoras (regiões exónicas) e nos telómeros, estando a sua presença, nesta região, associada a doenças (Armour *et al*. 1994). Desconhece-se o significado funcional destas sequências, apesar da hipótese mais consensual ser o emparelhamento e a condensação do DNA nos cromossomas (Vanhala *et al*. 1998).

Após a sua descoberta em 1985, por Jeffreys *et al*. os microssatélites começaram a ser utilizados para identificação genética, testes de paternidade, estimar a diversidade populacional, medir a diferenciação de populações, definir relações genéticas e estimar a variabilidade genética populacional.

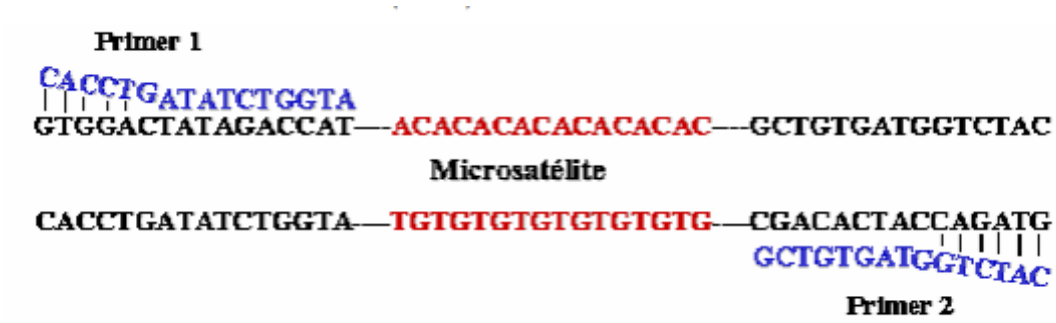

Figura 2 - Exemplo de um microssatélite com repetição de um par de bases de AC (n).

Os microssatélites são extremamente sensíveis ao efeito gargalo e são, frequentemente, utilizados para estimar a consanguinidade (Barker *et al*. 1997; Estoup *et al.* 1998). Assume-se que são neutrais às forças da selecção, presumindo-se que a diversidade genética encontrada resulta da consequência da deriva genética e de mutações. Assim, são a ferramenta mais utilizada para avaliar a diversidade genética dos recursos genéticos animais e os mais utilizados para estudos de genética de populações sendo, particularmente, adequados a projetos na área da Conservação, pois permitem obter informação para estabelecer prioridades na preservação de raças domésticas (Barker 1999) e na conservação de animais selvagens (Cañon *et al*. 2000). Estes marcadores facultam, ainda, uma visão da história genética das raças e informação quer da distinção inter-raças quer da diversidade genética intra-raça (Boettcher *et al*. 2010).

Apesar das vantagens da utilização dos microssatélites, enquanto marcadores moleculares, existem fatores a considerar e que podem diminuir o seu poder ou sensibilidade, tais como as mutações, os alelos nulos e a homoplasia.

1.6.2.1 Mutações

As mutações são alterações do genoma de uma célula, em relação a uma sequência de DNA de referência, transmissível às células filhas. Podem ser desde simples substituições de

um nucleótido, a deleções ou inserções, de um ou mais, nucleótidos. Uma mutação que ocorra nos gâmetas é hereditária, uma mutação que ocorra nas células somáticas não é hereditária. A taxa de mutação define o número de mutações/gene/geração (sendo a geração a unidade de tempo). No que respeita aos efeitos das mutações, estas podem ser deletérias, neutras ou benéficas. Nas mutações deletérias, os efeitos em termos individuais e de descendência, têm a ver com a penetrância e com a expressividade. As mutações deletérias estão sujeitas à pressão da seleção, sendo eliminadas da espécie as que criam desvantagem biológica. Nas mutações neutras, o portador não é afetado e nas mutações benéficas, há vantagem para o seu portador em termos de capacidade reprodutiva ou por melhor adaptação ao meio. Assim, os alelos que concedam vantagem tendem a ser mais frequentes nas populações em que este efeito se observa. As mutações neutras e as mutações benéficas incluem-se entre os mecanismos responsáveis pela grande diversidade existente (Regateiro 2003).

A maioria das mutações não altera o fenótipo pois ocorrem, geralmente, em regiões génicas não codificadoras. As regiões génicas codificadoras (exões) têm uma baixa taxa de mutação que se reflete no elevado grau de conservação que apresentam inter-espécies (Eisen 1999).

Nos microssatélites, ao contrário de outros marcadores, a maioria das mutações envolve a inserção ou deleção de uma unidade de repetição (Weber & Wong 1993; Amos *et al.* 1996) e apresentam uma elevada taxa de mutação variando entre 10^{-5} e 10^{-2} *per locus per* gâmeta *per* geração, sendo determinantes para o nível de variabilidade das populações (Hancock 1999).

Estas mutações são causadas por mecanismos intramoleculares que provocam um deslizamento das cadeias de DNA durante a replicação denominado de DNA *slippage* (Goldstein & Schlotterer 1999). As unidades de repetição nas duas cadeias de DNA, durante a replicação, podem ligar-se fora do registo. A consequência deste *annealing* fora do registo, seguido pela reparação do DNA, pode resultar na expansão ou na contração do microssatélite (Schlötterer & Pemberton 1994). As variações do tamanho das unidades de repetição, podem ser detectadas através da amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*), seguido de medição por electroforese do tamanho dos produtos amplificados (Weising *et al*. 1996).

1.6.2.2 Alelos Nulos

Denominam-se alelos nulos, os alelos que não são amplificados por PCR devido a uma mutação no local de hibridação dos *primers* Assim, um dos alelos não amplifica dando origem a uma homozigota "falsa" (Dawson *et al*. 1997). A sua existência é difícil de detetar quando a sua frequência na população é baixa e não se dispõe de informação genealógica fidedigna. Nos testes de paternidade, pode-se suspeitar da presença de alelos nulos num marcador, quando todos os outros marcadores apontam para um determinado progenitor e existe homozigotia apenas no marcador da exclusão. Um alelo nulo, pode induzir a interpretações erradas e excluir, eventualmente, o verdadeiro progenitor, principalmente, quando se desconhecem as frequências alélicas de uma população. Uma das formas para se detetar a

presença de alelos nulos é através do cálculo do *deficit* de heterozigotas para o HWE (Neuman & Wetton 1996). No entanto, de uma forma prática, podem-se sintetizar *primers* alternativos para amplificar fora do ponto da mutação e voltar a amplificar esse marcador para corroborar, ou não, a homozigotia. Deve-se evitar a utilização de marcadores com elevada probabilidade de ocorrência de alelos nulos, em determinadas populações ou raças, pois podem gerar resultados falsos (Dawson *et al*. 1997).

1.6.2.3 Homoplasia

O conceito de homoplasia foi originalmente utilizado pelos evolucionistas para descrever quando um caractere presente em duas espécies, não deriva do mesmo caractere de um ancestral comum, mas, a sua semelhança, dever-se a fatores de convergência, paralelismo ou reversão. Sendo, portanto, considerado o oposto da homologia, pois esta é considerada um sinal de evolução (Scotland 1992 *in* Estoup *et al.* 2002)

Para um marcador genético, a homoplasia ocorre quando diferentes cópias de um *locus* são idênticas no estado, apesar de não serem idênticas por descendência (Estoup *et al.* 2002) *i.e.* fragmentos de tamanho idêntico podem não ter origem na mesma sequência ancestral. Os alelos podem ter o mesmo tamanho (bp) mas, intrinsecamente, existirem diferenças na estrutura, presença de inserções e/ou delecções, mudanças de bases ou variações na região flanqueadora (Primmer & Ellergren 1998). A homoplasia não é detetada por amplificação por PCR e por análise dos produtos amplificados. Só pode ser detetada por sequenciação. Assim, a homoplasia em testes de paternidade, pode induzir em erro, pois pode fazer supor uma relação de parentesco que na realidade não exista. Também, pode ser fonte de erro em estudos de Genética de Populações, ou de Evolução, pois a taxa de mutação dos microssatélites está relacionada, de forma complexa, com o tamanho e composição do alelo. Assim, a homoplasia pode reduzir o número observado de alelos *per* população, a proporção de heterozigotas e a diversidade genética (Estoup *et al*. 1995; Garza & Freimer 1996; Jarne & Lagoda 1996; Angers & Bernatchez 1997; Viard *et al*. 1998; Taylor *et al*. 1999; Angers *et al*. 2000).

1.6.2.4 Modelos Mutacionais

Existem diferentes modelos mutacionais para explicar a evolução dos microssatélites. O *Infinite Allele Model* (IAM, Kimura & Crow 1964) supõe que não existe homoplasia e que cada nova mutação conduz a um novo alelo distinto do que havia previamente na população. O K-*allele Model* (KAM, Crow & Kimura 1970) permite K possíveis estádios alélicos (K= ∞) e qualquer alelo tem uma probabilidade constante de mutação em relação a qualquer um de outros alelos noutro estádios e a homoplasia do tamanho dos alelos é esperada, pois os alelos são idênticos no estado e não no ancestral. O *Stepwise Mutation Model* (SMM, Kimura & Ohta 1978) defende que cada mutação adiciona, ou retira, com igual probabilidade, uma unidade de repetição, em que alelos com tamanhos muito diferentes estarão mais distantes entre si do que alelos de tamanhos mais semelhantes. O *Two Fase Model* (TPM, Di Rienzo *et al*. 1994) é o modelo mais recente e defende que cada mutação tem uma probabilidade *p* de ser uma mutação *one-step* e probabilidade 1-*p* de ser uma mutação *multi-step*. Na realidade,

é idêntico ao SMM, mas permite que possam ocorrer mutações de maior magnitude e prevê a variação esperada do número de repetições de um microssatélite sob diferentes processos de mutação e histórias demográficas. O *Generalized Stepwise Model* (GSM), corresponde a uma versão simplificada do TPM, em que p = 0 (Estoup *et al.* 2002). Todos os modelos preveem, à exceção do IAM, que os alelos possam mutar em relação aos estádios alélicos previamente existentes na população e, portanto, gerar homoplasia de tamanhos (Estoup *et al.* 2002). Alguns autores defendem que a maioria dos estudos indicam que o TPM e o GSM são modelos mais realistas (Ellegren 2000a; Schlötterer 2000 *in* Estoup *et al.* 2002). Outros defendem o SMM (Amos *et al*. 1996).

No entanto, parece que dependendo do tamanho da unidade de repetição, os microssatélites se adaptam mais a um modelo ou a outro. Os microssatélites com modelos de repetição de 3-5 bp parece que seguem o SMM, enquanto os de 1-2 bp seguem o IAM e o TPM (Vanhala *et al*. 1998).

1.7 Seleção de Reprodutores para Banco de Genes

1.7.1 Material biológico a Crioconservar

Dada à relevância da Crioconservação, como estratégia para a preservação da diversidade genética e, tendo em conta, que no cavalo Lusitano não existe crioconservação de oócitos, embriões ou sémen, no Banco Português de Germoplasma Animal, nem de qualquer outra raça de equinos (Vicente 2015), um dos objetivos deste trabalho foi identificar a partir da análise de microssatélites, reprodutores que tenham interesse genético para futura criopreservação em Banco de Genes. Assim, de um ponto de vista genético, coloca-se a primeira questão: O que deve ser crioconservado? Qual o tipo de material biológico a criopreservar? E de que animais?

Simianer (2006) diz-nos que, a nível mundial, o sémen e os embriões são a primeira escolha do material biológico a criopreservar. No entanto, Hall (1995) refere que a criopreservação de sémen é a mais exequível, para a maior parte das espécies domésticas e que a utilização de embriões é realizada apenas em bovinos e em pequenos ruminantes, apesar de estar em vias de expansão para outras espécies. A criopreservação de células somáticas é vista como uma opção simples e pouco dispendiosa e tornou-se popular com o sucesso da clonagem da ovelha *Dolly* (Wilmut *et al.* 1997). No entanto, até agora, a experiência prática com esta técnica foi bastante limitada para a maioria das espécies.

Assim, a decisão do tipo de material biológico a crioconservar depende dos objetivos de gestão dos recursos genéticos. Estes, por sua vez, dependem do estado e/ou tamanho da população. Neste estudo, optou-se pelo estudo dos garanhões uma vez que a conservação de sémen é o mais exequível e o mais praticado em crioconservação, a nível mundial. Até porque, a taxa reprodutiva dos machos é muito superior à das fêmeas (Costa Ferreira & Oom 1989) tendo, naturalmente, uma maior influência na época reprodutiva. Em equinos, a idade

ideal para a colheita e preservação de sémen, de forma a garantir a sua viabilidade, é entre os cinco e os vinte anos, pois a partir desta idade a qualidade do sémen começa a diminuir, devido ao aumento de incidências de anomalias morfológicas (Morel 1999). No entanto, e de forma a garantir a conservação de todos os alelos, foram analisados animais dos cinco aos trinta anos de idade, vivos à data do estudo. Relativamente, ao número de dadores de sémen, é sabido que o número de indivíduos utilizados afeta a quantidade de diversidade genética armazenada em criobancos. Geralmente, as diretivas recomendam um mínimo de 25 dadores (ERFP 2003).

1.7.2 Criobanco Nacional Francês: Um caso-estudo

Em França, em 1999, foi criado o Criobanco Nacional Francês, que criopreserva material biológico de várias espécies domésticas, incluindo os equinos. O Ministério da Agricultura Francês lidera o projeto, mas as organizações privadas, como os Centros de Inseminação Artificial e as Associações de Criadores, foram envolvidas desde o início.

A maioria do material armazenado é sémen apesar de, também, considerarem o armazenamento de embriões e células somáticas Até Outubro de 2002, o Criobanco Nacional Francês, tinha 35 000 doses de sémen criopreservadas, para um total de 29 raças diferentes de 5 espécies (ruminantes, equinos e porcos) (Verrier *et al.* 2003).

Aparentemente, a progressiva construção deste banco, revelou problemas de ordem prática, como aspetos sanitários do material biológico, de propriedade do material armazenado, de segurança, atualização e gestão de informação (Danchin-Burge *et al*. 2002).

Uma das prioridades do Criobanco Francês, é ser uma ferramenta para a segurança, facilidade e eficiência na gestão da conservação *in situ* dos recursos genéticos animais (Danchin-Burge *et al.* 2002). A escolha do material a crioconservar é realizada de acordo com o estado ameaçado, ou não, da população. Assim, Verrier *et al*. (2003) propõem uma classificação para os três tipos de materiais armazenados no Criobanco Francês e a sua potencial utilização, no futuro:

1. **Populações ameaçadas (Material de Tipo I)**

Tendo em conta que em programas de conservação de populações ameaçadas o principal objetivo é evitar a extinção das populações, torna-se essencial permitir que as fêmeas acasalem com regularidade. Para isso, torna-se essencial, e facilita todo o processo, o acesso a sémen criopreservado. Assim, a Inseminação Artificial (IA), é a ferramenta de eleição para a gestão de raças ameaçadas. De acordo com estas considerações, o material de tipo I, deverá ser colhido entre as populações ameaçadas, a fim de permitir uma restauração da raça em caso de extinção. Neste caso, a variabilidade genética a recolher, deve ser a mais variável possível.

2. **Populações não ameaçadas (Material de Tipo II e III)**

As populações não ameaçadas podem ser submetidas a uma intensidade maior, ou menor, de seleção. O principal objetivo, nestas populações, é assegurar a possibilidade de

evoluírem, no futuro, especialmente, se as mudanças no contexto da produção implicarem mudanças na forma de seleção. Assim, os criobancos devem disponibilizar:

-Genótipos originais e/ou extremos (Material de Tipo II)

Os genótipos originais, ou extremos, podem ser úteis para modificar a evolução de uma dada população e/ou refrescar a sua variabilidade genética. Podem, também, ter interesse para fins de investigação. Estes genótipos podem ser perdidos, por não corresponderem aos objetivos de produção. Assim, a conservação do material tipo II, foca-se na conservação de genótipos originais e/ou extremos, cujo interesse é avaliado de acordo com três critérios diferentes: (1) *Estimated BreedingValue* (EBV) para um ou mais caracteres registados (tipo II.1), (2) genótipos específicos com alelos raros para determinados marcadores genéticos (tipo II.2) e (3) animais com o *pedigree* original da população ou raça, *i.e*., os animais fundadores da população ou da raça (tipo II.3).

-Animais representativos do atual estado da população (Material de Tipo III)

Em populações com um ritmo genético acelerado, os animais mais atuais, podem ser vistos no futuro como geneticamente originais ou, pelo menos, diferentes. Assim, os criobancos permitem a criopreservação destes animais, sendo possível seguir a evolução da população, estimando os eventuais ganhos genéticos. Se se considerar a hipótese de reverter determinados "ganhos" genéticos, o material mais antigo pode ser utilizado para reorientar a seleção. Para armazenar uma amostra representativa da variação genética da raça, a amostragem deve ser aleatória, também no que diz respeito às relações genéticas entre os indivíduos. Na prática, isto pode ser conseguido por seleção de: i) informações de *pedigree*, animais distantemente relacionados, por exemplo, sem avós comuns; ii) animais de diferentes áreas e rebanhos, considerando os fluxos genéticos (*i.e.* intercâmbio de animais) entre rebanhos e áreas. O mais comum em crioconservação é o armazenamento de uma amostra representativa da raça (ERFP 2003).

1.8 Objetivos

Dada à relevância crescente da Crioconservação, como estratégia complementar para a conservação da diversidade genética *in situ* e, tendo em conta, que não existe qualquer criopreservação de oócitos, embriões ou sémen, da raça em Banco de Genes, os principais objetivos deste trabalho são:

(1) Análise da diversidade genética de uma população de machos reprodutores utilizando um painel de microssatélites recomendados pela *Internacional Society for Animal Genetics* (ISAG);

(2) Definição e aplicação de critérios para seleção de genótipos de machos reprodutores com interesse genético para crioconservação de sémen em Banco de Genes, no sentido quer de preservar a diversidade da raça quer no da salvaguardar em caso de redução drástica do seu efetivo.

2 Material e Métodos

2.1 Análise da diversidade genética de machos da raça Lusitana

2.1.1 Amostras

Neste estudo, das 41126 amostras de animais de raça Lusitana genotipadas no Laboratório de Genética Molecular de Alter, entre Agosto de 1998 e Dezembro de 2012 foram considerados todos os machos, vivos (à data do estudo), inteiros (não castrados), inscritos no Livro de Adultos (aprovados como reprodutores) e nascidos entre 1985 e 2010, perfazendo um total de 2699 animais. Estes animais foram genotipados em contexto de rotina, na realização de testes de paternidades. O laboratório, até 2001, utilizou seis microssatélites (*HMS3; HMS7; HTG4; HTG10; VHL20* e *ASB2*), por serem extremamente polimórficos, nomeadamente, em raças com influência ibérica (Luís *et al*. 2002b). Em 2001, foram adicionados mais três microssatélites (*AHT4; AHT5* e *HMS6*) de um painel recomendado pela *Internacional Society for Animal Genetics* (ISAG), perfazendo um total de nove marcadores que foram, sistematicamente, utilizados até 2009. De 2009 até à presente data, têm sido utilizados mais oito marcadores, (*UCDEQ425; HMS1; HMS2*; *HTG6; HTG7; ASB17; ASB23* e *LEX3*), perfazendo um total de 17 marcadores, dos quais 12 pertencem ao painel recomendado pela ISAG (Tabela 2). Do painel de *loci* analisados, foi excluído o *locus LEX 3*, uma vez que este marcador é heterossómico, ligado ao cromossoma-X, o que significa que está em homozigotia nos machos, causando desvios significativos ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (HWE) e elevadas diferenças entre os valores da heterozigotia esperada e observada (Zabek & Fornal 2009).

2.1.2 Extração de DNA

O DNA genómico foi extraído a partir de amostras de sangue total, colhidas em tubos de 10 ml com anti-coagulante EDTA, utilizando o método salino (Montgomery & Sise 1990), ressuspendido em TE pH 8.0 e preservado a 4ºC. Foi quantificado por espectofotometria e diluído para uma concentração final de 3 ng/µl.

2.1.3 Amplificação e Genotipagem para 6 e 9 microssatélites

A amplificação por PCR foi realizada com uma solução final de 10µL que continha 1µL de DNA genómico, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2mM de dNTPs, *primers* fluorescentes e não fluorescentes com uma concentração que variou entre 0,5pM e 3pM, 0,5U de Taq DNA polymerase e 1X Tampão de reação. A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador MJ-Research PTC-100TM (MJ Research Inc., Watertown. MA, USA), sendo iniciada com uma desnaturação de 95 ^{0}C (5'), seguido de 5 ciclos com desnaturação a 95 ^{0}C (30"), hibridação a 58 ^{0}C (30") e extensão a 72 ^{0}C (30") e 35 ciclos com desnaturação a 95 ^{0}C (30"), hibridação a 57 ^{0}C (30") e extensão a 71 ^{0}C (30") a ultima extensão foi prolongada até aos 10' a 72 ^{0}C. Os *loci HMS7, HMS3, HTG4* e *VHL20*, foram amplificados em Tetraplex, os *loci ASB2, HMS6* e *HTG10* em Triplex e os *loci AHT4* e *AHT5*, em PCR individuais. Os produtos de PCR foram separados em géis desnaturantes de poliacrilamida a 6%, com 0,25 mm de largura, utilizando os sequenciadores automáticos de fluorescência 4000 e 4200 LI-COR (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE, USA).

As imagens resultantes foram analisadas com o software RFLPscan v.3.1 (Scanalytics, CPS Inc., USA). O tamanho dos fragmentos de DNA foi identificado com base no marcador 50-350 bp Licor (figura 3).

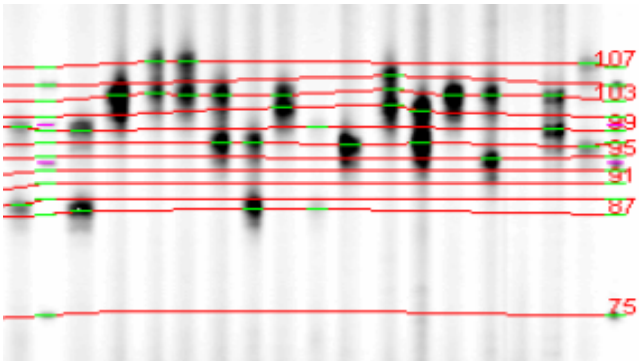

Figura 3 - Análise de imagem com o software RFLPscan v.3.1 na identificação de fragmentos para o *locus VHL20*.

2.1.4 Amplificação e Genotipagem para 17 microssatélites

A amplificação por PCR foi realizada com recurso a um kit comercial da Applied Biosystems (Applera Europe, Germany) com 17 *primers* fluorescentes e não fluorescente seguindo as instruções do fabricante. A amplificação dos fragmentos foi realizada em termociclador MJ-Research PTC-100TM (MJ Research Inc., Watertown. MA, USA), sendo iniciada com uma desnaturação de 95°C (10'), seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C (30"), hibridação a 60°C (30") e extensão a 72°C (30") e a última extensão de 60' a 72°C, com finalização a 4°C. Os produtos amplificados foram separados em Sequenciador Capilar ABI 3130, com capacidade de deteção para 5 marcadores fluorescentes, 6-FAM, VIC, NED e PET. Cada amostra foi corrida com o marcador LIZ 500 e com o filtro G5. Os tamanhos dos fragmentos resultantes para os 17 microssatélites foram analisados pelo software Genemapper 4.0 (figura 4).

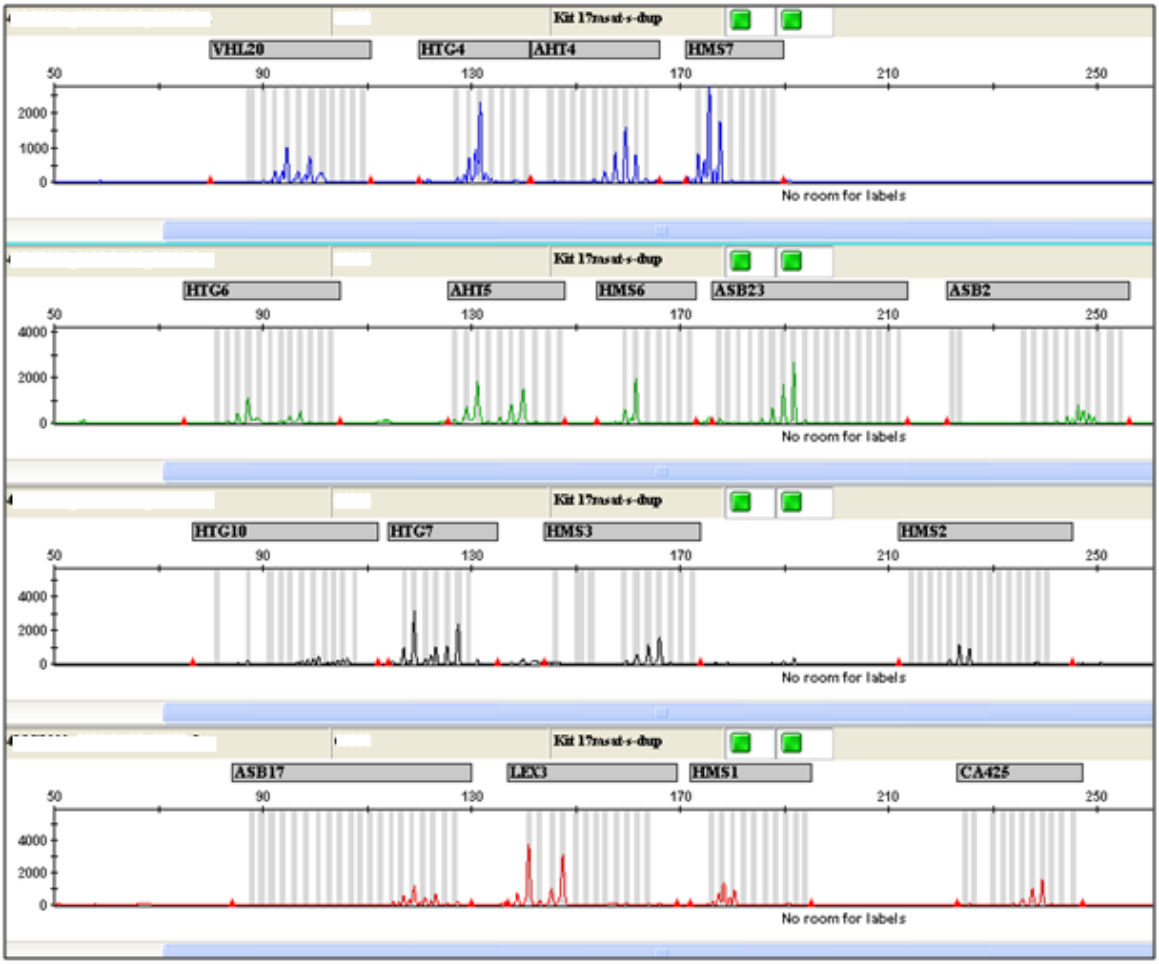

Figura 4 - Análise de imagem com o software Genemapper 4.0 de um perfil de DNA para 17 *loci*.

2.1.5 Análise Estatística

A análise à diversidade genética de 2699 machos reprodutores, foi realizada informaticamente com recurso ao programa CERVUS 3.0.7 (Marshall *et al*. 1998), para determinação do número de alelos e das suas frequências (Anexo I) da heterozigotia observada (Ho) e da heterozigotia esperada (He) (Nei 1978), do conteúdo de informação polimórfico (PIC) (Botstein *et al*., 1980) e da frequência estimada para a ocorrência de alelos nulos (Summers & Amos 1997). Foi, também, calculado com o programa Genepop 3.4 (Raymond & Rousset 1995) o desvio ao HWE com o teste exato de Fisher (Guo & Thompson 1992). Este teste indica a probabilidade de erro ao rejeitar a hipótese nula (H_0) de que a população se encontra em HWE (Raymond & Rousset 1995). O *deficit* de Heterozigotia (F_{IS}) *per locus* e o valor médio para todos os *loci*, foi estimado de acordo com Weir & Cockerham (1984).

2.2 Seleção de animais a criopreservar

2.2.1 Definição de Critérios a aplicar à raça Lusitana

Considerando toda a informação sobre o estado atual do cavalo Lusitano, vão-se ter em conta dois dos critérios referidos para criopreservação de sémen (ERFP 2003; Verrier 2003; Hall 2004; Woelders *et al.* 2006; Simianer 2006) de machos reprodutores da raça. No que concerne à quantidade de dadores, vão-se selecionar, aproximadamente, 30 dadores de acordo com cada critério.

2.2.1.1 Genótipos extremos (portadores de alelos muito raros)

Vamos selecionar animais com genótipos portadores de alelos muito raros, se possível, em homozigotia, para "garantir" a passagem desses alelos à descendência. A criopreservação de sémen destes animais poderá permitir a reorientação da seleção da população (ERFP 2003; Verrier *et al*. 2003; Woelders *et al.* 2006) em termos de variabilidade genética, ao possibilitar o "refrescamento" da raça com alelos cuja frequência é muito baixa na população.

2.2.1.2 Genótipos representativos (portadores de alelos muito frequentes)

No que concerne aos genótipos representativos da raça, vamos selecionar amostras de animais com genótipos portadores dos alelos mais frequentes na população. A criopreservação de sémen de animais com estes genótipos, poderá funcionar como uma salvaguarda da variabilidade da raça, em caso de uma redução drástica do seu efetivo e/ou se ocorrer problemas genéticos como (por exemplo) o aumento de frequência de genes deletérios caso a população sofra um acentuado efeito gargalo (ERFP 2003).

2.2.2 Amostras

Da população de 2699 machos reprodutores, nascidos entre 1985 e 2010, retiraram-se os genótipos que não estão totalmente tipificados para os 16 *loci* obtendo-se um grupo de 623 animais. No entanto, como ficaram excluídos alguns genótipos portadores de alelos raros, por terem valor zero para alguns *loci*, reintegraram-se esses animais, ficando um grupo final de 644 animais (Anexo II).

2.2.3 Análise de dados

Desenvolveu-se um algoritmo de quantificação do número total de alelos (NTA), do número de alelos muito raros (AMR), do número de alelos raros (AR), do número de alelos muito frequentes (AMF) e, por exclusão de partes, do número de alelos frequentes (AF), a partir dos diferentes valores de frequências alélicas, inferidas do *output* do programa CERVUS 3.0.7 (Marshall *et al*. 1998).

Este algoritmo é executado sobre a tabela nº25 do Anexo II, segundo os critérios definidos nas tabelas nº5 e nº6. O output do algoritmo permite a ordenação das amostras numa folha de EXCEL.

Trata-se de um algoritmo que se poderá executar diretamente em compilador de Visual Foxpro da Microsoft ou ser adaptado a qualquer outra ferramenta de gestão de base de dados relacional.

O algoritmo integralmente reproduzido no Anexo III, tem como *input* 2 tabelas: a tabela de critérios de seleção (alelosteste.dbf), que é constituída pelos dados descritos nas tabelas nº5 e nº6 e a tabela universo/alvo da seleção/ordenação (machos.dbf), que é constituída pela tabela nº25 do Anexo II, que contem a lista de 644 amostras de machos reprodutores alvo de seleção para crioconservação. Esta última tabela de *input* (machos.dbf), possui também os campos onde o algoritmo regista a contagem para cada amostra/genótipo de acordo com os alelos presentes. Estas 2 tabelas estão disponíveis para envio em formato digital (sofia.abreu-ferreira@geneweb.pt).

3 Resultados

3.1 Análise da diversidade genética de machos reprodutores da raça Lusitana

Para o total dos 2699 machos reprodutores da raça Lusitana foram obtidos 131 alelos para o painel de 16 *loci* analisados, com um número médio de alelos (MNA) de 8,19 *per locus*. O número de alelos *per locus* variou entre 3 (*HTG7*) e 13 (*ASB17*), a heterozigotia observada variou entre 0,191 (*HTG7*) e 0,819 (*VHL20*) e a heterozigotia esperada entre 0,207 (*HTG7*) e 0,828 (*ASB17*) (Tabela 3). Estes valores indicam que para o conjunto de animais analisados, o *locus* menos polimórfico é o *HTG7* e o mais polimórfico é o *ASB17*. A heterozigotia observada foi menor do que esperada para todos os *loci*, à exceção do *UCDEQ425*, com valores médios de respetivamente, 0,678 e 0,700.

Todos os *loci* são muito informativos, com um PIC superior a 0,5, à exceção do *HTG7*. Os valores variaram entre 0,194 (*HTG7*) e 0,809 (*ASB17*).

De acordo com o teste de HWE *per locus* com P <0,05, apenas 4 *loci* (*HTG4*, *VHL20*, *HTG6* e *HMS1*) dos 16 analisados estão em HWE (Tabela 4). Todos os *loci* apresentam *deficit* em heterozigotas, à exceção do *locus UCDEQ425,* o que corrobora os valores obtidos para a heterozigotia observada. Para o total dos *loci* encontrou-se um *deficit* significativo de heterozigotas (F_{IS} W&C = 0,034), como confirmado pelo teste de χ^2, o que nos indica que a população não se encontra em equilíbrio.

Dos 131 alelos identificados, 31 são muito raros, com uma frequência na população menor que 1%, 44 são raros, com uma frequência na população entre 1 e 10% (Tabela 5), 17 são frequentes, com uma frequência na população entre 10 e 15% e 39 são muito frequentes, com uma frequência acima dos 15% (Tabela 6). Em todos os *loci* foram identificados alelos muito raros à exceção dos *loci HTG7* e *HMS2*. Os *loci* com mais alelos raros são o *ASB2* e o *ASB17* com os valores de respetivamente, 5 e 4.

Tabela 2 - Painel de microssatélites analisados com respetiva localização cromossómica, referência e sequência dos *primers* (*forward* e *reverse*).

Microssatélite	Localização no cromossoma	Referência	Sequências dos *primers* (*forward* e *reverse*)
AHT4	24q14	Binns *et al*. (1995)	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT
AHT5	8	Binns *et al.* (1995)	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC
ASB2	15q21.3-q23	Breen *et al*. (1997)	F: CCACTAAGTGTCGTTTCAGAAGG R: CACAACTGAGTTCTCTGATAGG
ASB17	2p14-p15	Breen *et al.* (1997)	F: ACCATTCAGGATCTCCACCG R: GAGGGCGGTACCTTTGTACC
ASB23	3q22.1-q22.3	Irvin *et al.* (1998)	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R: ACATCCTGGTCAAATCACAGTCC
UCDQ425	28q18	Eggleston-Stott *et al*. (1997)	F: AGCTGCCTCGTTAATTCA R: CTCATGTCCGCTTGTCTC
HMS1	15	Guérin *et al.* (1994)	F: CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG R: GACATAAATGCTTATCCTATGGC
HMS2	10	Guérin *et al.* (1994)	F:CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG R: ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG
HMS3	9	Guérin *et al.* (1994)	F: CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT R: CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA
HMS6	4	Guérin *et al.* (1994)	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGTAACTCA
HMS7	1q25	Guérin *et al*. (1994)	F: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT R: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC
HTG4	9	Ellegren *et al.* (1992)	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC
HTG6	15q26-q27	Ellegren *et al*. (1992)	F: GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT R: CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT
HTG7	4	Marklund *et al.* (1994)	F: CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R: ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT
HTG10	21	Marklund *et al.* (1994)	F: TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT R: CAATTCCCGCCCCACCCCCGGCA
LEX3	Xq	Coogle *et al.* (1996)	F: ACATCTAACCAGTGCTGAGACT R: GAAGGAAAAAAAGGAGGAAGAC
VHL20	30	van Haeringen *et al.* (1994)	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG

Tabela 3 - Variabilidade genética da população analisada para 16 *loci*. N º de alelos *per locus* (*n*); número de indivíduos analisados (N); Heterozigotia observada (H_O); Heterozigotia esperada (H_E); Conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Locus	n	N	Tamanho dos fragmentos (bp)	H_O	H_E	PIC
HMS3	8	2689	146-168	0.793	0.824	0.803
HMS7	8	2688	173-187	0.657	0.697	0.644
HTG4	7	2697	129-141	0.642	0.648	0.592
HTG10	10	2689	91-111	0.691	0.722	0.695
VHL20	10	2692	89-107	0.819	0.827	0.803
ASB2	12	2675	222-254	0.774	0.788	0.762
AHT4	9	2157	146-162	0.758	0.789	0.762
AHT5	8	2100	128-146	0.759	0.792	0.759
HMS6	7	2168	159-169	0.597	0.606	0.570
HTG6	6	993	82-100	0.656	0.682	0.625
HTG7	3	893	120-128	0.191	0.207	0.194
HMS2	6	844	218-238	0.743	0.768	0.731
ASB17	13	761	97-123	0.774	0.828	0.809
HMS1	7	847	176-192	0.551	0.571	0.499
UCDEQ425	9	713	224-244	0.658	0.656	0.594
ASB23	8	900	184-212	0.781	0.797	0.765

Tabela 4 - Valores obtidos para 16 *loci* para o teste do Equilíbrio Hardy-Weinberg (Genepop 3.4) com P <0.05 . Probabilidade (P); *Deficit* de Heterozigotia (F_{IS}).

Locus	P	F_{IS}
HMS3	0,0005	0,0356
HMS7	0,0000	0,0382
HTG4	0,2324	0,0369
HTG10	0,0031	0,0561
VHL20	0,3516	0,0402
ASB2	0,0433	-0,0121
AHT4	0,0014	0,0636
AHT5	0,0004	0,0347
HMS6	0,0119	0,0353
HTG6	0,1658	0,0401
HTG7	0,0236	0,0629
HMS2	0,0375	0,0256
ASB17	0,0000	0,0636
HMS1	0,0555	0,0240
UCDEQ425	0,0137	-0,0208
ASB23	0,0398	0,0084
Multi*locus*	0,0612	0,0340

Tabela 5 - Alelos muito raros e raros *per locus* presentes na população em análise.

Locus	Alelos Muito Raros	Alelos Raros
HMS3	146	158
HMS7	185, 187	173, 175,179
HTG4	137,141	131,135, 139
HTG10	111	91,95,101,105,107
VHL20	91,93	95,103,105
ASB2	222, 224, 238, 242, 250	236,254
AHT4	158,162	154,156,160
AHT5	128,146	138,142
HMS6	163,169	159,161
HTG6	86	94,100
HTG7	--	120,126
HMS2	--	220,228
ASB17	103,107, 117, 123	97, 99, 105, 115, 119
HMS1	176,186	180, 182, 192
UCDEQ425	224, 242, 244	226, 230, 232, 236
ASB23	184, 210	188, 212
TOTAL	31 alelos	44 alelos

Tabela 6 - Alelos muito frequentes *per locus* presentes na população em análise.

Locus	Alelos Muito Frequentes
HMS3	150, 160
HMS7	177,181, 183
HTG4	129, 133
HTG10	103
VHL20	97,99,101
ASB2	246, 248,252
AHT4	146,150
AHT5	132, 134, 136, 140
HMS6	165, 167
HTG6	88, 98
HTG7	128
HMS2	224,226,238
ASB17	101,113, 121
HMS1	178, 184
UCDEQ425	238, 240
ASB23	190,192,194,208
TOTAL	39 alelos

3.2 Seleção de animais a criopreservar

Após a aplicação do algoritmo foram obtidos, relativamente à presença de alelos muito raros, um animal com quatro alelos, dois animais com três alelos, 21 animais com dois alelos e 100 animais com um alelo (Anexo II). Dos 21 animais com dois alelos, existem dois animais (amostras 449 e 450) com os mesmos alelos para os *loci* HMS7 e HTG 4. Os restantes 520, não apresentam alelos muito raros. Após a ordenação das 644 amostras por número decrescente de presença de alelos muito raros, selecionaram-se as amostras que registam maior presença destes alelos. Posteriormente, adicionaram-se 9 amostras com alelos muito raros, das 99 com um único alelo muito raro, que não estavam representados nas amostras anteriores, até perfazer os 31 alelos muito raros detetados na população analisada. Por fim, adicionaram-se mais duas, as únicas amostras que têm alelos muito raros em homozigotia, uma com dois alelos 158 do *locus AHT4* e a outra com dois alelos 176 do *locus HMS1* (Tabela 7).

Relativamente, à presença de alelos muito frequentes, o maior número de alelos detetados *per* animal foi de 26 alelos, num único animal e o mínimo de dois alelos, também, num único animal. Após a ordenação das 644 amostras por número decrescente de presença de alelos muito frequentes, selecionaram-se as primeiras trinta amostras (Tabela 8).

Tabela 7 - Grupo de 32 amostras de animais portadores de genótipos com alelos muito raros (AMR) numa população de 644 machos reprodutores (*-Alelo presente em homozigotia).

Nº Amostra	Nº de AMR	*Locus*	Alelo	*Locus*	Alelo	*Locus*	Alelo	*Locus*	Alelo
430	4	*ASB2_a*	242	*AHT4_b*	158	*HMS1_a*	176	*UCDEQ425_a*	224
447	3	*HMS3_b*	146	*HMS7_b*	187	*HTG4_b*	137		
587	3	*ASB2_a*	224	*HMS1_a*	176	*UCDEQ425_b*	242		
33	2	*UCDEQ425_b*	244	*ASB23_a*	184				
130	2	*AHT4_b*	162	*UCDEQ425_b*	244				
139	2	*ASB2_a*	224	*UCDEQ425_a*	224				
168	2	*ASB2_a*	242	*UCDEQ425_a*	224				
255	2	*UCDEQ425_b*	244	*ASB23_a*	184				
297	2	*ASB2_a*	242	*AHT4_b*	162				
298	2	*HTG6_a*	86	*ASB17_b*	117				
324	2	*ASB17_b*	107	*HMS1_a*	176				
346	2	*HMS7_b*	185	*UCDEQ425_b*	242				
439	2	*HMS7_b*	187	*AHT4_b*	162				
448	2	*HMS3_b*	146	*HMS7_b*	187				
449	2	*HMS7_b*	187	*HTG4_b*	137				
450	2	*HMS7_b*	187	*HTG4_b*	137				
467	2	*HTG4_b*	137	*ASB23_a*	184				
522	2	*HMS6_a*	163	*UCDEQ425_a*	224				
598	2	*HMS6_b*	163	*ASB17_b*	117				
601	2	*ASB2_a*	238	*ASB17_a*	103				
639	2	*AHT5_b*	146	*ASB17_b*	117				
136	1	*HTG10_b*	111						
290	1	*VHL20_a*	93						
323	1	*VHL20_a*	91						
237	1	*ASB2_b*	250						
105	1	*HMS6_b*	169						
511	1	*HTG4_b*	141						
69	1	*ASB17_b*	123						
376	1	*HMS1_b*	186						
624	1	*ASB23_a*	210						
111	1	*AHT4_a/b*	158*						
510	1	*HMS1_a/b*	176*						

Tabela 8 - Grupo de 30 amostras de animais portadores de genótipos com alelos muito frequentes (AMF) numa população de 644 machos reprodutores.

Nº Amostra	Nº Alelos Muito Frequentes(AMF)	*HMS3mf_a*	*HMS3mf_b*	*HMS7mf_a*	*HMS7mf_b*	*HTG4mf_a*	*HTG4mf_b*	*HTG10mf_a*	*HTG10mf_b*	*VHL20mf_a*	*VHL20mf_b*	*ASB2mf_a*	*ASB2mf_b*	*AHT4mf_a*	*AHT4mf_b*	*AHT5mf_a*	*AHT5mf_b*	*HMS6mf_a*	*HMS6mf_b*	*HTG6mf_a*	*HTG6mf_b*	*HTG7mf_a*	*HTG7mf_b*	*HMS2mf_a*	*HMS2mf_b*	*ASB17mf_a*	*ASB17mf_b*	*HMS1mf_a*	*HMS1mf_b*	*UCDEQ425mf_a*	*UCDEQ425mf_b*	*ASB23mf_a*	*ASB23mf_b*
358	26	0	160	181	183	129	133	103	103	97	99	0	252	0	150	132	140	165	167	0	98	128	128	224	238	101	121	178	184	238	240	190	194
110	23	160	150	183	183	133	0	0	103	99	0	252	252	150	0	132	134	165	167	88	98	128	128	224	226	101	121	178	178	0	240	194	208
260	23	0	0	177	183	129	129	0	103	101	101	0	252	146	146	136	140	165	167	88	98	128	128	224	226	101	113	178	184	238	240	194	0
379	23	0	150	177	183	129	133	0	103	101	0	0	252	150	0	134	140	165	167	0	98	128	128	226	238	113	0	178	184	238	240	0	208
505	23	160	150	0	177	129	0	0	103	97	99	0	252	146	150	136	140	167	167	88	98	128	128	0	224	101	121	184	184	240	0	190	194
528	23	0	160	177	183	129	133	103	103	99	0	0	252	146	146	132	136	165	167	0	98	128	128	224	226	101	113	178	178	238	240	0	208
559	23	0	150	177	183	129	0	103	0	0	97	0	252	146	0	136	140	167	167	88	0	128	128	224	226	101	113	178	184	238	240	190	194
595	23	0	150	181	183	133	133	103	103	99	101	0	252	0	150	132	136	165	165	88	98	128	128	224	224	101	121	178	184	238	240	0	208
83	22	0	150	177	183	133	133	0	103	0	0	252	252	146	146	134	0	165	167	88	98	0	128	224	226	121	121	178	184	238	240	194	208
84	22	0	150	177	183	129	133	103	103	99	101	0	252	146	0	140	140	167	167	98	0	0	128	224	226	101	101	184	184	238	240	194	208
155	22	0	150	177	183	129	133	0	103	99	99	0	0	146	150	132	140	165	167	88	88	128	128	0	0	101	121	178	184	238	240	0	194
228	22	160	160	177	181	0	133	103	103	99	101	0	252	146	150	134	140	0	167	0	88	128	128	0	238	0	113	178	184	238	240	0	194
248	22	0	0	181	183	129	133	0	103	97	99	0	0	146	150	132	0	165	167	88	98	128	128	0	226	0	101	184	0	238	240	190	208
252	22	0	0	177	183	133	133	0	0	99	101	0	252	146	150	134	134	0	167	88	98	128	128	226	238	121	121	178	184	238	240	190	208
272	22	0	160	181	183	129	133	103	103	97	101	0	252	146	0	134	140	165	167	88	88	128	128	226	226	113	113	178	0	238	238	190	194

Nº Amostra	Nº Alelos Muito Frequentes(AMF)	*HMS3mf_a*	*HMS3mf_b*	*HMS7mf_a*	*HMS7mf_b*	*HTG4mf_a*	*HTG4mf_b*	*HTG10mf_a*	*HTG10mf_b*	*VHL20mf_a*	*VHL20mf_b*	*ASB2mf_a*	*ASB2mf_b*	*AHT4mf_a*	*AHT4mf_b*	*AHT5mf_a*	*AHT5mf_b*	*HMS6mf_a*	*HMS6mf_b*	*HTG6mf_a*	*HTG6mf_b*	*HTG7mf_a*	*HTG7mf_b*	*HMS2mf_a*	*HMS2mf_b*	*ASB17mf_a*	*ASB17mf_b*	*HMS1mf_a*	*HMS1mf_b*	*UCDEQ425mf_a*	*UCDEQ425mf_b*	*ASB23mf_a*	*ASB23mf_b*
276	22	0	160	181	183	133	0	0	103	99	101	0	252	146	0	132	136	167	167	88	98	0	128	0	226	101	113	178	184	238	238	0	208
303	22	0	150	177	177	129	133	103	0	99	0	0	0	146	0	134	140	165	167	88	98	128	128	226	226	101	121	184	0	238	240	194	208
370	22	0	150	181	183	129	133	0	103	97	101	252	252	146	0	132	140	0	167	88	88	0	128	224	226	0	113	178	184	238	240	0	0
387	22	0	160	183	183	129	133	0	103	99	101	0	252	146	0	132	140	165	167	88	98	128	128	224	226	0	113	184	0	238	238	190	190
488	22	0	160	0	177	129	133	0	103	99	99	0	252	146	0	132	0	165	167	88	98	128	128	226	238	101	101	184	184	238	240	194	208
501	22	160	160	181	183	133	133	103	0	99	101	0	252	146	146	132	140	167	167	88	88	128	128	238	238	101	113	178	184	238	240	0	194
568	22	0	0	177	183	129	133	0	0	0	99	0	0	146	0	134	140	165	167	88	98	128	128	224	238	101	121	178	184	240	240	194	208
637	22	0	0	177	183	129	133	103	0	97	101	0	252	146	146	134	136	0	167	88	98	128	128	0	224	101	121	184	184	238	240	194	194
7	21	160	150	183	183	129	129	0	103	97	0	0	0	146	0	132	140	167	167	88	88	128	128	224	238	101	0	178	184	238	240	194	208
56	21	160	150	0	177	0	133	0	0	97	101	0	252	146	0	134	140	0	167	0	98	128	128	224	224	101	113	178	184	238	240	190	190
68	21	0	0	177	183	129	133	0	103	101	101	0	252	146	146	132	0	0	167	0	98	0	128	226	238	0	121	178	184	238	240	190	208
73	21	0	0	177	177	129	129	103	0	97	101	252	252	150	0	134	140	167	167	0	88	128	128	226	238	101	121	178	184	0	240	194	208
102	21	0	150	177	177	129	133	103	0	99	99	0	252	146	150	134	0	167	167	88	88	128	128	224	238	101	101	178	184	240	240	190	194
104	21	0	160	177	177	129	0	0	0	97	99	0	252	146	0	134	136	165	167	0	98	128	128	0	226	101	113	178	184	0	240	190	194
117	21	0	160	177	0	129	0	0	103	97	0	0	252	146	150	134	136	167	167	0	98	128	128	224	226	101	0	178	178	238	240	190	208

4 Discussão e Conclusão

A unidade biológica para a conservação em animais domésticos é a raça e obter informação para marcadores moleculares permite avaliar a sua diversidade genética para a analisar numa perspetiva conservacionista (Solis *et al*. 2005).

Neste estudo, realizou-se a análise genética através de marcadores moleculares, mais especificamente microssatélites, a um grupo de machos reprodutores, garanhões, da raça Lusitana, que constitui a raça autóctone portuguesa com maior relevância económica, em Portugal. A vantagem de se utilizar um painel de marcadores recomendados pela *Internacional Society for Animal Genetics* (ISAG), é a de permitir comparar os dados obtidos, neste estudo, com outros realizados quer para a raça Lusitana quer para outras raças. No entanto, os valores de variabilidade encontrados, de acordo com Solis (2005), devem ser sempre analisados com precaução, pois estes microssatélites são selecionados de acordo com o seu elevado polimorfismo.

O facto da amostra utilizada ser apenas constituída por indivíduos do sexo masculino, não é limitativo, pois os microssatélites estudados estão no genoma autossómico.

A análise genética da população de machos reprodutores revelou uma heterozigotia média esperada (*He*) de 70,01% para os *loci* analisados e uma heterozigotia média observada (*Ho*) de 67,78%. O valor de *Ho* encontrado está acima do valor médio de 65% estimado em Solis *et al*. (2005) para as raças Americanas e Europeias, apesar do valor apresentado se referir somente à diversidade genética de machos da raça Lusitana e não à diversidade da raça Lusitana, como um todo. O valor de *Ho* encontrado para a população de machos analisados é, curiosamente, muito semelhante ao encontrado em estudos anteriores da raça Lusitana (e.g. Luís *et al.* 2007b; Vicente 2015) que revelaram uma diversidade genética elevada, similar à observada na maioria das outras raças equinas.

Observou-se, também, um défice de heterozigotas de 3,4% para a maioria dos *loci*, valor que se encontra dentro dos valores médios (1-4%) registados para outras raças equinas (Cañon *et al*. 2000).

Assim, como já verificado em estudos anteriores, a análise de uma população de machos, vem mostrar que a raça Lusitana não parece apresentar um perigo imediato no seu estado de conservação, apesar da utilização de um reduzido número de reprodutores machos. Pese embora, a pressão de seleção nos machos seja muito maior, devido às diferentes taxas reprodutivas nos dois sexos e as fêmeas não possuírem, regra geral, outra utilização para além da reprodução (Costa Ferreira & Oom 1989), este resultado vai ao encontro do que é referido por Bailey & Binns (1998): a diversidade genética tem sido mantida na maioria das raças devido ao elevado número de éguas utilizadas como fundadoras.

No entanto, detetou-se um desvio significativo relativamente ao equilíbrio de HWE para a maioria dos microssatélites analisados, o que poderá dever-se a um efeito de sub-estruturação populacional, resultante do facto de terem sido analisadas amostras pertencentes a machos provenientes, muito provavelmente, de diferentes populações que estarão sujeitas a diferentes estratégias de seleção.

Neste estudo, a possibilidade de ocorrência de alelos nulos, que não tenham amplificado no PCR e que tenham sido analisados como "falsos" homozigotos, é muito baixa pois todos os animais foram submetidos a testes de paternidade, onde as falsas homozigotias são detetadas e corrigidas.

Tendo em conta, que a caracterização genética de uma população pode ser realizada por análise demográfica, resultando da informação genealógica ou por marcadores genéticos de uma amostra representativa da população (Toro *et al*. 2011), constata-se que na raça Lusitana, parece existir uma baixa correlação entre estes dois indicadores (Vicente 2015). Vicente (2015) pondera que uma das razões para a baixa correlação entre estes dois indicadores, em termos de diversidade genética, seja o número modesto de marcadores moleculares analisados no estudo que realizou, entre seis a nove microssatélites, apesar de realçar a grandeza da amostra (superior a 19000 animais) genotipados, também, no LGM de Alter, entre 1998 e 2007. No entanto, no presente estudo, a análise genética da população de machos reprodutores nascidos entre 1985 e 2010, recorrendo a 16 microssatélites, indica também uma elevada diversidade genética. A baixa correlação em termos de diversidade genética através da análise demográfica e de marcadores moleculares deve-se, provavelmente, a estes marcadores serem muito polimórficos e neutros às pressões de seleção, apesar de sensíveis ao efeito gargalo (Estoup *et al.* 1998). Não obstante, a combinação da análise de dados genealógicos e de marcadores moleculares, para inferir a estrutura e a diversidade genética de uma população, pode ser uma estratégia útil no sentido de promover a gestão e conservação dos recursos genéticos animais (Luís *et al*. 2007b; Vicente 2015) e seria importante que fossem realizados mais estudos neste sentido.

Como um dos principais objetivos dos Bancos de Genes é o de conservar o máximo de variabilidade alélica e génica possível (ERFP 2003), criopreservar material genético pertencente a animais portadores de alelos muito raros, detetados em zonas não codificantes, cumpre o paradigma de conservar o máximo da variabilidade existente numa determinada raça. É sabido, que a seleção natural tende a eliminar determinados alelos por estarem, muitas vezes, associados a uma reduzida viabilidade ou fertilidade do seu portador, dentro das condições de subsistência da população, tornando-se esses alelos cada vez mais raros. No entanto, em condições de seleção artificial, o fundo genético é alterado de acordo com a resposta fenotípica pretendida, podendo conduzir a perdas alélicas que numa população natural poderiam ser importantes. Assim, sabendo que, apesar da diversidade genética na raça Lusitana não ser reduzida, se utiliza um pequeno

número de garanhões, a preservação de sémen de animais portadores de alelos muito raros, poderá salvaguardar a sua irremediável perda da população.

Neste estudo, a distinção entre as classes de frequências dos alelos definidos como muito raros, raros, frequentes e muito frequentes, foi arbitrária, pelo que o algoritmo desenvolvido que permitiu a seleção de reprodutores com alelos muito raros e muito frequentes foi feito com base nesta arbitrariedade. Este trabalho pretende, apenas, lançar a discussão sobre a pertinência de se selecionarem indivíduos de acordo com a presença de alelos muito raros e/ou muito frequentes para Banco de Genes. Se, eventualmente, houver necessidade, no futuro, de modificar as decisões na definição do que é muito raro, raro, frequente ou muito frequente, bastará aferir o algoritmo. No entanto, a ferramenta está criada ficando disponível para este efeito.

Dos 32 animais portadores de alelos muito raros selecionados, 30 são portadores desses alelos em heterozigotia, o que está de acordo com o esperado uma vez que segundo Frankham *et al*. (2002), geralmente, quando um alelo é raro encontra-se em heterozigotia, quando é frequente, em homozigotia. Assim, caso se pretenda "refrescar" a raça através da introdução destes alelos muito raros, dever-se-ão inseminar éguas que, também, sejam portadoras desses mesmos alelos de forma a promover a sua transmissão à descendência. Destes 32 animais, dois têm os mesmos alelos para os mesmos *loci* HMS7 e HTG4, no entanto como têm alelos distintos para outros *loci*, optou-se por selecionar ambos.

Relativamente, ao primeiro animal selecionado com quatro alelos muito raros, importará referir que, curiosamente, também, é portador de mais quatro alelos raros, o que lhe concede um estatuto de raridade, conferindo-lhe um elevado interesse genético.

A crioconservação de 30 animais selecionados de acordo com a presença de alelos muito frequentes, poderá contribuir para se iniciar um procedimento que acautele a salvaguarda da variabilidade da raça, caso se verifique uma redução drástica do seu efetivo e/ou se ocorrerem problemas genéticos como, por exemplo, o aumento da frequência de genes deletérios na população (ERFP 2003).

Atualmente, o Banco Português de Germoplasma Animal, no que concerne a equinos, apenas armazena réplicas de DNA (Vicente 2015). Embora o DNA possa ser utilizado para transferência de genes, este processo requer técnicas muito complicadas e dispendiosas. Assim, o DNA não é útil para ajudar a restaurar determinadas raças. O armazenamento de DNA tem interesse para fins de investigação, para dar suporte a decisões no âmbito da conservação, para identificar a estrutura genética intra e inter populacional e para caracterizar e identificar os efeitos de determinados genes (ERFP 2003). Assim, torna-se essencial, no caso da raça Lusitana, complementar o trabalho que já está feito, em termos de preservação do DNA, com a crioconservação de oócitos, sémen e/ou embriões de equinos. De salientar que, qualquer que seja o material a crioconservar, este processo deverá ser sempre realizado em duplicado e em locais distintos de forma a reduzir riscos de perda em caso de catástrofe (ERFP 2003).

De referir, ainda, que a seleção de animais foi baseada, exclusivamente, nos genótipos, não tendo em conta as possíveis relações de parentesco. Assim, com a informação genealógica disponível, devem-se excluir os genótipos de animais co-ancestrais. A mesma informação poderá ser utilizada para selecionar animais de linhas fundadoras, *i.e*. genótipos originais para criopreservação, principalmente os que menos têm contribuído para o *gene pool* da população.

De uma forma geral, a crioconservação encontra-se subvalorizada devendo ser dada uma maior ênfase a esta forma de conservação, até porque os avanços tecnológicos, quer na forma de criopreservar, quer na reprodução assistida, assim o permitem, sendo possível dar um forte contributo em programas de conservação (ERFP 2003).

5 Referências Bibliográficas

Angers B., Estoup A., Jarne P. (2000) Microsatellites size homoplasy, SSCP, and population structure: a case study in the freshwater snail Bulinus truncatus. *Molecular Biology and Evolution* 17: 1926–1932.

Angers B., Bernatchez L (1997) Complex evolution of a salmonid microsatellite *locus* and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution* 14: 230–238.

Amos W., Sawcer S.J., Feakes R.W. (1996) Microsatellite show mutations bias and heterozygote instability. *Nature Genetics* 13: 390-391.

Andrade R. (1954) *Alredor del Caballo Español*. Colección de Estúdios, Lisboa.

APSL (2010) *Studbook Regulation*. Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Puro-sangue Lusitano. Cascais, Portugal.

Aranguren-Méndez J. A., Román-Bravo R., Isea W., Villasmil Y., Jordana J. (2005) Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review. *Archivos Latinoamericanos de Production Animal* 13: 30-42

Armour J. A., Schlötterer C., Pemberton J. (1994) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: Schierwater B, Streit B, Wagner G, DeSalle R. (eds), Molecular Approaches to Ecology and Evolution, 203-214. Birkhaus Verlag, BaselNeuman, S. Gobert y A. J. Jeffreys (1994) Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3: 599-605.

Barker J.S.F. (1999) Conservation of livestock breed diversity. *AGRI* 25: 33-43.

Beebee T., Graham R. (2004) *An Introdution to Molecular Ecology*. Oxford University Press.

Binns M. M., Holmes N.G., Holliman A., Scott A. (1995) Identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in Thoroughbred parentage testing. *British Veterinary Journal* 151: 9-15.

Boettcher P. J., Tixier –Boichard M., Toro M.A., Simianer H. , Eding H., Gandini G., Joost S., Garcia D., Coolli L., Ajmone-Marsan P., GLOBALDIV Consortium (2010) Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics* 41: 64-77

Boichard D., Maignal L., Verrier E. (1997) The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genetics Selection Evolution* 29: 5-23

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R.W. (1980) Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.

Bowling A.T., Ruvinsky A. (2000) Genetic aspects of domestication, breeds and their origins. In: Bowling A.T., Ruvinsky A. *The Genetics of the Horse* 25-52.

Bozkurt Y. (2011) Cryopreservation and Aquaculture. Proceedings of 8 th Global Conference on The Conservation of Animal Genetic Resources. October 4-8, 2011, Turkey, 389-392.

Breen M., Lingren G., Binns M.M. (1997) Genetic and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 8: 267-273.

Bruford M.W., Bradley D.G., Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature Reviews Genetics* 4: 900-910.

Cañon J., Dunner S. (1995) Conservacion de recursos geneticos animales. In Alvares, J., Alvarez, A., Jauregui, J. (Ed.) *Asturcones*, Caja de Asturias.

Cañon J., Checa M.L., Carleos C., Veja-Pla J.L., Vallejo M., Dunner S. (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 31: 39-48

CBD. Convention on Biological Diversity (Rio de Janeiro, 1992). www.biodiv.org/ Acedido Out 20, 2015.

Clutton-Brock, J. (1999) *A Natural History of Domesticated Mammals*. Cambridge University Press, Cambridge.

Coogle L., Reid R., Bailey E. (1997) Equine dinucleotide repeat loci LEX034-LEX048. *Animal Genetics* 28: 309

Costa Ferreira J., Oom M.M. (1989) *Consanguinidade na raça Lusitana*. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias Vol. LXXXIV 490: 77-89.

Crow J.F., Kimura M. (1970) *An Introduction to Population Genetics Theory* (eds Harper, Row). New-York, USA.

Danchin-Burge C., Bibé B., Planchenault D. (2002) La cryobanque nationale : mise en place d'une cryocollection patrimoniale des races d'animaux d'élevage. 4ème colloque du BRG, La Châtre (France), 14-16 octobre 2002, Recueil des résumés 111-113

Dawson R. J. G., Gibbs H. L., Hobson K. A., Yezerinac. S. M. (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, Dendroica petechia the yellow warbler, and their use in population studies. *Heredity* 79: 506-514.

Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M., Slatkin M., Freimer N.B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat *loci* in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 91: 3166–3170.

Double M.C., Cockburn A., Barry S.C., Smouse P.E. (1997) Exclusion probabilities for single-*locus* paternity analysis when related males compete for mates. *Molecular Ecology* 6: 1155-1166.

Dovc P., Susnik S., Snoj A. (2004) Experience from Lippizan horse and salmonid species endemic to the Adriatic river system. Examples for the application of molecular markers for preservation of biodiversity and management of animal genetic resources. *Journal of Biotechnology* 113: 43-53.

Eisely L.C. (1943) Archaeological observations on the problem of post-glacial extinction. *American Antiquity* 8: 209-217.

Eisen J. A. (1999). Mechanistic basis for microsatellite instability. In D. B. Goldstein, C. Schlötterer (Ed.) Microsatellites: *Evolution and Applications*. Oxford University Press. 34-48.

Eggleston-Stott M., DelValle A., Bautista M., Dileanis S., Wictum E., Bowling A.T. (1997) Nine equine dinucleotide repeat at microsatellite *loci UCDEQ136*, *UCDEQ405*, *UCDEQ412*, *UCDEQ425*, *UCDEQ437*, *UCDEQ467*, *UCDEQ487*, *UCDEQ502* and *UCDEQ505*. *Animal Genetics* 28: 371.

Ellegren H., Johansson M., Sandberg K., Anderson L. (1992) Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics* 23: 133-142.

ERFP (2003) *Guidelines for the Constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals* (Edited by Hiemstra, S.J.) Publication No. 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources, the Netherlands.

Bailey E., Binns M.M. (1998) The Horse Gene Map. *ILAR Journal* 39: 171-176

Estoup A., Tailliez C., Cornuet J-M., Solignac M. (1995) Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, Apis mellifera and Bombus terrestris (Apidae). *Molecular Biology and Evolution* 12: 1074–1084.

Estoup A., Rousset F., Michalakis Y.,Cornuet J.-M., Adriamanga M., Guyomard R. (1998). Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (Salmo trutta). *Molecular Ecology* 7: 339–353.

Estoup A., Jarne P., Cornuet J. M. (2002) Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.

FAO (2006) *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic Resources*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2006.

FAO (2007) *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2007.

FAO (2010) *Draft Guidelines for the Cryoconservation of Animal Genetics Resources*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2010.

Frankham R. (1995) Conservation genetics. *Annual Reviews of Genetics* 29: 305-327.

Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.

Garza J.C., Freimer N.B. (1996) Homoplasy for size at microsatellite loci in humans and chimpanzees. *Genome Research* 6: 211–217.

Goldstein B.D., C. Schlötterer (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.

Gonzaga P.G. (2004) *A History of the Horse: The Iberian Horse From Ice Age to Antiquity*. JA Allen & Co. Ltd, London.

Guérin G., Bertaud M., Amigues Y. (1994) Characterization of seven new horse microsatellites: *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS5*, *HMS6*, *HMS7* and *HMS8*. *Animal Genetics* 25: 63.

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

Hall S.J.G., Bradley D.G. (1995) Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 267-270.

Hancock J.M. (1999) Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In Goldstein D. B., Schlotterer C. (Ed.) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, 1-9.

Hedrick P.W., Miller P.S. (1992) Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications* 2: 30-46.

Heitor F. (2007) *Study of Social Relationships in Groups of Sorraia Horses: Determinants and Consequences*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

Hickman C. P., Roberts L. S., Larson A. (2001) *Integrated Principles of Zoology* (11th edition). McGraw Hill.

Hiemstra S.J., van der Lende T., Woelders H. (2006) *The Role of Biotechnology in Exploring and Protecting Agricultural Genetic* (FAO Edition) 3: 5-15

Horta A., Gama L.T., Canas Simões J.P., Afonso F. (2012). Portuguese Animal Germoplasm Bank-BPGA. Workshop on national legal and institutional arrangements for ex situ conservation of animal genetic resources. Zagreb, Croatia.

INIAV-Instituto Nacional de Investigação Agrária
http://www.iniav.pt/ Acedido Out 20, 2015.

Jarne P., Lagoda J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424–429.

Jansen T., Forster P., Levine M.A., Oelke H., Hurles M., Renfrew C., Weber J., Olek K. (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 99: 10905–10910.

Kimura M., Crow J.F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725–738.

Kimura M., Ohta T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 2868–2872.

Labate J. (2000) Software for population genetic analyses of molecular marker data. *Crop Science* 40: 1521-1528

Levine M.A. (2002) Domestication, breed diversification and early history of the horse. In: McDonnell, S., Mills, D. (Eds.), *Horse Behavior and Welfare*. A Dorothy Russell Havemeyer Foundation Workshop, June 13-16, Hólar, Iceland, 64-69.

Lopes M.S., Mendonça D., Cymbron T., Valera M., Costa-Ferreira J., da Câmara Machado A. (2005) The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. *Animal Genetics* 36: 196–202.

Lopes M.S. (2011) *Molecular Tools for the Characterisation of the Lusitano Horse. Tese de Doutoramento*, Universidade dos Açores.

Luís C., Gothran E.G., Oom M.M. (2002b) Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genetics and Molecular Biology* 25: 131-134.

Luís C., Bastos-Silveira C., Cothran E.G., Oom M.M. (2006) Iberian origins of New World horse breeds. *Journal of Heredity* 97: 107-113.

Luís C., Juras R., Oom M., Cothran E. (2007b) Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite *loci* variation. *Animal Genetics* 38: 20–27.

Mayr E., Ashlock P.D. (1991) *Principles of systematics Zoology* (2nd edition). McGraw-Hill

Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K., Andersson L. (1994) Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25: 19-23.

Marshall T.C., Slate J., Kruuk E.B., Pemberton M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Mazur P. (1985). Basic concepts in freezing cells. 91–111 in Proc. First Int. Conf. on Deep Freezing of Boar Semen (Edition Agricultural University Uppsala), Sweden.

Mills D.S., Nankervis K.J. (1999) *Equine Behaviour: Principles and Practice*. Blackwell Science Publications, Oxford.

Monteiro J. (1983) *O Cavalo Lusitano: contributo para o seu estudo*. Boletim Pecuário. Ano XLIX: 3-205

Montgomery G.W. Sise J.A. (1990) Extraction of DNA from sheep white blood cells. *New Zealand Journal of Agriculture Research* 33:437-441.

Morel M.D. (1999) *Production of Spermatozoa*. Equine Artificial Insemination IV, Cabi Publishing.

Nei M., Li W. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA 76: 5269-5273.

Neuman K., Wetton J.H. (1996) Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow, Passer domesticus. *Molecular Ecology*. 5: 307-309.

Oom M.M. (1992) *O Cavalo Lusitano. Uma Raça em Recuperação*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

Petersen J.L., Mickelson J.R., Cothran E.G., Andersson L., Axelsson J., Bailey E., Bannasch D., Binns M., Borges A., Brama P., da Câmara Machado A., Distl O., Felicetti M., Fox-Clipsham L., Graves K.T., Guérin G., Haase B., Hasegawa T., Hemmann K., Hill E., Leeb T., Lindgren G., Lohi H., Lopes M.S., McGivney B.A., Mikko S., Orr N., Penedo M.C.T., Piercy R., Raekallio M., Rieder S., Røed K., Silvestrelli M., Swinburne J., Tozaki T., Vaudin M., Wade C.M., McCue M.E. (2013) Genetic diversity in the modern horse illustrated from genome-wide SNP data. *PLOS ONE* 8(1), e54997.

Pires A.E.G. (2006) *Phylogeny, population structure and genetic diversity of dog in the Iberian Peninsula and North Africa*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

Primack R. (2006) *Essentials of Conservation Biology* (4th edition). Sinauer Associates.

Primmer C.R., Ellergren H. (1998) Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*. 15: 997-1008.

Raymond M., Rousset F. (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

Regateiro F.J. (2003) *Manual de Genética Médica*. Edições Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal.

Rochambeau H., Fournet-Hanocq F., Vu Tien Khang J. (2000) Measuring and managing genetic variability in small populations. *Annales de Zootechnie* 49: 77-93.

Ruane J., Sonnino A. (2007) *Marker-Assisted Selection-current Status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. (FAO Edition) 3: 5-15

Sbisá E., Tanzariello F., Reyes A., Pesole G., Saccone C. (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene* 205: 125-140.

Schlötterer C., Pemberton J. (1994) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. In: Schierwater B, Streit B, Wagner G, DeSalle R (eds). *Molecular Approaches to Ecology and Evolution* 203-214. Birkhaus Verlag, Basel.

Simianer H. (2006) *Use of molecular markers and other information for sampling germplasm to create an animal gene bank* (FAO Edition) 3: 81-89

Solis A., Jugo B.M., Meiaux J.C., Iriondo M., Mazon A.I., Aguirre A.I., Vicario A., Estomba A. (2005) Genetic Diversity Within and Among Four South European Native Horse Breeds Based on Microsatellite DNA Analysis: Implications for Conservation. *Journal of Heredity* 96: 670-678.

Sponenberg D.P. (2000) Genetic resources and their conservation. In: *The Genetics of the Horse* (ed. by A.T. Bowling and A. Ruvinsky), 387-410. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, UK.

Sumers K., Amos W. (1997) Behavioral, ecological and molecular genetics analyses of reproductive strategies in the Amazonian dart-poison frog, Dendrobates ventrimaculatus. *Behavioral Ecology* 8: 260-267

Taylor J.S., Sanny J.S.P., Breden F. (1999) Microsatellite allele size homoplasy in the guppy (Poecilia reticulata). *Journal of Molecular Evolution* 48: 245–247.

Toro M.A., Silió L., Rodriganez J., Rodriguez C., Fernández J. (1999) Optimal use of genetic markers in conservation programmes. *Genetics, Selection and Evolution* 31: 255-261.

Uerpmann H.P. (1995) Domestication of the horse - when, where, and why? In: Le Cheval et les Autres Équidées: Aspects de L'histoire de Leur Insertion Dans les Activités Humaines (ed. by L. Bodson). *Colloques d'histoire des connaissances zoologiques* 6: 15-29.

Van de Goor L.H.P., van Haeringen W.A., Lenstra J.A. (2011) Population Studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics* 42: 627-633.

Van Haeringen H., Bowling A., Stott M., Lenstra J., Zwaagstra K. (1994) A highly polymorphic horse microsatellite *locus*: VHL20. *Animal Genetics* 25: 207.

Vanhala T., Tuiskula-Haavisto M., Elo K., Vilkki J., Maki-Tanila A. (1998) Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science* 77: 783-790.

Verrier E., Danchin-Burge C., Moureaux S., Ollivier L., Tixier-Boichard M., Maignel M.J., Bidanel J.P., Clement F. (2003) *What should be preserved: genetic goals and collection protocols for the French National Cryobank*. Pages 79–89 in Workshop on Cryopreservation of Anim. Genet. Res. Eur. D. Planchenault, ed. Bureau des Resources Génétiques, Paris, France.

Viard F., Franck P., Dubois M-P., Estoup A., Jarne P. (1998) Variation of microsatellite size homoplasy across electromorphs, loci and populations in three invertebrate species. *Journal of Molecular Evolution* 47: 42–51.

Vicente A.A., Carolino N., Gama L.T. (2009) Demographic parameters in Lusitano horse. *Archivos de Zootecnia*. 58: 501–504.

Vicente A.A. (2015) *Characterization and selection of the Lusitano horse breed*. Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa.

Vilà C., Leonard J.A., Götherstöm A., Marklund S., Sandberg K., Lindén K., Wayne R.K., Ellegren H. (2001) Widespread origin of domestic horse lineages. *Science* 291: 474–477.

Weber J.L., Wong C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.

Weir B., Cockerham C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Weising K., Fung R.W.M., Keeling D.J., Atkinson R.G., Gardner R.C. (1996) Characterisation of microsatellites from Actinidia chinensis. *Molecular Breeding* 2: 117-131.

Wilmut I., Schnieke A.E., Mcwhir J., Kind A.J., Campbell S. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813

Woelders H., Zuidberg C.A., Sulkers H., Hiemstra S.J. (2004) *Preservation of genetic diversity of farm animals; genebanking of germplasm*. Pages 87–95 in Proc. 20th Sci. Mtg. Eur. Embryo Transfer Assoc. (Association, Européene de Transfert Embryonnaire, AETE), Lyon, France. AETE, Lyon, France.

Woelders H., Zuidberg C.A., Hiemstra S.J. (2006) Animal Genetic Resources Conservation in The Netherlands and Europe: Poultry Perspectiv. *Poultry Science* 85: 216-222

Zabek T., Fornal A. (2009) Evaluation of the 17-Plex STR KIT for Parentage Testing of Polish Coldblood and Hucul Horses. *Annual Animal Science* 4: 363-372

6 Considerações Finais

Seria importante que, no futuro, se realizassem estudos de uma forma mais sistemática no sentido de monitorizar a variabilidade genética das novas gerações do Cavalo Lusitano.

Seria pertinente instituir procedimentos de rotina para criopreservar gâmetas de reprodutores com elevado interesse genético, avaliado quer por análise de marcadores moleculares associados a *loci* neutros, quer por marcadores moleculares associados a *loci* codificantes, responsáveis por caracteres com interesse no âmbito da gestão e conservação da raça.

7 Anexos

Anexo I - Frequências Alélicas

Tabela 9 - Frequência alélica *locus HMS3.*

Locus	Alelos	Frequência
(N=2689)		
HMS3	146	0,001
HMS3	150	0,171
HMS3	158	0,084
HMS3	160	0,301
HMS3	162	0,114
HMS3	164	0,108
HMS3	166	0,110
HMS3	168	0,110

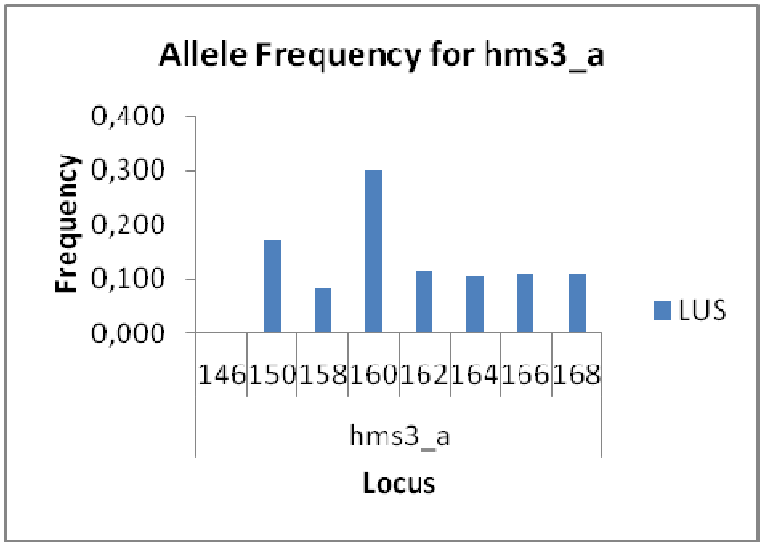

Figura 5 - Frequência alélica *locus HMS3*.

Tabela 10 - Frequência alélica *locus HMS7*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2688)		
HMS7	173	0,020
HMS7	175	0,020
HMS7	177	0,329
HMS7	179	0,064
HMS7	181	0,157
HMS7	183	0,407
HMS7	185	0,001
HMS7	187	0,001

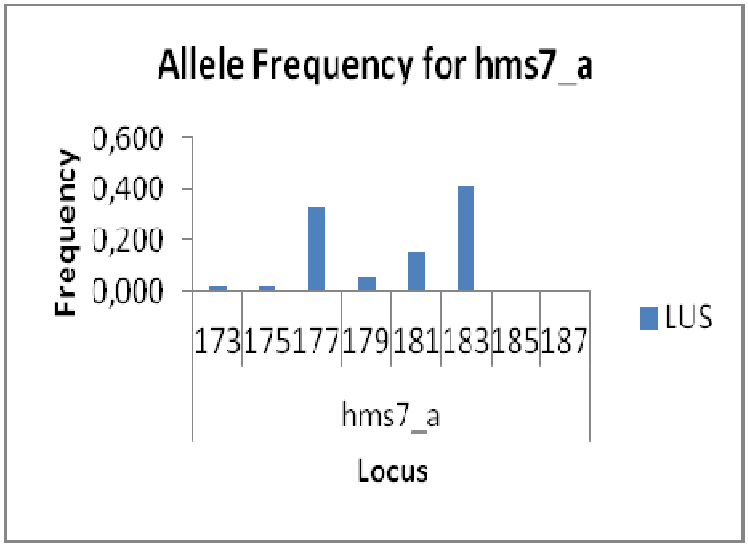

Figura 6 - Frequência alélica *locus HMS7*.

Tabela 11 - Frequência alélica *locus HTG4*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2697)		
HTG4	129	0,303
HTG4	131	0,076
HTG4	133	0,495
HTG4	135	0,095
HTG4	137	0,004
HTG4	139	0,026
HTG4	141	0,002

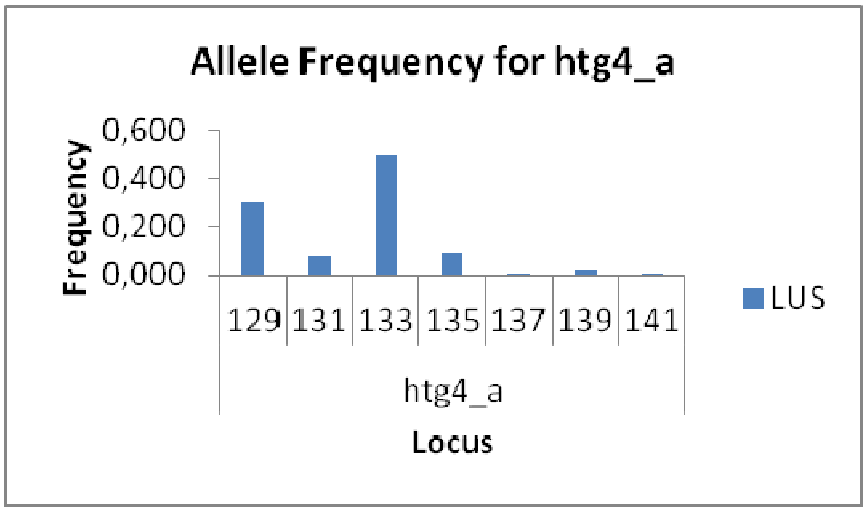

Figura 7 - Frequência alélica *locus HTG4*.

Tabela 12 - Frequência alélica *locus HTG10*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2689)		
HTG10	91	0,047
HTG10	95	0,073
HTG10	97	0,121
HTG10	99	0,100
HTG10	101	0,011
HTG10	103	0,472
HTG10	105	0,011
HTG10	107	0,011
HTG10	109	0,150
HTG10	111	0,003

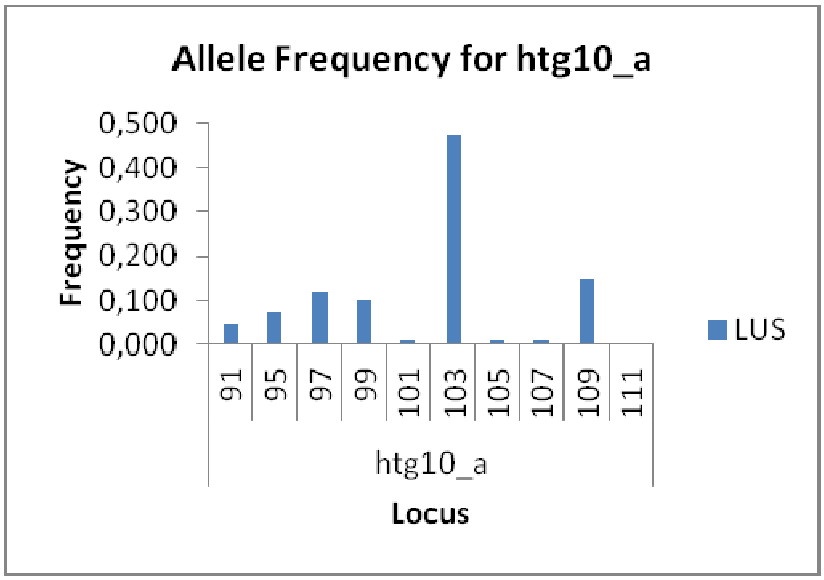

Figura 8 - Frequência alélica *locus HTG10*.

Tabela 13 - Frequência alélica *locus VHL20*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2692)		
VHL20	89	0,137
VHL20	91	0,001
VHL20	93	0,003
VHL20	95	0,018
VHL20	97	0,190
VHL20	99	0,212
VHL20	101	0,225
VHL20	103	0,031
VHL20	105	0,043
VHL20	107	0,139

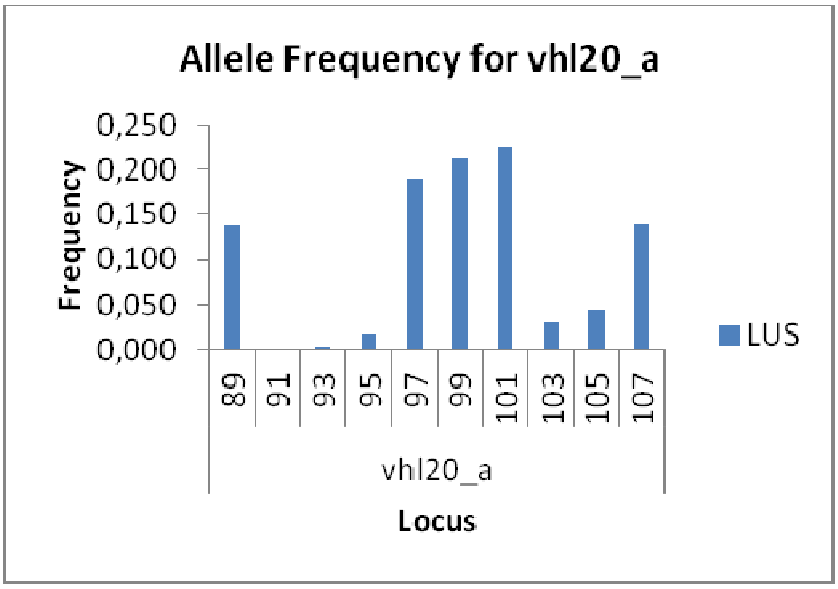

Figura 9 - Frequência alélica *locus VHL20*.

Tabela 14 - Frequência alélica *locus ASB2*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2675)		
ASB2	222	0,000
ASB2	224	0,003
ASB2	236	0,044
ASB2	238	0,005
ASB2	240	0,114
ASB2	242	0,005
ASB2	244	0,121
ASB2	246	0,163
ASB2	248	0,155
ASB2	250	0,000
ASB2	252	0,362
ASB2	254	0,027

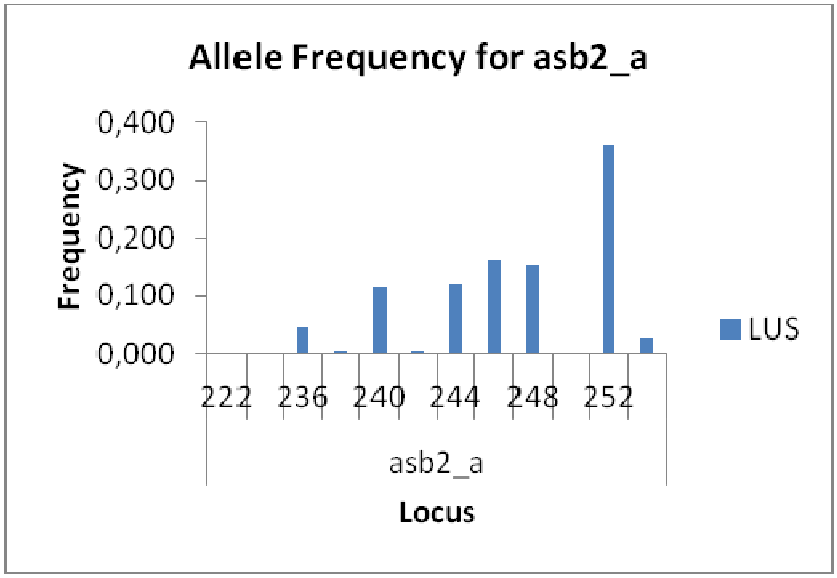

Figura 10 - Frequência alélica *locus ASB2*.

Tabela 15 - Frequência alélica *locus AHT4.*

Locus	Alelos	Frequência
N=2157)		
AHT4	146	0,344
AHT4	148	0,142
AHT4	150	0,220
AHT4	152	0,111
AHT4	154	0,033
AHT4	156	0,057
AHT4	158	0,004
AHT4	160	0,085
AHT4	162	0,004

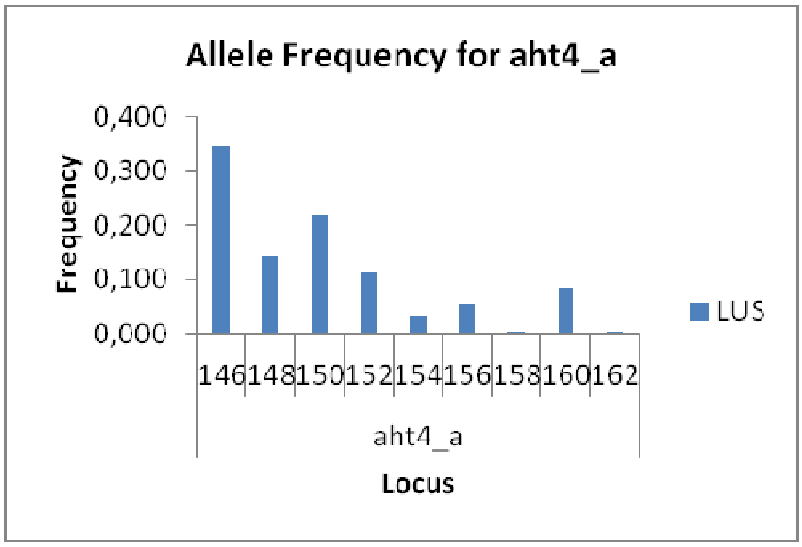

Figura 11 - Frequência alélica *locus AHT4*.

Tabela 16 - Frequência alélica *locus AHT5*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2100)		
AHT5	128	0,001
AHT5	132	0,200
AHT5	134	0,266
AHT5	136	0,184
AHT5	138	0,063
AHT5	140	0,240
AHT5	142	0,043
AHT5	146	0,002

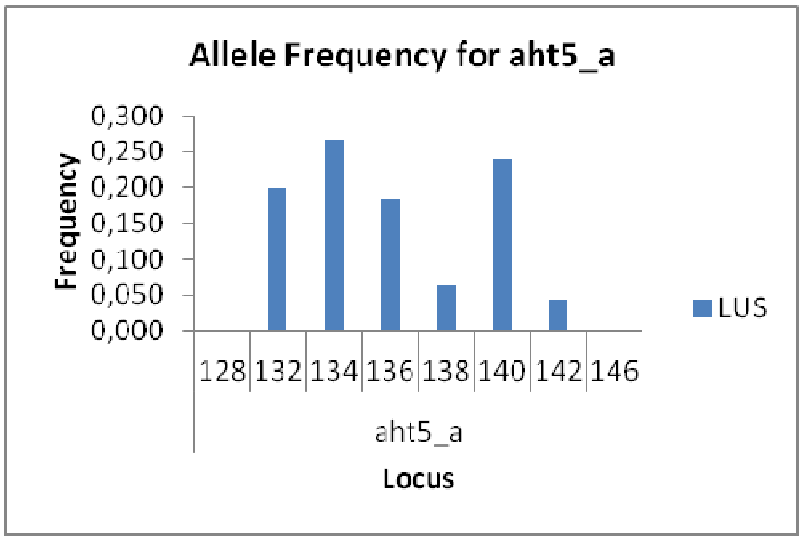

Figura 12 - Frequência alélica *locus AHT5.*

Tabela 17 - Frequência alélica *locus HMS6*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=2168)		
HMS6	157	0,095
HMS6	159	0,091
HMS6	161	0,048
HMS6	163	0,002
HMS6	165	0,177
HMS6	167	0,586
HMS6	169	0,001

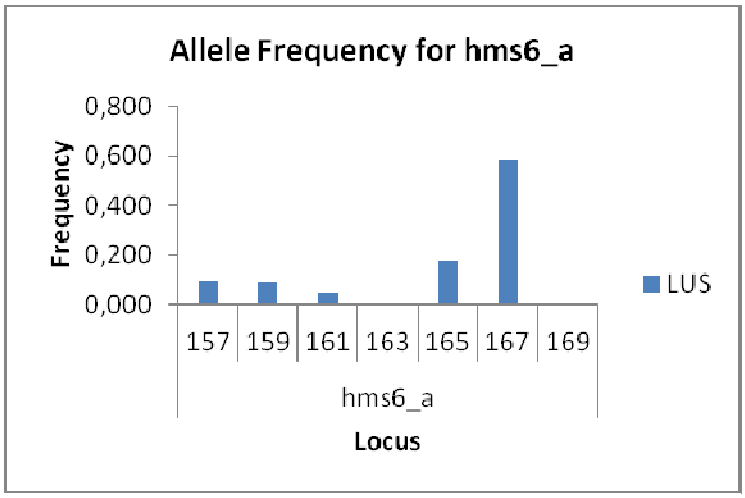

Figura 13 - Frequência alélica *locus HMS6*.

Tabela 18 - Frequência alélica *locus HTG6*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=993)		
HTG6	82	0,253
HTG6	86	0,001
HTG6	88	0,440
HTG6	94	0,029
HTG6	98	0,244
HTG6	100	0,033

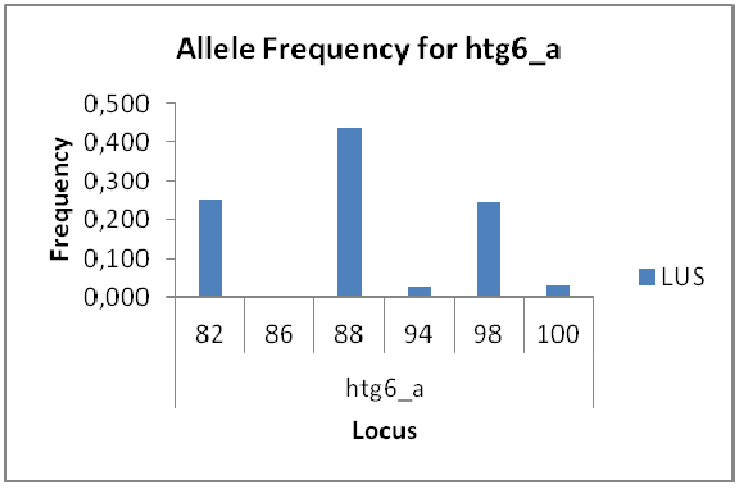

Figura 14 - Frequência alélica *locus HTG6*.

Tabela 19 - Frequência alélica *locus HTG7*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=893)		
HTG7	120	0,088
HTG7	126	0,026
HTG7	128	0,886

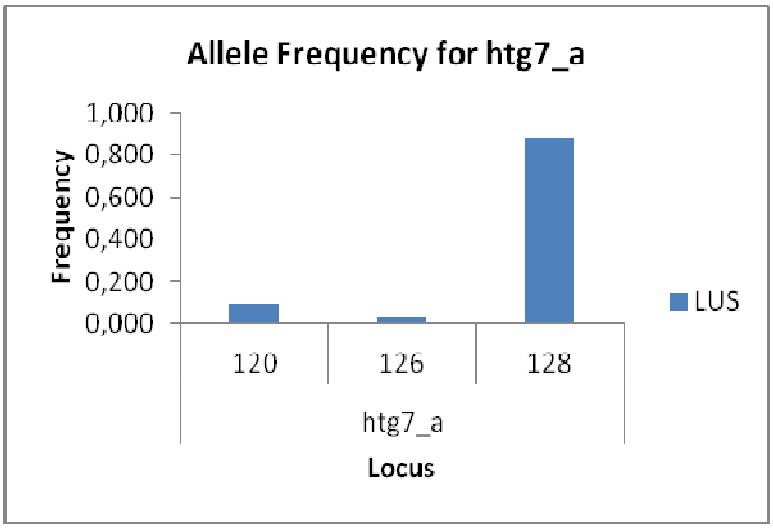

Figura 15 - Frequência alélica *locus HTG7*.

Tabela 20 - Frequência alélica *locus HMS2*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=844)		
HMS2	218	0,184
HMS2	220	0,040
HMS2	224	0,329
HMS2	226	0,252
HMS2	228	0,043
HMS2	238	0,152

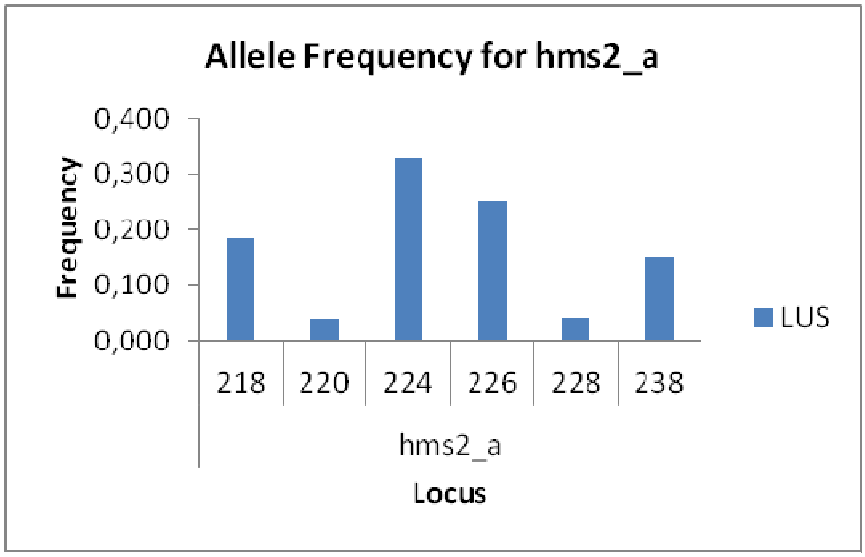

Figura 16 - Frequência alélica *locus HMS2*.

Tabela 21 -Frequência alélica *locus ASB17*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=761)		
ASB17	97	0,080
ASB17	99	0,043
ASB17	101	0,306
ASB17	103	0,009
ASB17	105	0,041
ASB17	107	0,007
ASB17	111	0,126
ASB17	113	0,156
ASB17	115	0,037
ASB17	117	0,007
ASB17	119	0,026
ASB17	121	0,163
ASB17	123	0,001

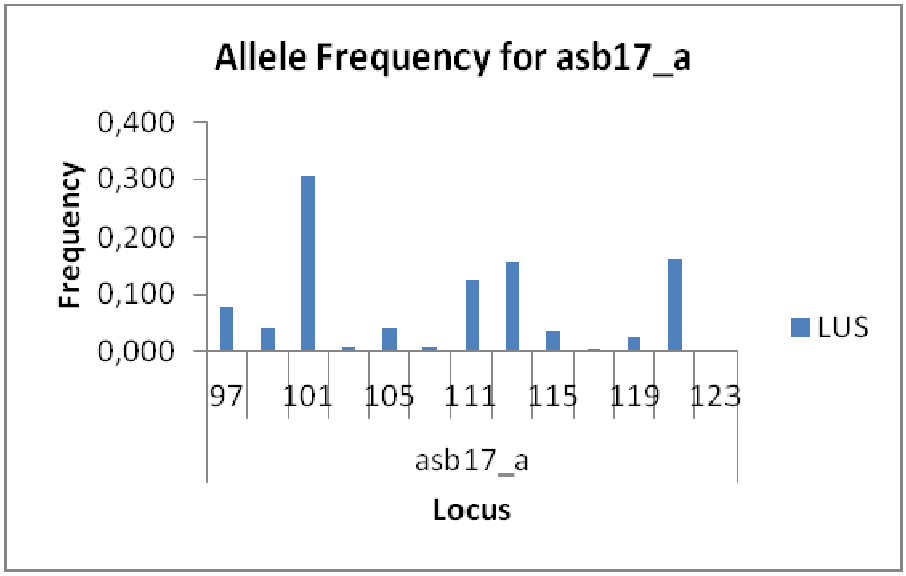

Figura 17 -Frequência alélica *locus ASB17*.

Tabela 22 - Frequência alélica *locus HMS1*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=847)		
HMS1	176	0,006
HMS1	178	0,326
HMS1	180	0,023
HMS1	182	0,012
HMS1	184	0,563
HMS1	186	0,002
HMS1	192	0,067

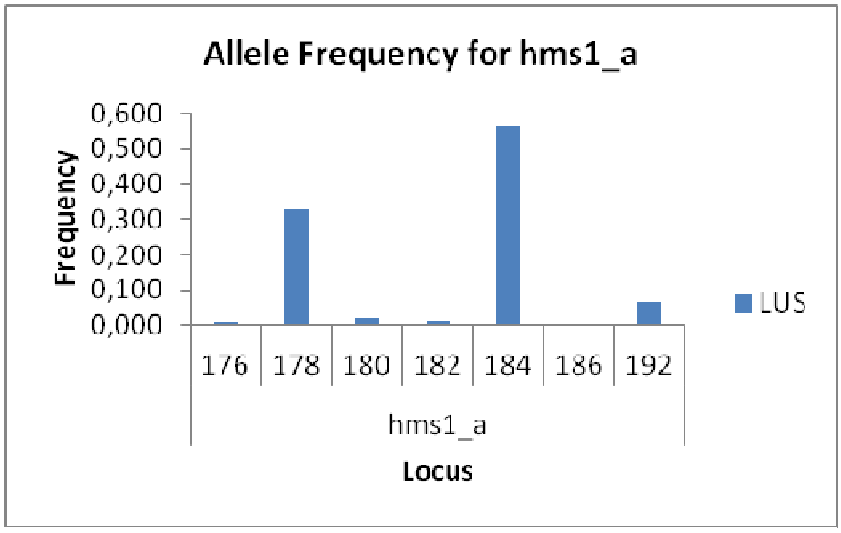

Figura 18 - Frequência alélica *locus HMS1*.

Tabela 23 - Frequência alélica *locus UCDEQ425*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=713)		
UCDEQ425	224	0,009
UCDEQ425	226	0,043
UCDEQ425	230	0,011
UCDEQ425	232	0,081
UCDEQ425	236	0,028
UCDEQ425	238	0,435
UCDEQ425	240	0,381
UCDEQ425	242	0,009
UCDEQ425	244	0,002

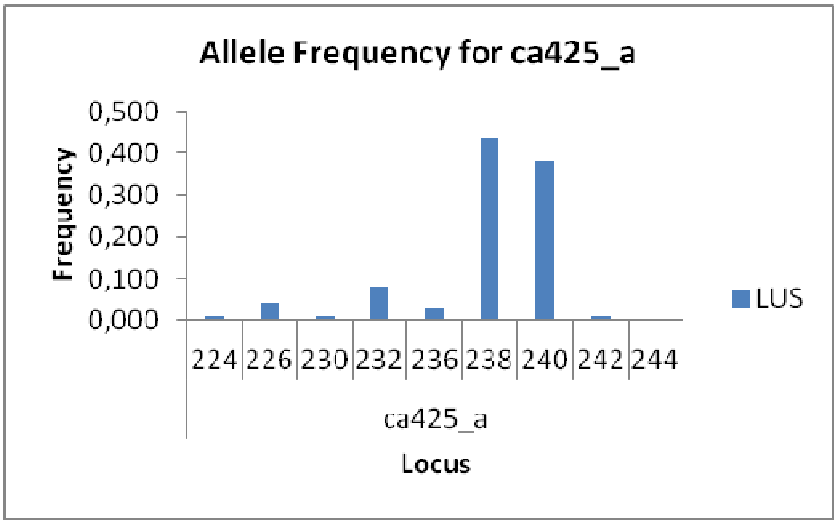

Figura 19 - Frequência alélica *locus UCDEQ425* (*CA425*).

Tabela 24 - Frequência alélica *locus ASB23*.

Locus	Alelos	Frequência
(N=900)		
ASB23	184	0,003
ASB23	188	0,094
ASB23	190	0,237
ASB23	192	0,218
ASB23	194	0,232
ASB23	208	0,191
ASB23	210	0,002
ASB23	212	0,024

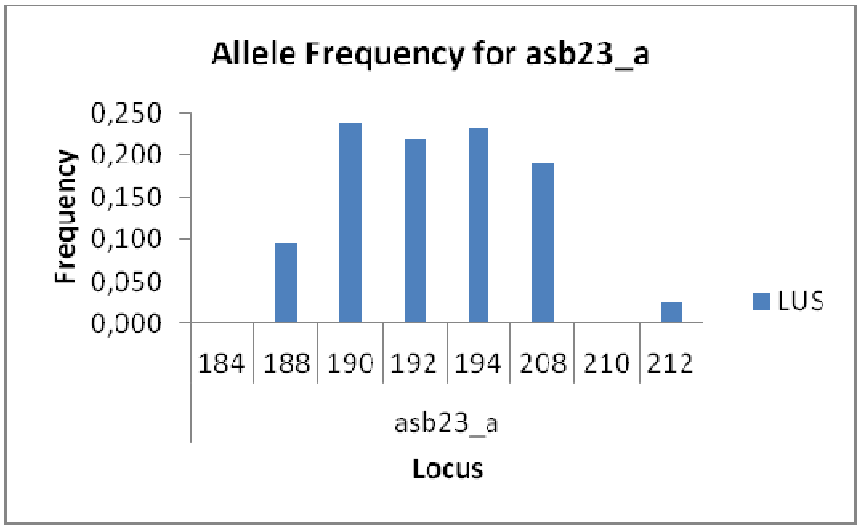

Figura 20 - Frequência alélica *locus ASB23*.

Anexo II - Lista de genótipos de 644 amostras de machos reprodutores alvo de seleção para crioconservação

Tabela 25 - - Lista de genótipos das amostras dos 644 machos reprodutores alvo de seleção para crioconservação.

Nº Amostra	População	Nº Total Alelos	Nº Alelos .Frequentes	Nº Alelos Raros	Nº Alelos Muito Frequentes	Nº Alelos Muito Raros	HMS3_a	HMS3_b	HMS7_a	HMS7_b	HTG4_a	HTG4_b	HTG10_a	HTG10_b	VHL20_a	VHL20_b	ASB2_a	ASB2_b	AHT4_a	AHT4_b	AHT5_a	AHT5_b	HMS6_a	HMS6_b	HTG6_a	HTG6_b	HTG7_a	HTG7_b	HMS2_a	HMS2_b	ASB17_a	ASB17_b	HMS1_a	HMS1_b	UCDEQ425_a	UCDEQ425_b	ASB23_a	ASB23_b
1	LUS	32	16	2	14	0	166	162	177	183	133	133	95	109	99	105	248	248	146	148	132	140	165	167	82	82	128	128	218	226	111	111	184	184	238	238	190	192
2	LUS	32	13	3	16	0	168	160	181	183	133	135	99	109	99	99	246	248	146	152	132	140	167	167	82	88	128	128	218	224	111	111	178	182	226	238	194	208
3	LUS	32	10	3	19	0	166	162	177	183	129	135	103	109	99	107	246	252	146	148	132	134	165	167	88	88	128	128	224	228	111	121	184	184	232	240	194	208
4	LUS	32	9	7	16	0	166	162	181	181	133	133	95	103	95	105	248	248	150	154	132	138	165	165	82	98	120	128	224	226	113	121	182	184	238	240	194	194
5	LUS	32	12	3	17	0	166	162	183	183	133	133	99	103	99	101	246	252	146	146	132	138	167	167	82	88	128	128	226	228	99	121	178	178	238	240	190	192
6	LUS	32	14	1	17	0	162	160	181	181	129	133	103	109	99	107	246	248	150	150	136	140	165	167	82	82	128	128	224	224	111	119	184	184	240	240	190	208
7	LUS	32	9	2	21	0	160	150	183	183	129	129	95	103	97	103	244	246	146	152	132	140	167	167	88	88	128	128	224	238	101	111	178	184	238	240	194	208
8	LUS	32	10	4	18	0	160	150	177	183	129	129	103	103	99	107	248	252	148	160	136	140	159	167	82	98	128	128	224	238	111	119	184	184	226	238	190	192
9	LUS	32	13	1	17	1	164	162	177	183	133	135	103	103	89	97	248	252	148	152	128	140	167	167	88	88	128	128	224	226	101	121	178	178	240	240	190	190
10	LUS	32	16	1	15	0	162	160	181	183	131	133	97	109	99	101	246	246	148	148	132	140	167	167	82	82	128	128	224	224	101	101	184	184	238	238	190	192
11	LUS	32	10	3	19	0	160	150	177	177	133	133	97	107	97	99	236	246	148	150	132	136	167	167	82	88	128	128	226	226	97	121	178	184	238	240	208	208
12	LUS	32	12	7	13	0	166	166	173	175	129	129	103	109	97	105	244	248	152	160	132	140	157	167	88	98	128	128	218	226	119	121	184	192	238	238	188	192
13	LUS	32	13	5	14	0	166	162	175	183	131	133	97	105	105	107	252	252	148	152	134	140	165	165	82	88	128	128	224	238	101	101	184	184	232	240	194	194
14	LUS	32	12	3	17	0	166	160	183	183	133	133	97	103	99	105	248	252	148	150	140	142	157	167	82	82	128	128	224	226	97	101	178	184	240	240	190	192
15	LUS	32	12	2	18	0	166	160	181	183	133	133	103	109	97	101	252	252	146	148	132	132	167	167	82	88	128	128	218	226	99	101	184	192	238	238	190	192
16	LUS	32	10	5	17	0	160	160	183	183	133	133	95	103	101	101	240	252	148	154	134	140	167	167	98	98	120	128	224	226	113	113	178	184	232	232	192	208
17	LUS	32	10	2	20	0	160	160	183	183	133	133	95	103	89	101	240	252	146	148	132	140	159	167	98	98	128	128	226	238	101	113	178	184	238	238	190	190
18	LUS	32	10	5	17	0	168	164	177	177	133	135	97	103	101	107	248	252	154	160	134	136	161	165	82	88	128	128	226	226	101	113	184	192	238	238	190	208
19	LUS	32	9	3	20	0	164	160	183	183	129	133	97	103	101	101	246	252	150	156	132	134	161	165	82	98	120	128	226	238	113	113	178	178	238	238	190	194
20	LUS	32	10	3	19	0	166	166	177	183	129	133	95	109	107	107	244	252	146	150	134	140	161	165	88	98	128	128	224	224	101	115	178	184	238	238	190	190
21	LUS	32	10	4	18	0	166	158	179	183	129	133	99	109	97	107	244	248	146	146	132	134	161	167	88	88	128	128	224	224	113	115	178	184	238	240	190	194
22	LUS	32	9	4	19	0	162	158	183	183	129	133	103	103	97	103	236	248	150	152	134	134	167	167	88	98	128	128	224	224	101	105	178	184	238	240	190	194
23	LUS	32	9	5	17	1	168	166	177	183	129	135	91	103	101	101	252	252	148	150	134	136	167	167	88	88	120	128	224	238	97	103	184	184	232	240	192	208
24	LUS	32	11	4	17	0	160	158	183	183	133	133	99	99	99	107	244	252	146	150	136	138	157	167	82	98	120	128	224	224	99	101	178	178	240	240	190	194
25	LUS	32	8	6	18	0	164	158	177	183	135	135	103	103	99	101	244	252	146	150	134	134	167	167	82	98	128	128	228	228	101	113	178	184	236	240	194	194
26	LUS	32	11	4	17	0	162	160	177	181	131	133	95	109	107	107	236	248	150	152	136	140	167	167	82	98	128	128	218	224	119	121	184	184	238	240	194	208
27	LUS	32	8	4	20	0	160	160	177	177	129	133	103	107	101	105	248	252	146	146	132	132	159	167	82	98	126	128	226	226	121	121	178	184	238	240	190	194
28	LUS	32	10	2	20	0	162	160	177	183	129	133	103	109	97	99	246	252	146	148	132	140	165	167	82	82	128	128	218	218	111	119	178	184	232	240	190	208
29	LUS	32	9	3	20	0	168	160	177	181	129	133	103	105	99	107	244	252	150	150	134	134	167	167	82	88	120	128	226	238	111	121	184	192	238	240	190	192

30	LUS	32	14	3	15	0	162	160	181	181	131	133	97	103	107	107	240	244	146	156	134	136	161	165	82	88	128	128	238	238	101	111	184	184	238	238	190	190
31	LUS	32	14	2	16	0	160	160	177	181	129	133	97	109	89	99	252	252	148	148	134	140	157	167	82	82	126	128	218	238	105	111	184	184	240	240	194	208
32	LUS	32	9	3	20	0	166	160	181	183	129	133	97	109	97	97	252	252	146	148	132	140	159	167	88	98	128	128	224	226	113	113	184	192	232	238	192	194
33	LUS	32	8	6	16	2	166	166	177	183	129	133	91	103	89	99	240	240	152	160	138	140	165	167	88	100	120	128	218	224	101	115	184	184	240	244	184	208
34	LUS	32	11	4	17	0	168	160	179	183	129	133	99	99	101	107	252	252	150	154	134	134	157	157	88	94	128	128	224	226	101	115	178	178	238	240	192	208
35	LUS	32	11	1	20	0	162	160	183	183	133	133	97	103	107	107	246	252	148	150	136	138	165	167	82	88	128	128	226	238	101	101	178	184	238	240	190	194
36	LUS	32	14	3	14	1	166	150	173	177	133	133	99	109	105	107	242	246	148	160	132	132	157	167	82	98	128	128	226	226	113	121	184	184	238	238	190	194
37	LUS	32	9	9	14	0	166	162	177	177	131	135	99	103	97	101	246	246	146	152	132	136	167	167	88	88	126	128	220	226	97	119	180	184	226	240	188	194
38	LUS	32	10	4	18	0	160	160	177	181	131	135	109	109	89	101	244	252	146	146	132	134	167	167	82	88	128	128	218	224	99	113	180	184	238	240	190	194
39	LUS	32	7	4	20	1	162	146	177	183	129	133	103	109	89	101	252	252	146	160	136	142	157	167	82	88	128	128	224	226	99	119	178	184	238	240	190	194
40	LUS	32	8	10	14	0	168	162	173	183	131	135	103	109	97	105	246	248	160	160	134	136	167	167	88	98	120	128	224	228	97	121	184	184	232	240	194	194
41	LUS	32	11	4	16	1	168	158	177	183	133	133	103	111	97	97	240	252	146	150	140	142	157	165	88	88	128	128	220	224	121	121	178	192	240	240	192	192
42	LUS	32	11	3	18	0	162	160	177	177	129	133	99	103	89	95	244	252	152	152	132	142	167	167	88	98	128	128	218	224	97	101	184	184	238	240	190	194
43	LUS	32	12	2	18	0	164	160	177	183	133	133	97	109	99	101	252	252	148	152	132	136	167	167	88	98	128	128	218	224	97	113	184	184	238	240	192	212
44	LUS	32	7	5	20	0	164	162	183	183	129	133	97	103	99	101	236	252	146	150	134	136	159	165	82	88	128	128	224	238	105	115	178	184	236	238	190	192
45	LUS	32	8	5	19	0	160	158	177	183	129	135	103	103	99	101	248	252	150	156	134	134	167	167	88	88	128	128	238	238	113	115	178	192	238	240	194	194
46	LUS	32	11	3	18	0	162	150	177	183	129	129	97	103	101	107	252	252	146	150	136	136	159	167	82	88	128	128	224	224	101	115	184	184	226	238	190	192
47	LUS	32	11	6	15	0	168	158	183	183	133	133	97	101	97	97	248	252	156	160	132	140	161	167	82	88	128	128	218	226	97	113	178	184	238	238	192	194
48	LUS	32	9	3	20	0	166	160	179	183	133	133	103	103	97	101	244	252	150	154	134	134	167	167	88	88	128	128	224	226	101	121	184	184	238	240	188	208
49	LUS	32	9	5	17	1	166	160	173	177	131	133	103	103	97	101	244	252	146	146	134	134	161	165	82	82	128	128	224	226	113	119	184	184	240	242	188	190
50	LUS	32	8	5	19	0	160	160	179	183	129	133	103	103	101	107	246	252	150	152	134	138	161	167	82	88	128	128	226	238	99	113	178	178	230	238	190	208
51	LUS	32	8	4	20	0	160	150	177	177	129	139	103	103	99	101	244	252	146	152	132	140	161	167	82	98	128	128	226	228	113	113	178	184	238	238	188	194
52	LUS	32	8	7	17	0	164	160	173	179	131	133	103	103	95	101	244	246	146	150	138	140	167	167	88	98	128	128	238	238	101	113	178	184	230	236	192	194
53	LUS	32	11	1	20	0	162	160	177	181	133	133	99	103	97	101	252	252	148	152	132	134	167	167	82	88	128	128	224	238	111	113	178	184	226	240	190	192
54	LUS	32	10	6	16	0	162	160	177	179	129	139	95	99	97	97	252	252	148	148	132	138	161	167	88	98	128	128	218	224	101	111	184	184	232	238	190	208
55	LUS	32	14	4	14	0	166	164	175	179	129	133	95	109	97	97	248	252	146	154	132	132	167	167	82	98	128	128	218	224	111	111	184	184	238	238	190	194
56	LUS	32	8	3	21	0	160	150	175	177	131	133	99	109	97	101	248	252	146	152	134	140	161	167	82	98	128	128	224	224	101	113	178	184	238	240	190	190
57	LUS	32	7	7	18	0	164	162	175	177	133	133	99	103	89	101	252	252	146	160	134	140	157	165	88	98	120	128	220	224	99	99	178	184	232	240	190	194
58	LUS	32	5	9	18	0	158	150	173	183	129	133	99	103	99	99	248	252	146	160	134	138	167	167	88	98	120	120	218	224	99	121	178	182	232	240	190	208
59	LUS	32	6	8	18	0	158	150	175	183	129	133	103	103	89	99	252	252	146	152	134	138	157	167	82	88	120	128	220	224	99	121	178	184	232	240	188	208
60	LUS	32	10	6	16	0	162	162	177	183	135	135	99	103	89	107	252	252	146	146	140	142	165	167	82	88	120	128	218	226	113	119	184	184	232	240	194	208
61	LUS	32	10	5	17	0	166	166	177	177	129	133	99	109	101	105	244	252	146	154	134	142	167	167	88	88	128	128	226	238	113	121	178	178	232	238	188	194
62	LUS	32	13	3	16	0	166	162	181	183	133	135	99	103	101	101	248	248	148	148	134	142	165	167	82	98	128	128	224	224	97	101	184	184	238	238	194	208
63	LUS	32	11	2	18	1	160	160	177	179	129	133	95	103	89	101	246	252	148	162	132	134	167	167	88	88	128	128	238	238	111	113	178	178	238	238	194	208
64	LUS	32	9	4	19	0	160	158	179	183	129	139	95	99	97	97	246	252	148	150	132	140	167	167	88	88	128	128	218	238	101	111	178	184	238	240	194	208
65	LUS	32	10	5	17	0	164	150	177	181	131	133	103	103	97	97	236	246	148	152	132	134	167	167	82	88	126	128	224	228	111	115	184	184	238	240	190	194
66	LUS	32	14	3	15	0	168	158	177	177	133	133	95	109	99	101	240	246	146	152	132	140	165	165	82	88	128	128	218	226	111	111	178	184	232	238	192	208
67	LUS	32	12	5	15	0	168	162	177	177	129	133	91	103	89	89	240	252	146	160	142	142	157	167	98	98	128	128	224	226	101	101	184	184	240	240	208	212
68	LUS	32	7	4	21	0	168	162	177	183	129	133	97	103	101	101	244	252	146	146	132	138	159	167	82	98	120	128	226	238	99	121	178	184	238	240	190	208
69	LUS	32	9	4	18	1	166	150	177	181	129	133	103	109	99	107	246	252	148	160	134	140	167	167	82	88	120	128	218	228	121	123	184	184	232	238	190	194
70	LUS	32	10	4	18	0	164	150	177	177	133	133	103	109	101	103	252	252	150	160	134	134	167	167	88	88	128	128	226	228	113	121	184	184	232	240	194	208
71	LUS	32	12	3	17	0	150	150	177	183	133	133	103	103	101	107	246	252	146	160	134	140	167	167	88	88	128	128	218	228	121	121	184	184	232	240	208	208
72	LUS	32	10	6	16	0	166	162	177	183	129	129	99	109	97	107	252	252	160	160	134	140	161	167	88	100	128	128	228	238	121	121	184	184	232	240	190	194
73	LUS	32	9	2	21	0	168	166	177	177	129	129	103	109	97	101	252	252	150	160	134	140	167	167	82	88	128	128	226	238	101	121	178	184	232	240	194	208
74	LUS	32	11	1	20	0	160	150	177	183	129	133	103	103	101	107	240	252	146	146	134	134	167	167	88	100	128	128	224	226	101	121	184	184	238	238	192	192
75	LUS	32	11	5	16	0	166	166	177	183	129	129	91	109	95	101	240	246	148	160	134	140	157	167	88	88	128	128	226	228	101	121	184	184	232	240	190	194
76	LUS	18	7	2	8	1	160	150	177	177	129	141	91	109	89	107	236	246	146	146	134	140	167	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
77	LUS	16	4	1	10	1	160	150	177	183	133	141	95	103	89	101	240	252	146	146	0	0	167	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

78	LUS	32	13	0	19	0	166	150	177	181	129	133	103	109	99	107	252	252	146	146	134	134	167	167	88	88	128	128	224	226	121	121	184	184	238	238	192	208
79	LUS	32	13	4	15	0	150	150	183	183	133	133	109	109	101	107	252	252	146	156	132	134	167	167	88	88	128	128	220	228	121	121	184	184	232	238	192	194
80	LUS	32	9	6	17	0	166	150	175	177	129	129	97	109	101	107	248	252	146	156	134	136	165	167	88	98	120	128	220	228	121	121	184	184	226	238	208	208
81	LUS	32	9	4	19	0	162	160	177	183	133	133	103	103	89	107	248	252	156	160	132	136	159	167	88	98	120	128	224	238	121	121	184	184	238	240	208	208
82	LUS	32	9	4	19	0	166	160	181	183	129	133	103	109	99	101	246	252	146	150	134	134	159	167	88	88	128	128	220	228	121	121	184	184	232	238	192	208
83	LUS	32	8	2	22	0	162	150	177	183	133	133	99	103	89	107	252	252	146	146	134	138	165	167	88	98	120	128	224	226	121	121	178	184	238	240	194	208
84	LUS	32	8	2	22	0	164	150	177	183	129	133	103	103	99	101	240	252	146	148	140	140	167	167	98	100	120	128	224	226	101	101	184	184	238	240	194	208
85	LUS	32	13	3	16	0	166	160	181	183	129	133	103	103	97	99	240	246	148	156	134	134	157	159	82	88	120	128	224	224	101	101	184	184	238	238	192	194
86	LUS	32	8	4	19	1	160	160	181	183	133	139	99	103	99	101	248	252	148	148	142	142	165	167	82	98	120	128	218	238	101	113	184	184	240	242	190	208
87	LUS	32	11	3	18	0	160	160	181	183	133	139	99	101	97	101	246	248	146	150	134	142	157	165	82	98	128	128	218	224	101	113	184	184	238	238	192	208
88	LUS	32	11	1	19	1	166	150	181	181	129	133	99	103	99	101	246	248	148	150	134	134	157	165	82	98	120	128	218	224	101	113	184	184	238	242	194	208
89	LUS	32	12	2	18	0	160	158	177	177	129	131	97	99	99	99	240	244	146	152	132	134	167	167	82	98	128	128	226	238	101	111	178	184	238	240	192	194
90	LUS	32	8	5	19	0	162	158	177	183	129	133	99	103	89	99	248	252	146	146	138	140	165	167	82	98	120	120	218	224	99	121	178	184	240	240	190	208
91	LUS	32	10	3	19	0	168	160	177	181	129	133	99	103	101	101	240	252	148	150	132	140	167	167	82	88	120	128	218	224	99	105	184	184	240	240	194	208
92	LUS	22	6	3	12	1	168	160	177	183	133	141	95	103	89	107	236	252	146	156	134	140	167	167	88	88	0	0	0	0	0	0	184	184	0	0	0	0
93	LUS	32	10	5	17	0	168	150	183	183	129	135	95	103	107	107	236	252	146	150	134	136	167	167	88	98	126	128	218	226	111	115	178	178	240	240	192	194
94	LUS	32	7	5	20	0	160	150	177	183	129	129	99	103	95	107	248	252	150	156	132	140	167	167	88	98	128	128	224	238	113	119	184	192	226	240	192	208
95	LUS	32	11	6	15	0	162	160	175	183	129	135	103	103	107	107	246	252	150	156	132	132	165	167	82	88	128	128	220	226	111	119	184	184	226	240	194	194
96	LUS	32	10	4	18	0	160	160	177	177	133	133	103	105	89	89	246	252	146	160	132	140	165	167	88	98	128	128	218	226	101	101	178	184	226	232	194	194
97	LUS	32	8	7	17	0	162	150	177	183	133	133	103	103	99	107	244	252	156	160	132	142	159	167	88	88	128	128	228	238	97	113	178	184	232	238	194	194
98	LUS	32	8	5	19	0	168	158	177	183	129	133	103	105	99	101	244	244	160	160	132	134	165	167	88	88	128	128	226	238	101	101	184	184	232	240	192	194
99	LUS	32	7	6	19	0	160	158	177	183	133	133	103	103	99	99	244	252	146	160	134	136	159	167	88	88	128	128	220	228	121	121	178	184	226	240	190	194
100	LUS	32	11	2	19	0	160	150	177	177	133	133	97	97	97	99	248	252	148	150	132	134	165	167	88	88	128	128	226	226	101	101	192	192	238	238	190	194
101	LUS	32	13	2	17	0	164	150	177	183	133	135	91	109	89	97	244	252	146	150	140	140	157	167	88	88	128	128	218	238	101	101	178	178	240	240	192	194
102	LUS	32	9	1	21	1	164	150	177	177	129	133	103	109	99	99	238	252	146	150	134	138	167	167	88	88	128	128	224	238	101	101	178	184	240	240	190	194
103	LUS	32	10	2	20	0	168	150	177	183	129	133	103	103	97	101	240	248	150	152	136	142	165	167	88	88	128	128	218	224	111	113	178	192	238	240	192	194
104	LUS	32	9	2	21	0	162	160	177	177	129	131	97	109	97	99	246	252	146	148	134	136	165	167	82	98	128	128	218	226	101	113	178	184	232	240	190	194
105	LUS	32	10	3	18	1	168	162	181	183	133	133	97	103	105	107	244	252	146	148	132	140	167	169	88	98	120	128	218	226	99	101	184	184	238	240	190	192
106	LUS	32	14	1	17	0	162	158	177	183	129	129	103	103	107	107	240	248	146	146	132	136	167	167	98	98	128	128	218	224	101	111	184	184	238	240	190	208
107	LUS	32	12	4	16	0	166	158	181	183	133	133	109	109	97	107	240	246	146	156	134	134	167	167	82	88	128	128	226	226	113	121	178	184	232	238	188	194
108	LUS	32	12	5	15	0	162	160	177	177	129	131	99	109	89	99	252	254	150	152	134	134	167	167	82	98	128	128	220	238	121	121	184	184	226	240	188	208
109	LUS	32	9	6	17	0	160	150	173	183	129	133	99	109	89	101	240	252	146	146	134	140	159	161	98	98	128	128	226	226	101	115	178	184	226	232	190	192
110	LUS	32	6	3	23	0	160	150	183	183	133	135	99	103	99	107	252	252	150	156	132	134	165	167	88	98	128	128	224	226	101	121	178	178	232	240	194	208
111	LUS	32	13	4	14	1	164	162	177	177	129	133	99	109	95	99	252	252	158	158	138	142	157	167	98	98	128	128	218	224	121	121	184	184	230	240	190	208
112	LUS	32	12	5	15	0	168	162	177	177	129	129	99	103	89	89	248	252	150	152	132	142	159	167	82	88	128	128	224	228	101	113	184	192	238	238	188	208
113	LUS	32	10	5	16	1	166	164	177	183	129	129	97	103	89	107	238	252	146	146	134	140	167	167	88	88	120	128	220	224	97	115	178	184	230	238	192	194
114	LUS	32	10	3	19	0	162	158	177	183	129	133	99	109	89	107	252	254	146	152	134	140	159	165	88	88	128	128	224	238	121	121	178	184	240	240	190	208
115	LUS	32	9	5	18	0	158	158	183	183	133	133	99	103	99	107	252	254	146	150	140	140	157	159	88	88	128	128	238	238	101	121	178	184	226	240	194	208
116	LUS	32	9	4	19	0	160	150	181	183	133	135	103	109	97	107	244	248	146	152	132	136	167	167	82	88	128	128	224	238	97	101	184	184	226	238	188	190
117	LUS	32	6	4	21	1	166	160	177	179	129	139	99	103	97	105	248	252	146	150	134	136	167	167	94	98	128	128	224	226	101	107	178	178	238	240	190	208
118	LUS	32	12	3	17	0	166	160	183	183	133	135	99	103	99	99	244	248	148	152	132	140	167	167	82	88	128	128	218	224	97	101	178	184	238	240	188	190
119	LUS	32	12	4	16	0	150	150	177	183	133	133	103	103	89	99	240	252	152	160	136	136	167	167	98	98	128	128	224	226	111	115	184	184	232	240	188	208
120	LUS	32	12	5	15	0	160	150	183	183	133	135	103	103	99	107	248	248	146	148	134	134	159	167	82	98	126	128	224	224	97	111	184	184	238	240	188	192
121	LUS	32	11	3	18	0	164	160	177	183	129	135	103	109	95	97	236	248	146	146	134	140	167	167	82	88	128	128	238	238	111	111	178	184	238	240	190	192
122	LUS	32	13	3	16	0	164	160	177	181	135	135	103	109	97	107	244	248	148	150	132	134	159	165	82	88	128	128	218	224	111	111	184	184	238	240	190	192
123	LUS	32	11	2	19	0	160	160	181	183	135	139	99	109	97	97	244	248	146	150	134	140	167	167	82	88	128	128	224	226	101	111	178	184	238	238	190	208
124	LUS	32	10	6	16	0	166	160	183	183	129	139	95	103	89	97	244	246	154	154	134	138	167	167	88	88	128	128	218	226	97	101	178	184	238	240	192	208
125	LUS	32	11	4	17	0	160	160	183	183	133	139	95	103	97	101	244	246	146	154	134	138	167	167	88	88	128	128	218	218	111	113	178	184	238	240	194	194

126	LUS	32	9	6	17	0	164	160	177	179	133	139	103	103	89	101	240	246	146	152	132	138	167	167	88	94	128	128	224	238	99	113	178	178	236	238	194	208
127	LUS	32	12	3	17	0	166	160	183	183	129	139	103	103	101	101	240	246	146	146	132	140	161	167	94	98	128	128	218	224	111	113	178	184	238	240	192	192
128	LUS	32	16	1	15	0	162	150	177	177	129	129	99	107	107	107	246	252	146	146	140	140	165	165	88	88	128	128	224	226	111	113	184	184	240	240	192	194
129	LUS	32	9	8	15	0	168	166	179	181	133	133	107	109	97	105	246	252	146	160	140	142	159	161	98	98	128	128	224	238	101	113	184	184	236	240	192	208
130	LUS	32	14	4	12	2	168	160	183	183	133	135	99	105	107	107	240	246	150	162	140	142	167	167	88	88	128	128	238	238	97	111	178	178	240	244	194	194
131	LUS	32	10	7	15	0	164	158	179	183	133	135	97	103	101	101	240	248	146	156	132	132	159	167	82	82	128	128	226	238	97	97	178	184	238	238	194	208
132	LUS	32	12	4	16	0	164	162	173	183	133	135	97	103	97	105	246	252	148	150	140	140	161	167	82	98	128	128	224	238	111	113	184	184	238	240	192	192
133	LUS	32	9	6	17	0	162	162	183	183	131	131	103	103	97	97	248	252	148	150	132	140	159	161	88	98	128	128	224	228	97	113	178	184	238	240	192	194
134	LUS	32	10	4	18	0	160	158	177	183	133	133	103	109	97	101	248	248	146	150	132	132	167	167	88	88	128	128	224	228	97	121	178	178	232	238	192	194
135	LUS	32	12	4	16	0	162	162	183	183	131	133	91	97	97	105	246	252	146	148	132	140	167	167	82	82	128	128	224	228	101	113	178	178	238	240	192	194
136	LUS	32	7	8	16	1	166	158	179	183	133	135	109	111	97	101	248	248	150	160	132	134	167	167	82	88	126	128	226	228	97	113	178	184	232	238	192	194
137	LUS	32	12	5	15	0	160	160	183	183	133	133	103	103	97	97	244	244	150	152	134	134	161	165	98	98	128	128	218	226	97	113	178	184	230	240	188	188
138	LUS	32	7	9	15	1	162	160	177	177	133	139	103	109	95	101	240	252	146	154	136	138	167	167	94	100	128	128	228	238	105	113	178	184	224	236	192	208
139	LUS	32	7	7	16	2	166	160	183	183	129	133	103	103	97	101	224	246	146	156	132	134	159	167	88	88	128	128	218	228	97	105	184	192	224	240	188	194
140	LUS	32	10	2	19	1	166	160	177	183	133	133	95	109	99	101	244	246	146	150	134	134	165	167	82	98	128	128	218	238	101	119	184	184	224	240	190	194
141	LUS	32	6	5	21	0	164	150	177	183	133	133	95	103	97	101	240	246	146	150	132	134	165	167	88	94	128	128	224	224	113	119	178	192	238	240	188	194
142	LUS	32	6	4	20	2	164	160	177	183	129	131	103	103	95	101	224	252	146	150	134	140	165	165	82	98	120	128	224	228	113	113	178	184	224	238	190	190
143	LUS	32	11	2	19	0	160	160	173	183	133	133	103	103	101	101	244	248	148	150	132	134	167	167	88	98	128	128	218	224	101	113	184	184	238	240	188	208
144	LUS	32	11	5	16	0	164	160	179	183	133	133	103	103	97	101	240	248	152	152	134	138	167	167	94	98	128	128	238	238	97	113	178	184	236	238	194	194
145	LUS	32	9	3	20	0	160	160	177	183	135	139	103	103	97	101	246	252	146	152	132	134	167	167	82	88	128	128	224	228	113	113	178	178	238	240	194	208
146	LUS	32	11	2	18	1	164	160	177	177	133	133	103	103	97	101	224	240	150	152	134	138	167	167	94	98	128	128	224	226	113	113	178	184	238	238	192	208
147	LUS	32	8	5	19	0	166	164	183	183	129	133	99	103	101	107	252	252	150	154	132	134	161	167	88	98	120	128	224	228	101	121	184	184	230	238	190	192
148	LUS	32	9	7	16	0	160	150	177	179	133	139	103	103	89	95	240	246	152	152	132	140	161	167	88	88	128	128	224	226	113	113	178	180	232	238	188	208
149	LUS	32	12	2	17	1	164	164	177	183	129	131	103	103	89	97	246	252	148	148	132	134	165	165	82	88	128	128	218	226	113	115	178	184	238	242	190	192
150	LUS	32	12	4	16	0	164	160	183	183	133	133	103	109	97	107	244	252	148	150	132	134	161	165	82	98	120	120	228	238	101	101	178	184	238	238	192	192
151	LUS	32	13	5	14	0	164	164	177	183	133	133	103	103	89	107	246	248	152	156	132	138	161	167	82	88	128	128	238	238	97	113	178	184	236	238	192	208
152	LUS	32	10	5	17	0	164	160	179	183	133	133	103	103	89	97	246	248	150	152	132	134	167	167	88	98	128	128	238	238	97	99	178	184	232	238	188	194
153	LUS	18	6	3	8	1	160	150	183	183	129	129	103	103	95	107	222	244	148	150	132	140	159	161	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
154	LUS	32	9	5	17	1	168	150	177	177	129	129	91	95	89	101	236	238	146	146	138	140	165	167	88	98	120	128	218	224	101	111	184	184	240	240	190	194
155	LUS	32	9	1	22	0	166	150	177	183	129	133	91	103	99	99	240	244	146	150	132	140	165	167	88	88	128	128	218	218	101	121	178	184	238	240	192	194
156	LUS	32	12	4	16	0	162	162	175	181	131	133	103	109	99	107	246	248	148	150	132	136	167	167	82	100	128	128	218	238	97	101	178	184	238	240	190	192
157	LUS	32	7	4	20	1	168	158	179	183	129	133	103	109	101	101	240	252	146	150	132	134	161	167	88	98	120	128	226	226	101	107	184	184	238	238	190	194
158	LUS	32	7	6	19	0	168	150	177	183	131	133	103	107	101	101	244	252	146	148	132	136	161	167	82	88	120	128	224	226	99	121	184	184	232	238	192	194
159	LUS	32	10	2	20	0	168	164	177	177	129	133	99	103	97	101	252	252	146	146	132	136	167	167	82	88	128	128	224	226	97	97	178	184	240	240	190	194
160	LUS	32	8	4	20	0	160	150	181	183	133	135	97	99	97	107	236	252	148	152	132	140	167	167	82	88	128	128	224	226	97	121	178	184	236	240	190	194
161	LUS	32	12	3	17	0	166	160	177	181	131	133	109	109	101	105	252	252	148	148	132	134	167	167	82	88	128	128	218	224	97	111	178	184	238	240	192	194
162	LUS	32	11	2	19	0	168	168	183	183	129	129	97	109	97	99	248	252	146	146	132	140	167	167	88	98	120	128	226	226	99	121	184	184	238	240	194	208
163	LUS	32	12	6	14	0	166	162	179	183	133	133	103	103	89	89	244	252	148	150	134	142	159	167	98	98	128	128	224	226	97	121	178	180	230	240	192	192
164	LUS	32	10	5	17	0	168	166	177	183	129	133	91	95	89	89	240	254	146	150	134	136	167	167	98	100	120	128	218	224	113	121	184	184	240	240	192	208
165	LUS	32	9	3	19	1	160	158	181	183	133	133	95	103	89	97	248	252	148	156	134	136	163	167	88	98	128	128	226	238	101	121	184	184	238	238	192	192
166	LUS	32	10	5	17	0	168	162	177	183	129	129	103	109	95	107	244	254	146	156	134	140	165	165	82	88	128	128	224	226	115	121	178	184	226	240	208	208
167	LUS	32	8	6	17	1	158	150	175	183	133	133	103	109	89	101	238	252	146	160	134	138	165	167	88	88	128	128	218	238	101	121	184	184	232	240	188	192
168	LUS	32	3	9	18	2	160	150	173	177	133	135	103	109	95	99	242	252	146	150	136	142	167	167	88	100	128	128	228	228	105	113	178	184	224	240	188	208
169	LUS	32	10	4	18	0	164	162	177	183	129	133	97	103	101	101	252	252	150	150	138	140	159	159	88	88	128	128	220	238	101	101	184	184	238	240	194	208
170	LUS	32	9	7	16	0	160	160	177	177	131	133	95	109	89	99	252	254	148	152	132	136	157	167	88	88	128	128	224	228	97	113	178	184	238	240	188	212
171	LUS	32	8	3	21	0	166	158	177	177	129	133	103	109	89	101	252	252	150	152	134	142	165	167	88	98	128	128	224	226	101	121	178	184	232	238	190	192
172	LUS	32	9	6	17	0	162	158	177	183	133	133	97	103	89	99	240	252	150	160	134	140	159	167	82	88	128	128	218	224	101	111	178	184	236	240	188	188
173	LUS	32	11	3	18	0	160	160	177	183	133	133	103	109	89	101	248	252	152	160	132	136	167	167	82	88	128	128	218	224	97	101	184	184	238	240	208	212

174	LUS	32	8	3	21	0	160	158	177	181	129	133	97	103	97	101	246	248	146	152	136	140	165	167	88	88	120	128	224	224	111	113	178	192	238	240	190	190
175	LUS	32	10	6	16	0	162	160	177	177	129	131	95	109	101	107	252	252	152	160	136	136	167	167	88	98	128	128	218	224	97	101	178	184	232	238	190	212
176	LUS	32	13	1	18	0	168	162	177	177	129	133	97	99	97	107	252	252	146	152	132	140	167	167	82	98	128	128	224	224	113	121	184	184	238	240	188	190
177	LUS	32	10	2	20	0	168	158	183	183	129	133	103	109	97	97	240	248	146	150	134	140	167	167	88	88	128	128	224	226	113	121	178	184	238	240	188	192
178	LUS	32	9	4	19	0	162	162	177	181	133	133	99	103	99	101	246	252	146	146	136	136	167	167	82	88	120	128	224	238	99	101	184	192	232	240	190	208
179	LUS	32	13	4	15	0	160	160	175	183	133	133	99	103	99	107	244	248	148	152	134	138	161	167	82	98	128	128	218	226	99	101	178	184	238	238	190	192
180	LUS	32	10	3	19	0	168	160	177	183	129	133	95	103	89	101	252	252	146	152	134	134	167	167	88	94	128	128	218	218	113	121	178	184	230	238	208	208
181	LUS	32	13	4	15	0	168	166	177	183	129	129	95	109	105	107	246	252	146	146	140	140	167	167	88	98	128	128	218	224	97	101	184	184	240	240	188	194
182	LUS	32	11	3	18	0	160	150	183	183	129	135	103	109	97	107	252	252	146	152	140	142	167	167	82	88	126	128	224	224	101	111	178	184	240	240	190	190
183	LUS	32	9	3	20	0	168	160	177	183	129	133	103	103	89	97	246	252	146	148	140	140	165	165	82	88	120	128	224	226	111	121	178	192	238	240	190	212
184	LUS	32	11	3	18	0	160	158	177	183	129	131	97	103	97	99	240	252	146	148	132	134	167	167	82	88	128	128	226	226	111	111	178	192	238	238	190	192
185	LUS	32	11	1	20	0	160	150	177	183	129	133	91	109	97	99	240	252	148	152	134	140	157	167	82	88	128	128	224	224	111	121	178	178	238	240	190	190
186	LUS	32	13	3	16	0	166	150	183	183	131	133	109	109	97	107	246	248	146	150	132	136	157	167	82	82	128	128	224	238	105	105	184	184	238	238	190	194
187	LUS	32	11	3	18	0	160	150	179	183	133	135	103	103	89	97	246	252	146	154	140	140	157	167	82	88	128	128	218	224	101	111	178	178	238	238	190	208
188	LUS	32	13	1	18	0	166	160	183	183	129	133	103	103	99	99	246	252	146	146	140	142	165	167	82	82	128	128	218	218	111	111	178	184	238	240	190	208
189	LUS	32	10	4	18	0	164	150	177	177	129	129	103	103	99	99	236	240	146	146	136	140	157	167	88	100	120	128	218	224	101	121	184	192	240	240	190	194
190	LUS	32	12	3	17	0	160	160	183	183	129	133	101	103	97	107	246	246	146	150	132	136	165	167	82	82	126	128	218	220	101	111	178	178	240	240	190	192
191	LUS	32	10	2	20	0	160	150	181	183	129	135	103	103	101	101	252	252	146	148	134	136	167	167	82	88	128	128	226	226	101	111	178	184	236	238	192	208
192	LUS	32	11	3	18	0	160	158	177	181	129	133	103	109	97	99	248	252	148	150	140	140	159	167	82	98	128	128	224	224	97	111	184	184	238	238	190	192
193	LUS	32	11	0	21	0	160	160	181	183	129	129	103	109	99	101	246	252	146	148	132	140	165	167	82	88	128	128	224	226	111	111	178	184	238	238	190	192
194	LUS	32	13	2	17	0	166	160	181	183	133	133	103	109	99	107	246	246	146	148	132	140	157	167	82	82	128	128	224	238	97	105	184	184	238	238	190	194
195	LUS	32	10	4	18	0	160	160	177	181	133	133	103	103	99	101	248	252	148	150	132	134	157	159	82	98	128	128	220	226	97	115	184	184	238	238	190	194
196	LUS	32	13	0	19	0	162	160	177	177	129	129	97	103	97	99	246	246	146	148	132	140	167	167	82	98	128	128	218	224	101	111	178	184	238	240	190	190
197	LUS	32	8	3	21	0	160	160	177	183	129	133	103	103	97	103	236	240	146	146	132	134	165	167	88	100	128	128	224	238	111	111	184	184	238	240	190	208
198	LUS	32	11	3	18	0	162	160	181	183	133	133	109	109	97	101	236	246	146	148	132	132	157	165	82	98	126	128	218	224	97	111	178	184	238	240	194	208
199	LUS	32	11	0	21	0	160	150	177	183	129	133	97	109	97	99	246	248	146	148	132	140	165	165	82	98	128	128	224	226	111	121	178	184	240	240	190	190
200	LUS	32	9	2	21	0	160	150	177	183	129	133	103	109	97	103	240	244	146	146	132	132	167	167	88	100	128	128	238	238	101	111	178	184	238	240	190	208
201	LUS	32	15	1	16	0	160	160	183	183	129	129	103	109	97	97	244	246	146	150	132	132	159	167	82	88	128	128	238	238	111	111	184	184	238	238	190	194
202	LUS	32	9	5	18	0	166	160	181	183	131	135	103	103	97	97	246	248	146	154	134	140	165	167	82	88	128	128	218	224	97	113	178	184	232	240	192	194
203	LUS	32	13	1	18	0	166	160	177	177	129	129	103	103	99	107	252	252	148	150	132	134	167	167	88	88	128	128	226	226	101	111	178	192	238	240	190	192
204	LUS	32	10	5	17	0	150	150	177	177	129	133	91	97	99	99	246	252	146	152	136	140	167	167	98	100	120	120	218	224	101	121	184	184	240	240	194	212
205	LUS	32	13	1	18	0	168	162	177	183	133	133	109	109	97	99	236	252	146	146	140	140	165	167	82	82	128	128	218	218	101	111	178	184	238	240	190	208
206	LUS	32	10	2	20	0	168	150	177	177	129	129	97	103	99	107	246	248	146	148	132	140	167	167	88	98	120	128	224	238	97	111	178	184	238	240	190	208
207	LUS	32	7	9	15	1	166	162	177	177	129	133	91	91	97	107	236	254	150	160	134	134	167	167	88	98	120	128	218	238	99	103	178	184	236	238	188	208
208	LUS	32	12	0	20	0	164	160	183	183	129	133	103	103	101	107	244	252	146	152	132	132	167	167	88	98	128	128	218	218	113	121	178	184	238	238	194	208
209	LUS	32	12	4	16	0	168	160	183	183	129	139	103	109	101	101	240	240	146	146	134	136	167	167	94	100	128	128	218	224	101	111	178	192	238	240	192	194
210	LUS	32	10	4	18	0	168	150	177	177	129	133	95	109	99	99	240	244	146	150	134	138	157	167	88	100	128	128	226	226	113	121	178	178	226	240	194	208
211	LUS	32	7	4	21	0	164	150	177	181	133	135	91	97	89	99	248	254	146	150	134	136	165	167	88	98	128	128	218	224	101	101	178	184	236	240	194	208
212	LUS	32	11	2	18	1	166	164	177	177	133	139	97	103	97	99	246	248	146	152	136	140	167	167	88	98	120	128	218	226	117	121	184	184	238	240	194	194
213	LUS	32	11	4	17	0	168	168	177	183	129	133	97	109	89	103	252	254	146	150	136	136	167	167	88	88	120	128	226	238	101	111	184	184	236	238	194	194
214	LUS	32	10	5	17	0	158	150	177	179	133	135	97	97	99	107	246	248	150	160	136	136	167	167	88	88	128	128	220	224	101	101	178	184	238	240	190	194
215	LUS	32	11	5	16	0	168	160	181	183	133	133	95	101	101	101	248	252	148	148	132	136	167	167	82	88	128	128	224	224	97	105	180	184	238	240	190	192
216	LUS	32	10	2	20	0	160	158	181	183	133	133	103	103	97	101	248	252	146	146	134	136	167	167	82	88	128	128	226	238	97	113	184	184	238	238	194	194
217	LUS	32	14	0	18	0	160	160	181	183	133	133	97	103	97	99	246	248	146	148	136	136	167	167	82	88	128	128	224	226	101	101	178	178	238	238	190	192
218	LUS	32	10	4	18	0	160	150	181	183	133	133	103	103	101	101	246	248	146	146	136	140	167	167	82	88	128	128	224	224	97	97	184	192	238	240	188	190
219	LUS	32	14	1	17	0	160	160	181	183	133	133	97	103	99	107	248	252	148	148	132	136	167	167	82	88	128	128	218	226	105	111	178	184	238	238	192	194
220	LUS	32	12	3	17	0	160	160	181	183	133	135	103	103	97	105	246	248	148	150	132	140	157	165	82	82	128	128	218	224	101	105	184	184	238	238	190	194
221	LUS	32	13	3	16	0	166	166	181	183	129	133	103	103	97	105	246	248	148	148	136	140	157	167	82	82	128	128	218	226	97	115	178	184	238	238	190	194

222	LUS	32	12	1	19	0	160	160	181	183	133	133	103	103	99	101	248	252	148	150	134	136	167	167	82	88	128	128	224	224	101	105	184	184	238	238	194	194
223	LUS	32	16	2	14	0	160	160	181	181	133	133	97	109	99	99	248	252	148	156	136	136	167	167	82	88	128	128	218	226	101	105	178	184	238	238	192	192
224	LUS	32	11	1	20	0	168	150	177	181	133	133	97	103	99	99	248	248	146	148	134	140	165	167	98	98	128	128	224	226	101	101	180	184	238	240	192	194
225	LUS	32	10	4	18	0	160	158	177	181	133	133	95	109	101	101	252	252	146	146	134	136	167	167	82	88	128	128	218	226	97	113	184	192	238	238	190	194
226	LUS	32	10	2	20	0	160	160	181	183	133	133	103	109	101	101	248	252	146	150	132	134	167	167	82	88	128	128	224	226	101	105	184	192	238	238	190	192
227	LUS	32	12	1	19	0	166	158	177	183	129	133	97	109	97	99	248	252	148	150	132	134	167	167	82	82	128	128	224	226	101	113	178	184	238	238	192	192
228	LUS	32	8	2	22	0	160	160	177	181	131	133	103	103	99	101	248	252	146	150	134	140	159	167	82	88	128	128	218	238	111	113	178	184	238	240	192	194
229	LUS	32	12	2	18	0	166	160	181	181	133	133	95	97	97	105	246	252	146	146	132	136	165	167	82	82	128	128	224	224	101	113	178	178	238	240	190	192
230	LUS	32	12	3	17	0	168	166	181	183	133	133	95	103	99	105	240	252	146	148	132	132	165	167	82	94	128	128	224	224	101	113	178	178	238	238	192	194
231	LUS	32	11	1	20	0	166	160	183	183	133	133	97	103	97	97	246	252	148	150	134	140	157	167	82	88	128	128	224	226	101	105	178	184	238	240	192	194
232	LUS	32	12	2	18	0	160	160	177	181	133	133	103	103	101	101	248	252	146	146	132	136	167	167	82	88	128	128	226	226	101	105	178	192	238	238	190	190
233	LUS	32	15	2	15	0	166	166	181	183	129	133	95	97	99	105	248	248	148	150	134	140	157	167	82	82	128	128	218	226	101	101	184	184	238	238	192	194
234	LUS	32	13	3	16	0	160	160	181	181	133	133	95	97	99	99	248	252	148	156	136	136	167	167	82	88	128	128	224	226	101	105	178	184	238	240	192	192
235	LUS	32	11	3	18	0	160	158	177	181	129	133	95	109	99	99	246	252	146	150	132	140	157	167	82	82	128	128	224	224	101	113	178	182	238	238	192	192
236	LUS	32	10	5	17	0	166	150	177	181	133	133	95	95	101	105	252	252	148	148	132	140	165	167	82	98	128	128	218	224	97	121	182	184	238	238	192	194
237	LUS	16	3	1	11	1	160	158	177	183	133	133	103	109	97	101	248	250	146	150	0	0	165	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
238	LUS	32	13	3	15	1	160	150	183	183	131	133	103	103	97	99	246	246	148	162	140	140	157	167	82	82	128	128	218	224	101	101	184	184	230	238	190	212
239	LUS	32	10	1	21	0	166	160	177	181	133	133	103	103	97	107	246	252	146	148	134	136	167	167	82	98	128	128	224	226	113	121	184	184	232	238	194	208
240	LUS	32	7	4	21	0	162	158	177	183	129	133	103	109	97	101	248	252	146	146	132	140	157	167	88	88	128	128	224	228	101	121	178	184	232	232	190	194
241	LUS	32	10	1	20	1	162	160	181	183	133	133	97	103	97	101	252	252	150	152	128	140	161	167	98	98	128	128	224	238	101	111	184	184	238	240	190	192
242	LUS	32	6	5	21	0	166	160	177	181	129	135	91	109	97	99	252	254	146	150	134	140	167	167	88	98	128	128	226	226	101	121	184	192	240	240	188	194
243	LUS	32	13	4	15	0	168	162	183	183	129	135	97	99	101	103	246	248	146	150	140	140	159	167	88	98	128	128	218	238	121	121	178	192	238	238	208	208
244	LUS	32	16	0	16	0	164	162	183	183	129	129	103	103	99	107	246	246	148	150	132	132	167	167	82	88	128	128	218	224	111	113	178	184	240	240	190	194
245	LUS	32	10	1	21	0	164	150	181	183	129	133	103	103	97	103	244	244	150	152	134	136	167	167	88	98	128	128	226	238	101	101	178	184	238	240	192	192
246	LUS	32	9	5	18	0	164	160	181	183	129	133	97	103	99	99	236	254	150	150	134	134	161	167	98	98	128	128	218	226	97	101	184	192	238	238	190	208
247	LUS	32	12	4	16	0	164	158	183	183	129	135	105	109	99	99	244	244	150	150	136	140	167	167	88	88	128	128	224	238	101	101	178	178	226	240	194	208
248	LUS	32	6	4	22	0	164	162	181	183	129	133	97	103	97	99	236	240	146	150	132	138	165	167	88	98	128	128	218	226	97	101	184	192	238	240	190	208
249	LUS	32	10	6	16	0	164	162	179	183	131	135	103	103	89	99	246	248	150	150	132	136	161	167	88	98	128	128	226	228	101	121	184	184	238	240	188	192
250	LUS	32	10	3	19	0	160	150	183	183	129	129	97	109	89	97	244	252	150	150	134	134	161	167	88	98	128	128	224	226	97	101	184	192	238	240	192	208
251	LUS	32	10	4	18	0	160	160	183	183	133	133	103	109	89	97	236	252	146	150	138	140	167	167	82	98	128	128	226	226	99	121	178	184	238	238	188	194
252	LUS	32	8	2	22	0	164	164	177	183	133	133	91	109	99	101	248	252	146	150	134	134	159	167	88	98	128	128	226	238	121	121	178	184	238	240	190	208
253	LUS	32	11	3	18	0	150	150	181	183	129	133	95	99	99	107	244	246	150	150	134	142	161	167	98	98	128	128	226	238	101	113	184	184	238	240	192	192
254	LUS	32	9	4	19	0	164	160	181	183	133	135	103	109	97	97	244	252	150	152	136	138	167	167	88	98	126	128	218	238	121	121	178	192	240	240	190	208
255	LUS	32	10	3	17	2	162	160	177	183	131	133	95	101	99	101	240	252	146	146	134	136	167	167	82	88	128	128	224	224	101	101	184	184	238	244	184	192
256	LUS	32	9	5	18	0	160	160	181	183	133	133	97	99	89	101	236	240	146	152	132	140	159	167	82	98	120	128	226	226	113	121	180	184	238	240	188	194
257	LUS	32	7	7	18	0	164	162	177	183	131	133	103	103	97	97	244	252	150	156	134	142	161	167	82	98	120	128	224	238	113	121	184	184	238	240	188	188
258	LUS	32	12	5	15	0	168	162	177	177	129	133	95	97	89	107	246	252	146	160	140	140	159	167	82	98	128	128	224	226	101	121	184	184	240	240	188	188
259	LUS	32	15	2	15	0	168	164	177	183	129	135	103	103	89	107	244	248	146	148	136	140	157	167	98	98	128	128	224	224	101	111	184	184	240	240	190	212
260	LUS	32	8	1	23	0	168	164	177	183	129	129	97	103	101	101	246	252	146	146	136	140	165	167	88	98	128	128	224	226	101	113	178	184	238	240	194	212
261	LUS	32	13	3	16	0	168	166	177	177	129	129	97	103	89	101	248	252	148	152	136	140	167	167	88	98	120	128	224	224	101	111	178	184	240	240	188	188
262	LUS	32	11	2	19	0	164	162	177	183	129	133	103	103	97	101	246	252	150	150	136	140	167	167	88	88	128	128	218	224	101	101	178	178	238	240	188	212
263	LUS	32	12	5	15	0	168	150	175	177	131	133	97	103	107	107	244	252	150	152	136	136	159	165	82	98	128	128	218	224	101	111	178	184	240	240	188	188
264	LUS	32	15	0	17	0	160	150	177	181	129	133	99	109	99	107	248	248	148	150	140	140	167	167	98	98	128	128	224	224	111	111	184	184	238	240	190	190
265	LUS	32	11	2	19	0	160	160	177	181	131	133	103	109	97	99	252	252	148	148	132	134	167	167	98	98	128	128	218	224	111	113	178	184	232	238	190	190
266	LUS	32	8	4	19	1	160	150	177	183	131	133	99	103	97	99	244	246	146	152	132	134	167	167	82	98	126	128	224	224	101	111	176	184	226	240	188	190
267	LUS	32	9	4	18	1	158	150	183	183	133	139	99	103	97	99	248	252	150	152	134	138	157	167	94	98	128	128	224	224	103	121	184	184	240	240	190	208
268	LUS	32	11	6	15	0	160	160	177	181	133	133	103	103	97	99	252	252	148	160	132	132	157	159	98	98	128	128	220	224	97	97	184	184	238	238	188	194
269	LUS	32	11	1	20	0	160	150	177	183	129	133	99	109	97	107	246	252	148	150	134	140	167	167	82	88	128	128	218	224	97	121	184	184	238	240	192	194

270	LUS	32	10	5	17	0	168	162	177	183	129	133	95	97	89	105	240	246	146	150	134	140	165	167	88	88	120	128	218	224	121	121	184	184	236	240	194	212
271	LUS	32	10	2	19	1	164	160	183	183	129	131	103	103	97	107	240	246	146	150	132	140	159	167	88	88	128	128	226	238	111	113	178	178	240	242	190	194
272	LUS	32	9	1	22	0	164	160	181	183	129	133	103	103	97	101	246	252	146	152	134	140	165	167	88	88	128	128	226	226	113	113	178	192	238	238	190	194
273	LUS	32	10	4	18	0	166	158	181	183	129	135	97	103	97	101	240	252	146	148	134	140	167	167	82	94	128	128	224	226	97	101	178	178	238	238	208	208
274	LUS	32	12	2	18	0	166	166	181	183	129	135	97	103	89	97	248	252	146	148	134	140	167	167	82	98	128	128	224	226	97	101	184	184	238	238	192	208
275	LUS	32	12	2	18	0	160	160	181	183	133	133	103	103	99	101	252	252	148	156	136	136	167	167	88	94	128	128	218	224	101	113	178	178	238	238	190	192
276	LUS	32	7	3	22	0	168	160	181	183	133	139	95	103	99	101	246	252	146	148	132	136	167	167	88	98	120	128	218	226	101	113	178	184	238	238	192	208
277	LUS	32	14	0	18	0	168	160	181	181	133	133	97	109	97	97	246	252	146	148	132	136	167	167	82	98	128	128	224	226	101	101	178	184	238	238	192	194
278	LUS	32	13	1	18	0	166	160	181	183	133	133	103	103	97	97	252	252	146	146	134	134	167	167	94	98	128	128	224	224	101	113	184	184	238	238	192	194
279	LUS	32	11	3	18	0	166	158	181	183	129	135	97	103	101	101	240	252	146	146	132	140	165	167	82	94	128	128	226	226	101	113	178	178	238	238	208	208
280	LUS	32	8	8	16	0	166	160	181	183	135	139	97	103	101	101	252	252	146	160	134	140	167	167	94	94	120	128	226	226	97	113	178	178	238	238	188	208
281	LUS	32	10	2	20	0	166	160	179	183	129	133	97	103	99	101	246	252	146	146	134	136	165	167	82	94	128	128	226	226	101	113	178	178	238	238	192	208
282	LUS	32	12	1	19	0	164	160	181	183	133	133	103	103	97	101	246	252	148	156	132	134	167	167	82	88	128	128	218	226	101	113	178	178	238	238	192	208
283	LUS	32	9	4	19	0	160	160	179	183	133	139	97	103	97	101	240	252	146	148	132	134	167	167	94	94	128	128	226	226	101	113	178	184	238	238	208	208
284	LUS	32	11	2	19	0	160	160	177	183	131	133	97	103	99	101	246	252	148	154	132	136	167	167	82	98	128	128	224	224	101	101	178	184	238	238	192	208
285	LUS	32	9	3	20	0	166	160	179	183	133	139	103	103	97	101	248	252	146	148	132	136	167	167	88	94	128	128	224	226	101	113	178	178	238	238	192	208
286	LUS	32	9	4	19	0	164	160	179	183	133	139	103	103	97	101	252	252	154	156	132	134	157	167	88	88	128	128	218	224	101	101	178	184	238	240	192	208
287	LUS	32	11	2	19	0	166	160	183	183	133	133	103	103	89	97	252	252	146	154	134	140	157	167	88	88	128	128	224	224	101	115	178	184	238	240	208	208
288	LUS	32	13	2	17	0	160	160	181	183	133	133	103	103	97	99	246	252	148	152	136	136	167	167	88	94	128	128	218	224	97	101	178	178	238	238	190	192
289	LUS	32	8	8	16	0	168	164	177	183	129	133	97	103	89	107	246	252	150	152	132	134	159	167	88	100	120	128	218	228	99	113	184	192	232	238	188	194
290	LUS	32	8	3	20	1	160	150	183	183	129	133	91	103	93	99	244	248	148	150	134	134	159	165	88	88	128	128	218	224	101	121	178	184	236	238	190	194
291	LUS	32	10	3	19	0	164	160	181	183	133	133	103	103	99	99	236	248	150	156	134	136	165	167	82	88	128	128	224	224	101	101	178	178	232	238	194	208
292	LUS	32	6	5	21	0	160	158	179	181	131	133	99	109	97	101	252	252	146	146	132	134	159	165	88	88	128	128	224	226	101	121	178	184	238	240	188	208
293	LUS	32	15	2	15	0	164	164	177	183	129	133	103	103	101	101	248	248	146	154	134	134	167	167	82	88	128	128	218	218	113	113	184	192	238	238	192	208
294	LUS	32	9	5	18	0	166	164	177	183	129	133	103	103	101	107	248	252	154	156	134	134	161	167	82	88	128	128	224	226	113	113	178	192	236	238	194	208
295	LUS	32	12	3	17	0	164	164	183	183	129	133	103	103	97	101	240	252	146	154	134	136	165	167	82	94	128	128	218	218	113	113	184	192	238	238	194	194
296	LUS	32	11	1	20	0	160	150	181	183	129	133	103	103	101	107	252	252	148	152	136	136	167	167	94	98	128	128	224	226	111	113	178	184	238	238	194	194
297	LUS	32	10	4	16	2	162	150	175	181	133	133	103	103	97	97	242	252	152	162	134	134	157	167	82	88	128	128	220	238	97	121	184	184	226	238	190	194
298	LUS	32	8	6	16	2	160	160	181	183	133	133	95	97	99	107	252	252	156	160	134	142	157	167	86	98	120	128	224	228	111	117	184	184	238	240	190	208
299	LUS	32	10	3	19	0	168	150	177	177	129	133	95	103	99	99	240	248	146	146	136	140	157	167	98	98	120	120	226	238	101	101	184	184	238	240	190	194
300	LUS	32	12	2	18	0	166	164	177	183	133	135	103	103	97	101	244	246	150	152	134	140	167	167	88	88	128	128	226	226	101	101	178	184	232	240	194	194
301	LUS	32	10	6	16	0	168	160	179	181	133	133	101	103	101	105	240	246	146	146	132	138	157	167	82	82	128	128	220	224	97	113	178	184	238	238	190	194
302	LUS	32	11	2	19	0	160	158	177	181	133	133	101	109	101	101	246	246	148	150	132	134	157	167	82	88	128	128	224	224	101	113	178	184	238	240	190	190
303	LUS	32	8	2	22	0	168	150	177	177	129	133	103	109	99	107	240	246	146	160	134	140	165	167	88	98	128	128	226	226	101	121	184	192	238	240	194	208
304	LUS	32	9	6	17	0	168	150	175	183	129	129	103	103	89	103	248	252	146	152	134	140	159	167	88	98	128	128	218	220	113	119	184	192	238	238	190	194
305	LUS	32	8	7	17	0	164	160	183	183	131	133	99	103	97	101	248	252	156	160	136	140	159	167	82	82	126	128	224	238	97	113	184	184	238	240	188	192
306	LUS	32	8	4	20	0	160	158	177	183	129	133	99	109	99	101	248	252	146	152	134	138	165	167	82	98	120	128	218	224	99	111	178	178	238	240	190	194
307	LUS	32	11	1	19	1	166	150	183	183	129	133	97	103	89	99	238	252	146	148	134	140	167	167	82	88	128	128	226	226	101	105	184	184	238	240	192	194
308	LUS	32	7	6	19	0	158	150	177	177	129	133	91	97	97	107	236	252	146	146	134	140	161	167	98	98	128	128	224	226	113	115	178	184	226	238	190	190
309	LUS	32	12	4	16	0	160	160	183	183	133	133	95	97	99	101	246	252	146	150	134	134	167	167	88	88	128	128	224	226	97	105	184	184	230	238	192	192
310	LUS	32	9	8	15	0	168	166	175	177	133	135	103	103	97	97	252	252	160	160	134	142	157	167	88	88	128	128	218	220	113	121	184	192	226	240	190	208
311	LUS	32	10	4	18	0	160	158	183	183	129	133	97	103	99	105	240	246	146	148	140	142	165	167	82	88	128	128	218	218	97	111	178	184	238	240	190	208
312	LUS	32	10	4	18	0	166	160	173	183	133	133	95	109	101	105	246	252	146	150	134	134	165	167	82	88	128	128	226	238	97	121	178	178	238	238	194	194
313	LUS	32	11	7	14	0	150	150	177	177	133	133	91	91	89	105	240	246	146	146	140	140	165	167	88	100	120	120	218	226	101	121	184	192	240	240	194	194
314	LUS	32	14	4	14	0	150	150	177	177	133	133	91	91	89	89	246	252	146	146	140	140	167	167	88	88	120	128	218	218	101	101	178	192	240	240	194	208
315	LUS	32	10	1	21	0	168	160	177	181	129	133	103	103	99	101	248	252	148	152	132	136	159	165	82	98	128	128	224	226	101	113	184	184	238	238	190	192
316	LUS	32	8	4	20	0	162	150	177	179	129	133	99	99	97	99	236	246	146	160	132	134	165	167	88	88	126	128	226	226	101	111	178	184	240	240	190	208
317	LUS	32	10	6	16	0	150	150	177	183	129	131	107	109	97	107	236	246	150	160	134	140	157	165	88	88	128	128	224	224	101	111	184	184	226	240	188	190

318	LUS	32	9	6	17	0	162	150	177	183	129	133	99	103	97	107	244	252	146	160	140	142	165	167	88	98	126	128	224	224	111	111	184	184	226	236	188	192
319	LUS	32	5	8	18	1	160	150	175	177	129	135	99	103	97	105	236	242	146	160	134	134	167	167	88	98	126	128	220	226	111	115	178	184	238	240	190	192
320	LUS	18	7	5	5	1	166	150	179	187	133	135	107	109	97	99	244	246	152	160	136	142	157	157	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
321	LUS	18	4	6	7	1	150	150	183	187	129	131	91	107	89	107	236	244	150	160	134	136	159	165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
322	LUS	32	11	7	14	0	164	158	177	179	133	133	99	103	95	99	248	252	146	160	132	140	161	165	82	98	128	128	226	226	97	111	184	184	232	240	192	192
323	LUS	32	8	8	15	1	158	150	177	183	129	131	95	109	91	107	244	246	146	150	138	142	157	161	88	98	126	128	238	238	105	113	184	184	238	240	208	208
324	LUS	32	9	4	17	2	160	160	181	183	133	133	101	103	99	99	246	246	146	146	132	142	167	167	82	88	120	128	220	224	101	107	176	184	238	240	190	190
325	LUS	32	13	3	16	0	168	168	177	183	129	133	95	103	103	107	244	244	152	152	140	140	165	167	88	88	120	128	218	224	101	101	178	178	240	240	190	208
326	LUS	32	12	3	17	0	150	150	177	179	129	135	103	103	103	107	244	252	146	150	134	134	157	167	88	88	128	128	224	224	101	101	178	178	240	240	190	208
327	LUS	32	10	3	19	0	164	150	181	183	129	129	95	103	107	107	236	252	146	152	134	140	165	167	88	88	128	128	218	224	101	115	178	178	240	240	194	208
328	LUS	32	11	5	16	0	160	158	183	183	133	133	95	97	101	107	246	254	150	150	140	140	157	165	82	88	128	128	224	238	105	115	184	184	238	240	190	194
329	LUS	32	8	5	19	0	150	150	179	183	129	135	103	109	99	107	236	240	150	150	134	140	159	167	88	98	126	128	218	226	101	101	178	184	238	240	192	208
330	LUS	32	12	4	16	0	168	160	179	183	129	133	109	109	107	107	236	254	150	150	140	140	167	167	88	88	128	128	226	238	101	115	184	184	238	240	190	190
331	LUS	32	9	3	20	0	162	158	177	183	133	133	97	103	99	101	252	254	150	150	138	140	165	165	82	88	128	128	238	238	101	101	178	184	238	240	190	208
332	LUS	32	10	7	15	0	168	164	177	183	129	135	97	103	89	89	248	252	150	152	132	134	159	167	88	88	120	128	218	228	115	121	178	192	240	240	188	208
333	LUS	32	7	7	18	0	168	164	183	183	129	135	103	103	89	99	236	248	146	150	132	134	159	159	88	98	120	128	218	224	101	121	178	184	236	238	188	190
334	LUS	32	8	3	21	0	164	150	183	183	129	133	95	107	99	107	236	252	146	150	134	136	167	167	88	88	128	128	224	238	101	101	178	178	238	240	190	208
335	LUS	32	8	6	18	0	162	158	183	183	129	133	99	103	89	107	244	254	150	156	134	136	159	167	88	88	128	128	224	226	101	119	178	184	238	240	188	190
336	LUS	32	11	5	16	0	166	158	177	179	131	135	103	103	99	101	246	248	146	148	132	134	159	165	82	82	128	128	224	226	111	121	178	184	238	238	190	192
337	LUS	32	10	4	18	0	160	160	179	179	133	135	103	103	97	99	246	248	146	150	134	136	157	165	82	82	128	128	224	224	99	101	178	184	238	240	190	192
338	LUS	32	9	8	14	1	158	150	179	183	129	135	95	99	89	97	248	252	146	146	134	138	159	165	82	98	120	128	224	224	99	117	184	184	240	240	192	208
339	LUS	32	8	5	19	0	162	150	177	181	133	133	103	103	89	101	244	248	146	160	136	138	159	165	98	98	120	128	224	238	105	121	178	184	240	240	190	208
340	LUS	32	10	4	17	1	164	150	179	185	129	133	95	99	97	101	246	248	146	150	136	136	167	167	98	98	120	128	218	220	111	113	178	184	240	240	190	194
341	LUS	32	10	3	19	0	168	164	177	181	129	135	103	103	89	99	244	248	150	160	134	134	165	165	88	98	120	128	224	224	101	121	178	184	240	240	190	208
342	LUS	32	11	7	14	0	160	158	177	181	133	133	95	103	101	107	252	252	146	146	132	138	159	165	82	82	128	128	220	226	105	111	184	184	240	240	188	192
343	LUS	32	12	6	14	0	160	158	173	179	133	133	99	103	97	97	236	248	146	146	140	140	159	161	82	88	128	128	224	224	101	101	178	184	240	240	192	208
344	LUS	32	8	4	20	0	166	150	179	181	133	135	103	103	97	101	244	246	146	150	134	136	159	165	82	98	128	128	224	238	115	121	184	184	240	240	190	208
345	LUS	32	8	8	15	1	166	158	173	179	133	135	103	109	97	97	244	248	146	150	134	140	159	167	82	82	126	128	220	224	99	121	178	184	238	242	190	192
346	LUS	32	4	8	18	2	158	150	181	185	133	135	95	103	95	101	246	248	150	150	136	140	167	167	88	98	120	126	220	224	105	113	178	184	240	242	190	194
347	LUS	32	14	5	13	0	162	160	181	183	133	133	97	103	89	107	246	252	148	156	132	142	157	165	82	98	128	128	218	224	111	111	180	182	232	238	194	194
348	LUS	32	12	2	18	0	166	162	183	183	129	133	97	105	99	101	240	252	150	150	134	140	165	165	82	88	128	128	226	238	101	101	184	184	226	240	190	192
349	LUS	32	12	2	18	0	164	162	183	183	133	133	103	103	99	107	246	252	148	148	132	140	159	167	82	98	128	128	238	238	105	121	178	184	238	240	190	194
350	LUS	32	11	5	16	0	160	160	179	183	129	133	99	109	101	103	244	254	146	150	134	136	157	161	88	88	128	128	224	238	101	111	178	178	226	238	192	192
351	LUS	32	16	4	12	0	168	160	183	183	129	129	91	95	89	107	244	252	152	156	132	140	157	157	82	98	128	128	218	224	111	111	178	182	238	238	194	194
352	LUS	32	7	7	18	0	166	160	179	183	133	135	103	107	99	101	236	252	146	146	132	142	157	165	88	94	128	128	218	226	97	101	178	178	238	240	194	194
353	LUS	32	11	3	18	0	166	164	183	183	129	133	103	103	89	101	252	254	146	150	134	134	157	165	88	94	128	128	224	238	101	115	184	184	238	238	194	194
354	LUS	32	8	5	19	0	162	160	181	183	133	135	107	109	101	101	252	252	148	160	134	140	159	167	82	88	128	128	220	226	101	113	184	184	238	240	190	194
355	LUS	32	9	5	17	1	162	158	177	177	133	133	97	103	91	105	252	254	148	152	134	140	159	167	88	88	128	128	224	224	105	121	178	184	238	240	190	194
356	LUS	32	11	0	21	0	162	160	177	177	133	133	99	103	89	101	252	252	146	148	136	140	157	165	88	98	128	128	224	226	111	121	184	184	238	240	190	194
357	LUS	32	12	1	19	0	162	160	177	181	133	133	97	99	101	101	248	252	146	148	136	142	167	167	82	98	128	128	224	238	101	101	184	184	238	240	190	208
358	LUS	32	6	0	26	0	162	160	181	183	129	133	103	103	97	99	246	252	148	150	132	140	165	167	82	98	128	128	224	238	101	121	178	184	238	240	190	194
359	LUS	32	9	4	19	0	150	150	177	177	129	133	91	103	89	99	236	246	146	152	136	136	167	167	98	100	120	128	224	226	101	121	184	184	240	240	194	208
360	LUS	32	14	2	16	0	168	168	177	177	129	133	97	103	89	89	248	248	146	152	136	140	167	167	98	98	128	128	224	226	101	121	184	184	240	240	188	212
361	LUS	32	8	3	20	1	168	150	177	177	133	133	91	103	99	99	252	252	146	152	136	140	165	167	88	98	120	128	218	226	117	121	184	192	240	240	190	208
362	LUS	32	12	0	19	1	166	150	177	177	133	133	97	103	89	97	240	248	146	152	136	140	167	167	88	88	128	128	218	224	117	121	178	184	238	240	190	194
363	LUS	32	6	6	20	0	164	160	179	183	129	133	103	109	97	107	244	252	146	156	134	140	159	167	88	88	128	128	224	226	97	115	178	184	238	240	188	190
364	LUS	32	10	4	18	0	160	160	177	183	133	133	99	109	97	99	252	252	146	146	132	132	161	167	82	88	128	128	224	226	111	115	184	192	238	240	188	190
365	LUS	32	7	8	17	0	168	160	175	183	133	135	103	103	89	97	252	252	146	160	132	132	161	167	88	98	128	128	224	226	97	99	178	192	226	238	192	208

366	LUS	32	11	5	16	0	160	160	175	183	133	133	103	103	89	101	246	252	148	152	134	136	161	167	82	98	128	128	224	224	115	119	178	180	238	240	190	192
367	LUS	32	10	5	17	0	162	150	183	183	133	135	95	99	99	107	246	246	150	152	134	142	159	167	88	98	128	128	224	226	101	113	184	184	226	240	192	194
368	LUS	32	9	4	19	0	166	158	183	183	129	133	95	99	99	99	248	252	146	148	132	136	159	165	88	98	128	128	218	226	99	113	178	184	238	240	192	208
369	LUS	32	8	4	20	0	166	158	177	183	129	133	95	99	101	105	246	252	146	150	132	140	165	167	88	88	128	128	226	228	101	113	178	184	238	238	192	192
370	LUS	32	4	5	22	1	166	150	181	183	129	133	95	103	97	101	252	252	146	152	132	140	159	167	88	88	120	128	224	226	107	113	178	184	238	240	188	188
371	LUS	32	11	3	17	1	166	160	183	183	133	133	99	103	89	101	244	246	146	156	132	132	165	167	82	88	128	128	226	228	97	103	184	184	238	240	194	208
372	LUS	32	13	4	15	0	166	164	183	183	129	135	99	99	101	101	252	252	146	156	134	140	167	167	82	88	128	128	226	228	101	101	184	184	236	238	192	208
373	LUS	32	11	3	18	0	160	150	177	183	133	133	99	103	89	99	252	252	150	152	132	136	165	167	82	88	128	128	218	228	97	99	184	184	240	240	192	208
374	LUS	32	10	4	18	0	164	162	177	183	133	133	97	99	89	105	236	252	150	152	132	138	165	167	82	88	128	128	224	228	101	113	184	184	238	240	194	208
375	LUS	32	10	4	17	1	164	158	177	183	133	135	95	99	101	101	246	252	146	146	132	140	165	167	88	88	128	128	226	228	101	107	184	184	238	240	192	192
376	LUS	32	10	11	10	1	164	160	175	179	131	135	95	99	101	105	248	252	150	154	134	140	157	165	82	82	128	128	218	228	99	113	180	186	236	238	192	192
377	LUS	32	9	5	18	0	168	158	177	183	129	133	95	99	99	99	248	252	148	148	132	136	165	167	82	98	128	128	224	226	105	113	178	184	238	238	188	188
378	LUS	32	15	1	16	0	168	160	181	183	133	133	97	103	99	107	236	246	148	150	136	136	167	167	82	88	128	128	218	226	101	101	178	178	238	240	192	192
379	LUS	32	7	2	23	0	162	150	177	183	129	133	97	103	101	107	236	252	150	152	134	140	165	167	82	98	128	128	226	238	113	115	178	184	238	240	192	208
380	LUS	32	7	8	16	1	166	162	177	183	129	131	95	103	99	101	252	252	148	152	136	142	161	167	88	88	120	128	224	226	97	115	178	184	224	240	188	192
381	LUS	32	10	4	18	0	160	160	177	183	133	133	95	103	99	101	240	246	150	156	132	132	167	167	82	82	128	128	218	226	105	121	178	184	238	240	188	208
382	LUS	32	13	4	15	0	168	166	177	181	129	129	97	99	89	101	248	252	146	160	140	140	167	167	98	98	128	128	218	238	97	111	178	184	232	238	188	190
383	LUS	32	10	5	17	0	162	160	177	179	129	139	97	103	89	101	240	252	146	156	132	136	167	167	88	100	128	128	218	226	101	121	184	184	240	240	188	192
384	LUS	32	11	5	16	0	162	150	177	177	129	133	97	99	89	99	240	246	146	152	136	140	165	167	88	100	120	128	226	226	121	121	184	192	240	240	188	188
385	LUS	32	10	3	19	0	162	160	177	183	129	133	91	103	89	99	246	248	146	150	140	140	157	165	88	88	128	128	218	224	97	111	184	192	238	240	190	194
386	LUS	32	15	7	10	0	166	160	181	181	133	135	95	95	105	107	248	248	148	154	132	132	165	165	82	82	128	128	224	226	97	111	182	184	238	238	192	192
387	LUS	32	6	4	22	0	162	160	183	183	129	133	95	103	99	101	248	252	146	160	132	140	165	167	88	98	128	128	224	226	97	113	184	192	238	238	190	190
388	LUS	32	10	6	16	0	162	160	181	181	129	133	95	109	101	105	248	248	146	154	132	132	165	167	82	82	126	128	226	226	111	113	178	182	238	240	188	194
389	LUS	32	8	7	17	0	160	158	177	183	131	133	95	103	99	101	240	252	150	156	136	136	157	167	88	88	128	128	218	220	101	101	184	192	232	238	192	194
390	LUS	32	11	5	16	0	166	160	177	183	129	129	99	103	97	101	246	252	156	160	132	132	167	167	88	88	128	128	226	228	121	121	184	192	226	238	192	192
391	LUS	32	10	4	18	0	168	166	177	183	129	133	97	99	89	101	240	252	146	156	134	140	165	167	88	100	128	128	226	226	101	119	184	184	238	240	192	212
392	LUS	32	13	5	14	0	166	162	177	183	129	133	99	109	89	95	246	248	148	156	132	140	167	167	88	88	128	128	226	228	121	121	184	184	226	240	188	194
393	LUS	32	7	5	20	0	166	160	181	183	129	133	95	103	95	99	240	246	146	160	132	132	167	167	88	98	120	128	224	226	121	121	178	184	232	238	192	194
394	LUS	32	12	5	15	0	166	158	181	183	133	133	95	97	101	105	248	252	152	154	140	140	157	167	82	88	128	128	226	226	101	113	182	184	238	238	190	192
395	LUS	32	10	6	16	0	166	166	177	181	129	133	103	103	97	105	246	252	148	160	132	140	157	167	82	88	128	128	218	224	97	119	178	182	232	238	192	208
396	LUS	32	9	10	13	0	160	158	175	177	131	133	95	95	105	105	248	252	154	154	134	140	157	165	82	82	128	128	218	238	97	113	184	184	238	240	192	192
397	LUS	32	10	7	15	0	160	160	177	177	133	135	95	97	99	105	252	252	154	154	132	134	165	165	82	98	128	128	218	238	97	101	182	184	238	238	192	194
398	LUS	32	11	2	19	0	168	150	177	177	133	133	97	103	89	101	248	252	146	148	134	136	157	165	88	88	128	128	224	226	101	115	178	192	238	240	194	194
399	LUS	32	8	5	19	0	166	160	177	181	133	135	97	103	89	99	236	248	146	150	136	138	157	167	82	98	128	128	224	228	101	101	178	184	238	240	190	212
400	LUS	32	6	5	21	0	166	162	177	183	133	135	103	107	89	101	236	252	146	146	132	134	157	167	94	98	120	128	224	226	101	101	178	184	238	240	190	208
401	LUS	32	11	2	19	0	160	160	177	183	133	133	97	103	89	99	244	252	146	148	132	134	167	167	88	98	128	128	218	228	101	113	184	192	238	238	190	190
402	LUS	32	9	2	21	0	160	158	183	183	131	133	97	103	97	101	240	252	146	150	132	134	165	167	98	98	128	128	224	226	101	113	184	184	238	238	192	192
403	LUS	32	7	4	20	1	168	158	177	183	131	133	103	109	89	101	248	252	150	150	132	134	167	167	86	88	128	128	220	226	101	105	178	184	238	240	190	194
404	LUS	32	12	1	19	0	168	168	177	177	133	133	103	103	89	101	248	254	146	150	132	134	167	167	82	88	128	128	224	226	101	113	178	184	238	238	190	192
405	LUS	32	12	3	17	0	150	150	183	183	129	131	103	109	97	107	248	252	146	146	134	142	157	167	82	82	128	128	224	238	105	121	178	184	238	238	192	194
406	LUS	32	7	9	16	0	158	150	175	177	131	133	99	103	89	99	252	254	150	152	138	140	167	167	88	88	128	128	220	224	99	101	178	178	232	238	188	190
407	LUS	32	9	4	19	0	164	150	183	183	133	133	103	103	95	95	244	252	148	148	132	134	167	167	88	88	120	128	224	226	101	113	178	184	232	240	190	194
408	LUS	32	10	3	19	0	166	150	177	183	131	133	97	103	95	101	240	252	146	148	132	134	167	167	88	98	128	128	218	218	101	111	184	192	238	240	190	190
409	LUS	32	8	9	15	0	162	150	177	183	131	135	103	103	107	107	240	252	160	160	134	138	159	167	98	98	128	128	224	226	99	119	184	192	238	240	190	190
410	LUS	32	12	7	13	0	168	162	173	183	129	131	97	103	103	107	252	252	146	152	140	142	167	167	88	88	128	128	218	218	99	113	184	192	238	240	188	192
411	LUS	32	8	7	17	0	158	150	177	179	133	133	103	109	95	101	244	252	146	146	134	140	167	167	88	98	128	128	218	218	99	115	178	184	236	240	188	190
412	LUS	32	8	4	20	0	150	150	177	181	133	133	97	103	99	101	244	252	146	152	138	140	165	167	88	98	120	128	218	224	99	105	178	178	240	240	190	208
413	LUS	32	7	8	17	0	162	150	175	177	129	131	103	103	97	99	246	252	160	160	134	134	157	167	88	98	128	128	220	224	113	119	180	184	232	240	190	192

414	LUS	32	8	6	18	0	160	158	177	181	131	135	103	103	89	97	252	252	146	160	134	142	157	167	88	98	128	128	218	224	101	121	184	184	240	240	188	190
415	LUS	32	7	5	20	0	160	150	177	183	133	133	99	103	97	103	248	252	146	152	134	140	167	167	88	98	128	128	218	220	99	113	178	184	232	240	188	190
416	LUS	32	6	13	12	1	160	150	175	177	135	135	99	103	97	97	246	252	156	160	134	142	167	167	82	98	128	128	220	220	103	119	180	184	230	232	188	194
417	LUS	32	8	6	17	1	166	150	183	183	129	131	103	103	97	107	242	252	146	152	134	142	167	167	88	98	128	128	220	226	121	121	180	184	232	240	190	212
418	LUS	32	7	12	12	1	162	162	175	177	131	133	103	103	89	97	242	244	160	160	132	134	157	167	88	100	128	128	220	226	99	99	180	184	226	232	188	190
419	LUS	32	10	7	15	0	166	162	177	181	131	135	99	103	97	107	252	252	152	160	140	142	167	167	88	88	128	128	224	226	99	121	184	184	232	240	208	212
420	LUS	32	7	7	18	0	160	150	175	177	131	133	103	109	89	101	252	252	146	160	134	138	167	167	88	98	128	128	218	228	113	121	184	184	232	238	188	208
421	LUS	32	10	5	16	1	166	162	177	183	129	129	103	103	99	107	242	252	146	160	134	134	157	167	88	88	128	128	226	228	119	121	180	184	232	240	190	190
422	LUS	32	6	7	19	0	150	150	175	183	129	133	99	103	97	101	246	252	156	160	132	134	159	167	88	88	128	128	220	226	119	121	178	184	226	240	190	192
423	LUS	32	11	6	14	1	160	158	175	177	129	133	99	103	107	107	244	252	146	152	134	134	159	167	98	98	128	128	220	220	103	115	184	184	240	240	194	194
424	LUS	32	10	6	15	1	160	150	173	173	133	133	99	99	101	107	240	252	146	156	134	142	157	157	88	98	128	128	226	228	103	121	184	184	232	238	190	192
425	LUS	32	9	6	17	0	162	160	175	183	131	133	99	103	97	107	252	252	146	146	134	138	167	167	88	98	128	128	220	224	115	121	184	184	226	240	194	194
426	LUS	32	9	4	18	1	150	150	183	183	133	135	99	103	97	97	240	242	156	160	134	138	167	167	88	88	128	128	224	226	101	113	178	184	238	238	190	194
427	LUS	32	10	7	14	1	162	146	181	183	131	135	99	103	97	97	240	244	156	160	134	138	157	167	98	98	128	128	224	226	119	121	184	184	232	240	190	192
428	LUS	32	8	6	18	0	158	150	181	183	131	133	99	103	89	97	244	252	146	152	142	142	167	167	98	98	128	128	224	226	101	121	184	184	226	240	190	212
429	LUS	32	8	8	15	1	160	150	175	183	133	135	99	103	95	97	242	244	146	152	134	142	167	167	98	98	128	128	220	224	99	121	184	184	232	240	192	212
430	LUS	32	8	8	12	4	160	150	177	177	131	135	99	103	97	107	242	246	152	158	132	134	157	159	82	88	126	128	220	220	119	119	176	184	224	240	190	192
431	LUS	32	13	0	19	0	168	164	177	183	129	133	103	103	97	107	244	246	146	150	134	136	157	157	82	98	128	128	224	238	101	111	178	178	238	240	192	208
432	LUS	32	8	8	16	0	166	150	175	175	129	131	103	105	107	107	252	252	148	152	134	140	159	165	88	88	126	128	218	238	97	101	178	184	232	240	190	194
433	LUS	32	10	5	17	0	162	160	175	181	129	133	103	103	99	107	240	252	152	156	134	140	167	167	82	88	126	128	238	238	105	111	180	184	238	240	192	194
434	LUS	32	10	2	20	0	160	160	177	181	133	133	103	103	97	107	248	252	146	156	134	140	167	167	82	88	128	128	238	238	101	105	184	184	238	240	190	194
435	LUS	32	12	7	13	0	160	158	183	183	129	129	103	103	101	103	248	252	152	160	134	134	167	167	88	88	128	128	218	238	121	121	184	192	226	232	188	192
436	LUS	32	10	5	17	0	168	160	177	183	129	131	103	103	101	103	252	252	146	146	134	140	159	167	82	88	128	128	218	220	101	113	184	184	240	240	188	192
437	LUS	32	7	6	18	1	164	160	177	183	131	133	103	103	97	101	240	252	148	156	134	140	161	167	82	88	128	128	226	238	97	97	178	184	224	232	190	192
438	LUS	32	8	4	19	1	160	160	177	177	131	133	103	109	97	99	240	252	150	152	134	136	161	167	88	98	128	128	218	226	97	97	178	184	224	238	190	190
439	LUS	18	4	4	8	2	150	150	173	187	131	133	105	107	107	107	244	252	146	162	132	140	165	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
440	LUS	32	10	6	16	0	162	160	179	183	129	131	97	107	99	101	244	246	146	154	132	134	165	167	82	88	128	128	218	224	101	101	184	184	236	238	188	192
441	LUS	32	8	3	21	0	164	160	179	183	131	133	103	109	101	101	252	252	146	148	132	134	167	167	88	98	128	128	224	224	99	101	178	184	238	240	190	208
442	LUS	32	9	3	20	0	160	158	177	183	133	133	97	103	97	101	244	246	150	154	132	134	165	167	82	88	128	128	224	224	97	101	178	184	238	238	208	208
443	LUS	32	11	3	18	0	160	160	177	181	131	135	103	109	89	99	248	252	146	148	132	134	161	167	82	88	128	128	218	226	113	121	184	184	238	238	190	190
444	LUS	32	6	9	17	0	160	158	179	179	133	139	103	103	99	101	252	252	152	154	132	140	161	161	88	98	128	128	218	226	101	115	178	184	238	238	188	194
445	LUS	32	11	2	19	0	168	160	181	181	129	133	109	109	89	97	248	248	148	148	134	140	167	167	88	98	128	128	224	226	99	113	178	184	232	238	190	208
446	LUS	32	12	4	16	0	168	162	177	183	129	133	95	97	89	99	246	252	150	160	136	142	165	167	88	88	128	128	224	224	111	111	178	178	232	238	192	194
447	LUS	12	2	3	4	3	158	146	183	187	129	137	103	107	97	107	244	246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
448	LUS	12	3	3	4	2	150	146	183	187	129	135	91	107	101	107	244	246	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
449	LUS	12	2	2	6	2	160	158	177	187	133	137	103	109	89	97	244	252	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
450	LUS	18	4	3	9	2	160	158	183	187	129	137	103	109	97	97	246	252	152	160	136	140	157	165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
451	LUS	32	11	5	16	0	168	164	177	183	129	133	109	109	97	101	240	240	146	146	136	138	167	167	82	100	126	128	220	224	101	121	184	192	240	240	190	192
452	LUS	32	12	5	15	0	168	158	183	183	133	133	95	95	101	105	246	248	148	150	134	136	167	167	82	88	128	128	218	224	101	105	184	184	238	240	190	190
453	LUS	32	10	8	13	1	168	162	175	177	129	129	97	103	105	107	238	252	152	152	142	142	159	167	82	100	128	128	220	224	113	121	184	184	232	240	194	208
454	LUS	32	7	6	19	0	168	160	177	177	129	129	103	103	99	105	240	244	150	156	134	136	165	167	88	98	120	128	220	224	99	101	184	184	232	240	190	194
455	LUS	32	7	8	17	0	168	164	175	177	129	133	103	103	105	107	252	252	150	152	134	142	159	167	88	98	120	128	218	220	113	121	180	184	232	240	190	194
456	LUS	32	10	4	18	0	166	160	183	183	129	133	107	109	103	107	248	252	150	150	136	142	165	167	82	88	120	128	224	226	111	121	184	184	240	240	194	208
457	LUS	32	12	3	17	0	168	166	179	181	129	133	103	103	97	107	244	246	150	152	138	140	157	165	88	88	128	128	224	226	101	101	178	178	232	240	190	208
458	LUS	32	13	5	14	0	166	164	183	183	131	133	103	103	105	107	246	248	146	160	132	136	167	167	82	82	120	128	218	226	101	121	178	178	238	238	188	190
459	LUS	32	11	4	17	0	168	162	177	183	131	133	103	103	89	99	240	246	148	152	136	140	157	165	88	100	128	128	218	238	97	101	178	184	238	240	190	212
460	LUS	32	12	3	17	0	160	150	181	183	133	133	101	103	97	107	246	252	146	146	136	138	157	159	82	88	128	128	224	224	111	111	184	184	238	238	190	194
461	LUS	32	12	4	16	0	166	160	181	181	131	135	97	103	89	101	252	252	146	148	138	140	167	167	82	98	128	128	218	226	101	101	184	184	232	238	194	208

462	LUS	32	14	1	17	0	166	162	181	183	129	129	97	97	89	99	252	252	146	146	132	134	167	167	82	98	128	128	224	224	97	111	178	184	238	238	190	208
463	LUS	17	4	2	10	1	166	150	179	183	133	141	103	109	89	97	246	252	0	146	134	136	161	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
464	LUS	32	10	4	18	0	168	150	181	183	131	133	103	109	97	97	246	252	146	156	136	136	167	167	82	98	128	128	220	226	101	101	184	184	232	238	190	208
465	LUS	32	9	4	19	0	164	164	177	183	129	133	95	103	97	99	240	252	150	150	134	134	159	167	88	98	128	128	218	228	111	113	178	184	232	238	190	192
466	LUS	32	12	2	18	0	168	160	181	181	133	133	103	109	97	101	252	252	146	148	140	140	165	167	88	98	128	128	224	224	99	111	184	192	238	238	192	208
467	LUS	32	4	10	16	2	164	158	183	183	135	137	95	103	95	99	240	244	146	150	132	140	161	167	88	98	128	128	220	224	97	99	178	184	232	240	184	194
468	LUS	32	10	2	20	0	168	160	177	181	129	139	97	103	89	101	248	252	146	148	134	140	165	167	98	98	128	128	218	226	101	113	184	184	238	240	188	192
469	LUS	32	5	9	18	0	168	162	183	183	129	131	103	103	89	97	236	252	146	160	132	138	159	167	88	98	120	128	224	238	101	119	178	184	236	238	188	190
470	LUS	32	15	2	15	0	168	150	183	183	131	133	97	103	99	103	246	246	150	150	136	136	157	165	82	98	128	128	218	224	101	101	178	178	238	238	192	194
471	LUS	32	12	4	16	0	162	158	177	183	129	133	91	97	89	89	240	248	150	150	134	140	167	167	88	98	120	128	218	224	101	111	178	178	240	240	188	194
472	LUS	32	8	5	19	0	164	160	181	183	129	133	109	109	99	101	252	252	146	156	132	134	167	167	88	94	128	128	238	238	97	105	178	178	238	240	188	208
473	LUS	32	8	3	21	0	164	160	181	183	133	133	103	109	99	101	252	252	154	160	134	134	167	167	88	94	128	128	226	238	101	113	178	178	238	240	194	208
474	LUS	32	9	3	20	0	168	166	181	183	129	133	103	103	97	97	236	252	146	146	134	140	167	167	82	98	120	128	220	224	113	121	184	184	238	238	194	208
475	LUS	32	13	5	14	0	164	162	183	183	129	133	91	109	89	107	248	252	150	156	134	138	167	167	88	98	128	128	218	238	101	101	178	192	240	240	188	192
476	LUS	32	9	2	20	1	160	150	183	183	133	133	95	111	99	101	248	252	146	150	140	142	167	167	88	88	128	128	218	224	101	113	178	184	238	238	192	208
477	LUS	32	9	4	19	0	162	160	177	183	131	133	103	103	99	99	246	252	152	156	134	136	159	165	88	98	128	128	224	238	97	113	184	184	238	238	190	192
478	LUS	32	4	7	21	0	168	168	177	183	133	139	91	103	97	99	246	252	146	150	140	142	159	167	88	100	120	128	218	238	101	113	178	192	238	240	190	208
479	LUS	32	12	5	15	0	166	164	177	177	129	129	99	103	97	101	244	252	156	160	134	134	159	167	82	88	128	128	220	226	121	121	184	184	238	238	188	208
480	LUS	32	6	8	17	1	158	150	173	177	129	133	103	103	97	97	242	252	152	156	134	138	159	167	88	88	128	128	218	226	97	99	180	184	238	240	190	194
481	LUS	32	12	3	17	0	168	160	177	177	129	133	97	103	99	107	236	246	150	150	134	134	167	167	88	88	128	128	218	218	101	121	178	182	232	238	190	194
482	LUS	32	11	3	18	0	168	150	183	183	129	133	97	99	103	105	244	252	150	150	136	136	157	165	88	88	126	128	224	226	101	121	184	184	238	240	190	190
483	LUS	32	9	3	20	0	160	160	177	183	133	135	99	103	107	107	236	246	146	152	134	136	157	167	82	88	128	128	224	238	101	115	178	184	238	240	190	194
484	LUS	32	7	7	17	1	168	158	177	179	133	137	97	103	99	99	236	246	146	152	138	140	167	167	82	88	120	128	224	238	101	121	180	184	238	240	190	192
485	LUS	32	13	3	16	0	168	160	177	183	129	133	99	103	103	107	236	240	150	150	136	142	165	167	82	98	128	128	218	224	111	111	178	178	240	240	190	190
486	LUS	22	7	2	12	1	0	0	177	183	129	129	99	103	0	0	236	252	150	150	136	136	157	159	88	98	128	128	238	238	0	0	0	0	0	0	194	210
487	LUS	32	9	4	18	1	150	150	183	183	129	133	103	109	105	107	244	244	150	152	136	140	165	167	88	98	120	128	226	226	101	119	178	192	240	242	190	190
488	LUS	32	7	3	22	0	168	160	173	177	129	133	99	103	99	99	248	252	146	160	132	142	165	167	88	98	128	128	226	238	101	101	184	184	238	240	194	208
489	LUS	32	8	3	21	0	160	160	173	183	131	133	103	103	97	101	246	252	146	146	134	138	157	167	88	98	128	128	224	226	101	101	178	184	238	240	208	208
490	LUS	32	8	4	20	0	160	160	179	183	133	135	99	103	101	101	246	248	152	160	136	142	165	167	98	98	128	128	224	238	101	121	178	184	238	240	194	208
491	LUS	32	15	2	15	0	160	160	183	183	133	133	97	97	103	107	246	252	150	150	136	136	157	165	82	82	128	128	218	224	99	101	178	184	238	240	192	194
492	LUS	32	12	4	16	0	168	160	177	183	131	133	97	109	97	97	236	248	146	146	134	136	167	167	88	88	128	128	220	226	105	111	184	184	238	240	192	194
493	LUS	32	8	5	19	0	162	160	181	183	129	131	99	109	97	99	248	252	146	154	134	134	165	167	88	88	128	128	226	226	97	121	178	192	232	238	190	194
494	LUS	32	13	3	16	0	162	150	183	183	133	135	97	109	97	103	246	246	150	150	132	136	157	159	82	82	128	128	224	238	101	113	178	178	238	240	190	190
495	LUS	32	4	6	21	1	160	158	177	183	129	131	91	103	89	99	236	252	146	150	136	136	165	167	88	98	128	128	218	224	119	121	178	184	226	242	190	194
496	LUS	32	13	3	16	0	162	158	183	183	129	139	103	103	89	97	246	248	148	148	132	134	157	167	82	98	120	128	218	226	113	113	178	184	238	238	190	194
497	LUS	32	13	2	17	0	168	166	177	183	129	133	103	103	89	101	246	248	146	146	134	140	167	167	82	98	126	126	226	226	101	101	178	178	238	240	192	194
498	LUS	32	11	1	20	0	166	164	183	183	129	129	99	103	97	101	252	252	146	148	136	140	165	167	82	88	128	128	226	226	115	121	178	184	238	238	194	208
499	LUS	32	10	6	16	0	160	158	173	177	131	139	103	103	97	99	240	246	148	150	132	132	157	157	88	98	120	120	224	224	101	111	184	184	238	240	190	208
500	LUS	32	11	0	21	0	160	150	177	183	133	133	99	109	99	101	246	252	146	148	132	140	165	167	82	88	128	128	218	238	121	121	184	184	238	238	190	208
501	LUS	32	9	1	22	0	160	160	181	183	133	133	103	107	99	101	248	252	146	146	132	140	167	167	88	88	128	128	238	238	101	113	178	184	238	240	192	194
502	LUS	32	10	7	15	0	160	150	173	173	131	131	103	103	99	101	240	246	148	150	132	132	157	167	98	100	120	120	224	226	111	113	184	184	238	238	192	208
503	LUS	32	11	1	20	0	160	160	177	181	129	129	97	103	101	101	248	252	146	146	132	134	167	167	82	88	128	128	224	226	101	113	182	184	238	238	192	208
504	LUS	32	11	6	15	0	166	166	177	179	129	129	95	97	101	101	248	252	146	160	132	134	167	167	82	82	128	128	224	226	101	119	178	192	232	238	208	208
505	LUS	32	6	2	23	1	160	150	173	177	129	131	99	103	97	99	248	252	146	150	136	140	167	167	88	98	128	128	218	224	101	121	184	184	240	242	190	194
506	LUS	24	8	0	15	1	0	0	181	183	129	133	103	109	89	101	246	252	146	150	134	134	165	167	82	98	128	128	238	238	0	0	0	0	0	0	192	210
507	LUS	32	7	7	17	1	168	158	177	179	129	137	97	107	99	107	236	240	146	150	136	136	157	167	88	88	128	128	226	238	101	105	178	184	236	238	190	208
508	LUS	32	11	0	21	0	162	160	177	183	133	133	103	103	99	107	244	252	146	152	132	134	157	167	98	98	128	128	218	224	113	121	184	184	238	240	194	208
509	LUS	32	11	1	20	0	164	164	183	183	129	129	103	103	97	101	244	252	146	146	132	140	161	167	88	88	128	128	218	224	121	121	178	184	238	240	194	208

510	LUS	32	11	4	16	1	162	150	177	183	129	129	91	97	97	101	248	252	146	160	132	136	167	167	82	82	126	128	218	226	111	119	176	176	238	240	192	208
511	LUS	12	7	1	3	1	164	158	183	183	129	141	109	109	97	107	240	244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
512	LUS	32	9	4	19	0	164	150	177	181	129	133	97	103	89	101	240	248	146	156	132	136	165	167	82	100	120	128	224	226	121	121	184	184	238	240	188	192
513	LUS	32	11	2	19	0	162	150	181	183	129	133	99	99	89	99	252	252	146	152	134	140	157	165	82	98	128	128	218	224	97	121	184	184	238	240	194	212
514	LUS	32	11	2	19	0	168	150	177	183	133	133	97	109	89	97	240	252	146	146	134	140	165	167	88	100	128	128	226	228	121	121	184	184	238	240	194	194
515	LUS	32	9	8	14	1	166	150	177	177	135	135	91	99	99	101	244	254	146	146	140	140	161	167	88	98	120	128	226	226	101	103	184	184	232	240	188	192
516	LUS	32	12	5	14	1	164	150	177	183	133	133	95	103	89	101	240	246	152	160	132	132	167	167	82	94	128	128	226	238	99	113	178	178	236	242	192	208
517	LUS	32	6	7	19	0	168	150	177	183	129	135	91	103	89	95	240	254	146	146	132	140	157	165	98	100	128	128	226	238	101	113	178	184	236	240	188	208
518	LUS	32	9	5	18	0	160	160	177	183	133	135	91	91	97	99	252	252	148	150	134	134	167	167	88	98	128	128	226	226	121	121	178	192	240	240	188	190
519	LUS	32	9	7	16	0	166	162	173	183	129	131	97	103	89	105	240	248	146	146	134	136	159	167	88	88	120	128	224	238	97	105	178	184	238	240	194	194
520	LUS	32	8	6	18	0	164	150	179	183	129	133	103	109	95	97	246	252	150	156	134	134	161	167	88	88	128	128	224	228	113	121	178	184	230	240	192	192
521	LUS	32	10	7	15	0	168	160	183	183	135	135	95	109	99	103	246	248	146	150	132	134	159	159	82	98	128	128	224	238	101	111	184	184	226	238	190	192
522	LUS	32	8	3	19	2	162	150	179	181	129	129	99	103	101	103	244	252	150	160	136	140	163	167	82	88	128	128	218	238	101	113	178	184	224	240	190	192
523	LUS	32	8	7	17	0	164	160	177	183	129	133	97	103	99	101	244	254	150	150	134	134	159	161	98	100	128	128	220	226	99	101	184	184	232	238	192	208
524	LUS	32	11	2	19	0	162	160	177	183	133	133	97	103	101	107	248	252	148	150	132	140	167	167	88	88	128	128	224	238	111	113	178	184	236	238	192	212
525	LUS	32	4	9	18	1	164	160	177	183	129	133	103	109	99	105	236	244	146	150	136	146	159	161	88	98	120	128	224	226	101	111	178	192	226	232	188	208
526	LUS	32	9	4	19	0	150	150	175	177	129	133	103	103	99	101	244	244	146	146	140	140	159	165	88	98	120	128	224	224	111	113	178	184	240	240	188	194
527	LUS	32	7	10	15	0	160	158	177	183	129	135	109	109	103	107	236	254	146	160	132	140	157	167	98	98	120	128	224	224	105	113	178	184	240	240	188	188
528	LUS	32	7	1	23	1	164	160	177	183	129	133	103	103	99	107	224	252	146	146	132	136	165	167	94	98	128	128	224	226	101	113	178	178	238	240	192	208
529	LUS	32	12	2	18	0	168	150	177	177	129	129	103	103	97	99	236	240	146	146	132	132	165	167	98	98	128	128	218	224	101	113	184	184	226	240	192	208
530	LUS	32	12	2	18	0	166	150	177	183	129	129	99	103	99	99	244	246	146	146	136	140	159	167	82	88	120	128	226	226	113	113	178	184	238	238	208	208
531	LUS	32	8	4	20	0	160	158	181	183	133	133	99	103	97	99	252	252	146	160	134	136	159	167	82	98	128	128	218	238	101	115	184	184	238	240	192	194
532	LUS	32	8	6	18	0	160	158	179	183	131	133	99	99	99	107	246	252	146	150	136	140	159	159	82	88	128	128	218	238	101	115	178	184	238	238	190	194
533	LUS	24	11	3	9	1	168	164	183	183	135	141	109	109	89	99	246	252	150	150	132	140	157	159	82	98	120	128	0	0	101	101	0	0	0	0	0	0
534	LUS	32	11	5	16	0	168	150	183	183	129	135	99	109	99	99	236	244	150	160	136	136	167	167	88	98	128	128	226	238	101	115	178	178	226	238	192	208
535	LUS	32	12	7	13	0	168	168	177	179	129	135	97	107	89	107	246	246	150	150	136	138	167	167	98	100	128	128	218	220	101	113	184	184	238	240	188	208
536	LUS	32	12	5	15	0	150	150	183	183	129	135	109	109	89	99	236	244	150	156	134	140	167	167	88	98	128	128	224	224	111	115	178	192	240	240	208	208
537	LUS	32	11	2	19	0	166	164	177	181	133	133	95	103	99	101	248	252	146	154	140	140	157	167	82	82	128	128	218	226	113	121	178	184	238	240	192	208
538	LUS	32	8	3	20	1	158	150	177	183	129	133	97	103	101	107	248	252	150	160	134	146	159	167	82	88	128	128	226	226	113	121	184	184	238	240	192	194
539	LUS	32	6	6	20	0	162	150	177	183	133	133	103	103	95	101	244	248	146	156	134	136	165	167	88	98	120	128	224	228	105	121	178	184	226	240	192	208
540	LUS	32	13	4	15	0	166	150	183	183	133	133	103	103	101	105	248	252	148	156	132	134	167	167	82	98	128	128	218	224	97	121	184	184	232	238	192	192
541	LUS	32	11	4	17	0	164	162	177	181	129	129	103	109	89	99	252	254	150	156	134	136	167	167	82	88	128	128	218	224	97	101	178	184	238	238	192	212
542	LUS	32	12	1	19	0	162	160	177	181	133	139	103	103	97	101	240	252	146	150	140	140	165	165	82	88	128	128	224	224	111	111	178	178	238	240	192	208
543	LUS	32	13	3	16	0	162	150	183	183	129	133	91	95	89	99	252	252	146	146	132	140	157	167	82	82	128	128	224	224	111	113	178	178	232	238	190	190
544	LUS	32	13	4	15	0	168	150	183	183	135	139	103	103	101	101	244	244	152	152	134	134	157	167	88	98	126	128	218	218	101	115	178	184	238	240	190	192
545	LUS	32	9	4	18	1	168	164	183	183	133	135	95	103	99	107	248	252	146	150	134	140	159	167	88	98	128	128	218	238	103	113	184	184	226	240	190	192
546	LUS	32	12	3	17	0	168	150	183	183	133	133	103	109	89	107	236	252	150	150	134	134	159	167	88	98	128	128	218	238	101	113	184	184	226	240	194	194
547	LUS	32	10	5	17	0	160	158	177	177	131	133	109	109	101	107	248	252	146	156	132	132	167	167	88	88	128	128	226	226	97	113	178	184	238	240	188	194
548	LUS	32	12	2	18	0	162	150	183	183	133	133	103	103	89	97	246	252	150	152	132	142	165	167	82	88	128	128	218	238	99	101	184	184	238	238	190	208
549	LUS	32	9	4	19	0	168	160	177	181	129	133	103	109	89	99	252	252	150	156	134	142	159	167	88	88	128	128	218	220	101	121	184	184	238	238	194	208
550	LUS	32	15	2	14	1	166	162	177	183	129	129	95	111	99	99	240	248	148	148	136	140	167	167	82	82	128	128	224	226	105	111	178	184	238	238	190	192
551	LUS	32	6	6	20	0	162	160	183	183	129	135	101	103	95	97	246	252	148	160	134	136	159	167	88	98	128	128	224	226	101	113	184	192	240	240	190	194
552	LUS	32	9	5	18	0	168	162	181	183	129	133	99	103	95	99	246	252	148	148	140	142	159	165	88	98	128	128	224	238	101	111	184	192	232	240	192	208
553	LUS	32	11	3	18	0	168	160	183	183	129	135	103	109	99	107	246	252	150	150	134	140	165	167	82	88	126	128	224	224	111	115	184	184	240	240	194	208
554	LUS	32	10	2	20	0	168	150	181	183	129	133	103	109	99	101	240	246	146	148	136	140	165	167	82	100	128	128	218	224	111	111	184	192	238	240	190	194
555	LUS	32	10	3	19	0	160	150	183	183	129	135	101	109	97	99	246	246	148	150	132	136	165	167	82	82	128	128	224	226	101	115	184	184	240	240	194	208
556	LUS	32	9	6	17	0	168	168	177	183	135	139	103	109	101	107	240	252	146	150	134	142	165	167	88	100	128	128	218	224	111	115	178	192	238	240	194	194
557	LUS	32	9	2	21	0	150	150	177	183	129	133	99	103	97	101	252	252	146	160	134	136	167	167	88	88	128	128	226	226	101	121	184	184	232	238	194	194

558	LUS	32	12	2	18	0	160	160	181	183	131	133	103	103	97	107	252	252	146	152	136	136	157	167	82	88	128	128	224	224	97	121	184	184	238	238	194	208
559	LUS	32	6	3	23	0	158	150	177	183	129	139	103	109	89	97	240	252	146	148	136	140	167	167	88	94	128	128	224	226	101	113	178	184	238	240	190	194
560	LUS	32	12	4	16	0	168	160	183	183	133	135	97	103	97	101	244	248	152	152	134	134	167	167	88	98	126	128	224	226	101	101	180	192	238	238	194	194
561	LUS	32	12	5	15	0	168	160	177	177	133	133	103	103	97	107	252	252	148	152	140	142	159	161	88	88	128	128	218	224	99	113	184	184	238	240	188	190
562	LUS	32	7	5	20	0	166	160	179	179	133	135	103	103	101	101	246	252	146	150	132	138	167	167	88	98	128	128	226	238	99	113	178	184	238	238	190	194
563	LUS	32	9	7	16	0	160	158	183	183	133	133	95	103	89	105	244	254	146	146	134	134	167	167	88	100	126	128	224	238	101	111	178	184	240	240	188	208
564	LUS	32	9	5	18	0	168	160	181	181	129	133	95	95	101	101	246	252	152	160	132	136	165	167	82	88	128	128	226	226	97	121	178	184	232	238	190	192
565	LUS	32	10	5	17	0	166	160	179	181	133	135	97	105	89	99	240	252	150	156	136	140	167	167	82	100	128	128	224	238	101	101	178	184	238	240	192	192
566	LUS	32	9	5	18	0	162	160	177	183	129	129	109	109	97	99	246	252	146	146	132	140	159	165	82	88	128	128	224	228	99	111	178	192	238	240	188	208
567	LUS	18	5	3	9	1	158	150	177	183	133	141	91	91	89	99	252	252	150	152	140	140	167	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
568	LUS	32	10	0	22	0	168	162	177	183	129	133	97	109	89	99	240	244	146	152	134	140	165	167	88	98	128	128	224	238	101	121	178	184	240	240	194	208
569	LUS	32	7	8	16	1	160	160	177	183	133	139	101	109	95	101	252	252	146	160	138	142	167	167	82	100	128	128	226	228	101	113	184	184	224	240	194	208
570	LUS	32	9	3	20	0	162	158	181	183	133	133	95	97	97	101	252	252	146	148	132	136	161	167	82	88	128	128	224	238	101	113	178	184	240	240	190	190
571	LUS	32	7	4	20	1	162	150	183	183	129	133	91	97	99	101	238	252	146	150	136	138	157	167	82	88	128	128	224	226	97	101	184	184	226	240	190	194
572	LUS	32	7	5	20	0	166	160	177	181	129	139	97	109	99	101	240	248	150	156	136	138	167	167	88	98	128	128	224	238	97	113	180	184	238	240	194	208
573	LUS	32	7	4	21	0	168	160	181	183	131	133	103	103	99	101	248	252	150	156	136	142	167	167	98	98	120	128	224	224	101	113	178	178	238	240	194	208
574	LUS	32	8	6	18	0	160	150	177	177	133	135	103	103	101	107	240	246	160	160	134	134	165	167	88	98	128	128	224	226	101	113	192	192	226	240	192	208
575	LUS	32	11	3	17	1	150	150	177	177	133	133	91	99	99	99	246	246	152	152	132	140	161	167	82	98	120	128	224	238	101	111	176	184	238	240	190	208
576	LUS	32	8	3	21	0	162	160	173	181	133	133	97	103	99	101	244	248	150	152	132	140	165	167	88	88	128	128	224	238	101	113	178	184	226	240	188	190
577	LUS	32	9	2	21	0	166	160	181	183	133	133	95	103	101	105	240	248	148	150	132	140	165	165	82	88	128	128	224	226	101	113	184	184	238	240	190	194
578	LUS	32	12	2	18	0	168	166	177	183	129	131	97	103	89	105	240	246	146	152	140	140	167	167	88	98	128	128	226	238	121	121	178	184	238	240	194	194
579	LUS	32	13	3	16	0	168	162	177	183	129	129	91	109	89	99	240	246	146	146	132	138	157	165	82	100	128	128	224	226	101	111	178	184	238	240	192	208
580	LUS	32	12	5	15	0	168	166	177	183	129	133	97	99	89	101	244	248	146	152	140	140	159	167	98	98	128	128	226	238	101	101	184	192	232	240	188	212
581	LUS	32	12	4	16	0	166	158	183	183	129	129	103	103	97	101	240	244	146	150	132	136	161	161	94	98	128	128	224	226	101	111	178	178	240	240	192	192
582	LUS	32	8	3	21	0	166	150	177	183	129	133	97	103	89	101	240	240	146	146	134	140	165	167	94	100	128	128	220	226	101	121	178	184	238	240	194	194
583	LUS	32	10	2	19	1	168	162	183	183	129	133	99	103	89	97	224	252	146	156	132	134	165	167	82	88	128	128	218	226	101	101	184	184	238	240	208	212
584	LUS	32	12	1	19	0	162	160	181	183	133	133	103	109	99	107	248	252	148	150	136	140	157	167	88	88	128	128	218	226	101	113	178	178	236	238	192	194
585	LUS	32	11	1	19	1	168	160	177	181	133	133	97	103	101	101	240	252	150	152	132	134	165	167	82	82	128	128	224	238	107	111	178	184	232	240	190	192
586	LUS	32	12	2	17	1	168	162	177	177	129	129	91	103	97	101	236	248	146	146	132	140	165	167	82	98	128	128	218	218	101	111	176	184	240	240	194	208
587	LUS	32	9	3	17	3	162	158	183	183	129	133	103	103	89	97	224	240	146	150	132	140	159	167	82	88	128	128	218	224	111	113	176	184	240	242	188	208
588	LUS	32	13	0	19	0	162	150	177	177	129	129	97	103	101	107	246	248	146	150	136	140	157	167	82	88	128	128	218	224	111	113	178	184	238	240	194	194
589	LUS	32	11	6	15	0	164	162	177	181	129	131	99	107	95	99	244	244	150	150	136	142	167	167	98	98	120	128	218	238	111	121	178	180	238	240	194	194
590	LUS	32	11	2	19	0	168	160	183	183	133	133	95	97	99	101	252	252	148	150	136	140	167	167	82	88	128	128	224	226	101	101	184	184	238	240	188	190
591	LUS	32	12	4	16	0	158	150	183	183	133	133	97	97	89	101	240	248	146	146	132	134	167	167	88	100	120	128	218	226	113	121	178	184	238	238	188	192
592	LUS	32	11	3	17	1	164	164	177	183	129	129	103	103	95	97	244	252	146	152	140	142	165	167	82	82	128	128	224	226	111	113	178	178	224	240	190	212
593	LUS	32	12	3	17	0	168	162	181	183	129	133	99	109	89	95	244	246	148	152	132	140	165	167	88	88	128	128	224	226	121	121	178	184	226	240	188	194
594	LUS	12	7	2	2	1	164	158	177	177	135	141	103	103	89	89	240	244	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
595	LUS	32	9	0	23	0	168	150	181	183	133	133	103	103	99	101	248	252	148	150	132	136	165	165	88	98	128	128	224	224	101	121	178	184	238	240	192	208
596	LUS	32	14	2	16	0	166	164	183	183	129	129	103	103	101	101	246	246	146	150	134	134	157	167	82	88	128	128	226	228	101	121	184	184	232	240	192	208
597	LUS	32	9	3	20	0	160	160	179	181	129	135	109	109	99	101	236	246	148	150	134	140	165	167	82	98	128	128	218	224	101	113	178	184	238	238	194	208
598	LUS	32	8	8	14	2	160	158	183	183	131	133	95	95	97	105	236	244	150	156	134	140	157	163	88	88	128	128	218	226	101	117	180	184	238	238	190	192
599	LUS	32	10	6	16	0	168	158	181	183	133	135	103	109	101	107	248	252	146	160	132	132	157	167	82	88	128	128	218	224	99	105	184	184	232	238	190	194
600	LUS	32	8	7	17	0	158	158	181	183	133	135	95	95	97	97	244	252	148	156	132	134	157	167	88	98	128	128	224	224	101	105	184	184	238	238	190	194
601	LUS	32	9	3	18	2	168	166	177	183	129	133	95	99	89	97	238	248	146	152	138	140	165	167	88	98	120	128	218	224	103	111	178	184	240	240	190	208
602	LUS	32	7	6	19	0	168	150	177	181	129	129	91	91	101	103	236	252	146	146	134	140	167	167	88	98	120	120	218	224	101	101	178	184	240	240	190	194
603	LUS	32	7	4	21	0	166	160	177	183	129	135	91	103	97	99	244	254	146	148	134	136	167	167	98	98	128	128	218	226	101	121	178	184	238	240	188	190
604	LUS	32	11	2	19	0	160	150	177	177	129	129	97	109	89	101	248	252	146	152	134	140	159	165	82	98	120	128	224	224	111	121	178	184	238	240	190	190
605	LUS	32	10	2	19	1	168	160	177	181	133	135	109	109	101	101	252	252	148	160	134	134	157	167	82	88	128	128	224	226	101	113	176	184	238	240	190	194

606	LUS	32	9	7	16	0	166	162	177	177	129	135	91	99	99	101	252	254	146	146	140	140	159	159	88	88	128	128	226	226	101	121	184	192	232	240	190	208
607	LUS	32	11	3	18	0	164	150	177	181	129	129	97	103	99	99	246	252	150	150	138	138	167	167	88	98	128	128	218	218	97	101	178	184	238	240	192	208
608	LUS	32	9	5	18	0	160	160	177	183	129	133	95	99	97	99	246	252	148	148	132	136	167	167	88	100	120	128	224	224	105	113	184	184	238	240	188	192
609	LUS	32	10	3	19	0	168	162	177	183	129	129	103	109	89	97	248	252	146	156	132	134	165	167	88	88	128	128	218	224	101	101	184	192	238	240	188	208
610	LUS	32	4	8	19	1	160	150	179	183	129	133	103	105	97	105	236	252	146	160	134	140	159	167	88	98	128	128	218	224	103	115	184	184	226	240	190	190
611	LUS	32	13	6	13	0	162	162	177	181	131	133	99	109	97	97	240	246	146	160	132	138	159	159	82	98	128	128	218	238	111	119	184	184	238	240	190	190
612	LUS	32	10	6	16	0	158	158	177	177	133	135	97	103	89	101	248	252	150	160	134	136	167	167	88	88	128	128	224	224	111	115	178	184	240	240	188	190
613	LUS	32	12	3	17	0	168	168	183	183	133	133	103	103	101	105	248	248	146	146	136	142	165	167	82	100	128	128	224	238	101	111	184	184	238	240	190	194
614	LUS	32	10	3	19	0	168	160	177	183	129	129	91	97	89	107	240	252	146	150	140	140	167	167	88	100	128	128	226	238	101	121	178	184	240	240	194	212
615	LUS	32	12	3	17	0	164	160	177	177	133	135	99	103	89	89	246	252	148	152	132	140	157	167	98	100	128	128	224	226	101	105	184	184	240	240	190	194
616	LUS	32	8	5	19	0	162	150	177	183	129	133	91	95	101	107	240	248	148	150	138	140	167	167	88	100	128	128	224	226	101	113	178	192	238	240	192	194
617	LUS	32	9	2	21	0	150	150	177	181	133	133	97	103	99	99	240	252	150	152	134	138	167	167	88	98	120	128	218	224	101	121	184	184	238	240	190	208
618	LUS	32	7	8	17	0	160	160	177	183	129	135	99	105	95	99	244	248	156	156	134	134	165	167	88	88	128	128	220	226	113	121	184	192	226	240	190	194
619	LUS	32	16	2	14	0	164	162	177	177	129	133	91	97	89	107	246	252	146	152	140	140	157	167	82	82	128	128	224	226	101	105	184	184	240	240	190	192
620	LUS	32	12	5	15	0	160	160	183	183	133	133	103	103	89	97	244	252	150	160	134	134	167	167	98	98	128	128	218	218	99	113	182	184	232	240	188	190
621	LUS	32	10	1	21	0	162	160	181	183	133	133	103	103	101	107	248	252	146	146	134	136	167	167	88	94	128	128	226	238	101	101	178	184	238	238	190	194
622	LUS	32	11	2	18	1	150	150	181	183	133	133	101	109	89	97	240	246	146	146	140	140	157	165	88	98	128	128	218	224	101	117	178	184	232	240	194	208
623	LUS	32	12	2	18	0	168	158	181	183	129	135	97	103	97	99	246	248	148	150	132	140	157	167	88	88	128	128	218	226	101	111	184	184	238	240	192	208
624	LUS	30	8	4	17	1	162	150	177	183	133	133	99	103	97	101	240	246	148	150	140	142	165	167	88	88	128	128	0	0	101	113	178	184	226	232	210	212
625	LUS	32	9	3	19	1	164	160	177	177	129	133	95	103	101	107	224	252	152	154	134	140	167	167	94	98	128	128	224	226	101	113	178	184	238	238	192	192
626	LUS	32	12	3	17	0	168	164	183	183	129	129	95	103	89	101	236	248	146	150	134	142	157	167	88	88	128	128	218	224	101	113	184	184	238	240	192	194
627	LUS	32	10	6	16	0	164	150	183	183	133	135	99	103	97	99	240	240	152	152	138	140	167	167	94	98	128	128	226	238	97	97	178	178	232	238	190	194
628	LUS	32	9	6	17	0	160	150	179	183	129	133	103	103	89	101	240	252	146	146	134	138	167	167	88	88	128	128	218	224	99	113	178	178	226	236	208	212
629	LUS	32	9	2	21	0	168	160	177	177	133	133	99	103	89	97	246	252	146	152	132	140	165	167	88	98	120	128	224	224	113	121	184	192	238	240	190	190
630	LUS	32	13	1	18	0	164	160	183	183	129	131	103	109	89	101	244	246	146	152	134	140	167	167	88	98	128	128	218	224	101	113	184	184	240	240	190	192
631	LUS	32	10	6	16	0	162	162	177	177	131	131	99	109	99	101	248	254	150	156	132	134	167	167	98	98	128	128	224	238	113	121	184	184	226	238	188	190
632	LUS	32	8	5	19	0	160	160	177	183	133	139	103	103	97	107	252	252	150	156	134	140	167	167	88	94	128	128	238	238	97	105	178	184	240	240	190	208
633	LUS	32	14	2	16	0	168	160	183	183	129	133	103	109	101	105	240	248	148	148	134	140	165	167	82	82	128	128	218	218	105	121	184	184	238	240	190	192
634	LUS	32	7	7	18	0	166	164	177	183	129	131	103	105	89	99	244	252	146	156	134	136	157	161	98	98	128	128	224	238	101	121	180	184	230	232	190	208
635	LUS	32	13	1	18	0	164	160	183	183	129	129	103	103	97	107	244	248	146	150	132	132	167	167	82	88	128	128	218	224	115	121	178	184	238	240	192	208
636	LUS	32	7	4	21	0	162	160	177	183	129	133	103	103	89	99	244	252	148	152	140	142	165	167	88	98	120	120	238	238	101	113	178	192	238	240	190	208
637	LUS	32	9	1	22	0	164	162	177	183	129	133	103	109	97	101	246	252	146	146	134	136	161	167	88	98	128	128	218	224	101	121	184	184	238	240	194	194
638	LUS	32	7	4	21	0	164	160	177	183	129	133	103	103	97	101	244	254	146	150	138	142	157	159	98	98	128	128	226	238	101	121	178	184	238	240	190	190
639	LUS	32	13	2	15	2	160	158	183	183	133	133	97	103	97	107	248	248	148	150	136	146	167	167	82	82	128	128	226	228	101	117	178	184	238	238	190	192
640	LUS	32	13	5	14	0	160	160	179	181	133	133	103	103	101	101	248	252	148	150	132	134	167	167	82	82	128	128	218	218	101	105	192	192	236	240	208	208
641	LUS	32	11	8	13	0	166	158	183	183	131	133	99	101	89	101	252	252	154	156	134	140	157	159	82	88	128	128	218	224	97	101	184	184	232	238	192	208
642	LUS	32	11	3	18	0	166	150	177	183	133	133	99	103	101	107	248	252	150	154	134	136	167	167	82	88	128	128	224	224	101	105	184	184	238	240	188	192
643	LUS	18	5	1	11	1	166	150	177	183	129	141	95	109	101	107	252	252	146	150	134	140	167	167	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
644	LUS	32	11	3	18	0	168	150	173	177	129	129	103	103	89	89	244	252	148	150	134	136	167	167	88	98	120	128	224	226	101	121	184	184	240	240	188	192

Anexo III -Algoritmo de quantificação de amostras por tipo de alelos

```
*-----------------------------------------------------------------------------
* Prog   :  tese1.prg
*           Quantifica número ocorrências dos tipos de classes de alelos,
*           existentes para cada genótipo, conforme critério definido nas
*           tabelas nº5 e nº6 (alelosteste.dbf).
*
* Parâmetros:  nenhum
*
* Input:      Tabela de amostras/genótipos (machos.dbf)
*             Tabela de critérios de classificação de alelos por locus (alelosteste.dbf)
*
* Retorno  :  Tabela nº25 de genótipos (machos.dbf) com informação atualizada
*              em cada genótipo sobre:
*             nar = nº de alelos raros
*             namr = nº de alelos muito raros
*             namf = nº de alelos muito frequentes
*             naf = nº de alelos frequentes
*             natotal = nº total de alelos por genótipo
*-----------------------------------------------------------------------------

&& Abre as 2 tabelas necessárias a este processo.
USE machos.dbf IN 0 EXCLUSIVE
USE alelosteste.dbf IN 0 EXCLUSIVE

SET DELETED ON
WAIT WINDOW  "   A contar as amostras com: "+CHR(13);
                    +""+CHR(13);
                    +" ALELOS MUITO RAROS(AMR)"+CHR(13);
                    +""+CHR(13);
                    +" ALELOS RAROS(AR)"+CHR(13);
                    +""+CHR(13);
                    +" ALELOS FREQUENTES(AF)"+CHR(13);
                    +""+CHR(13);
                    +" ALELOS MUITO FREQUENTES(AMF)."  NOWAIT NOCLEAR
SET SAFETY OFF
&& Inicializa variáveis
namr=0
nar=0
namf=0
nacontados=0
natotal=0
naf=0
amr1=""
amr2=""
amr3=""
amr4=""
mr1=0
mr2=0
mr3=0
mr4=0
SELECT machos
REPLACE ALL machos.namr WITH 0
REPLACE ALL machos.nar WITH 0
REPLACE ALL machos.namf WITH 0
REPLACE ALL machos.natotal WITH 0
REPLACE ALL machos.naf WITH 0
SELECT alelosteste
GO top
DO WHILE !EOF()
            l1=ALLTRIM(alelosteste.locus)
            l1a="machos."+ALLTRIM(l1)+"_a"
```

```
l1b="machos."+ALLTRIM(l1)+"_b"
l1mra="machos."+ALLTRIM(l1)+"mr_a"
l1mrb="machos."+ALLTRIM(l1)+"mr_b"
l1mfa="machos."+ALLTRIM(l1)+"mf_a"
l1mfb="machos."+ALLTRIM(l1)+"mf_b"
SELECT machos
GO TOP
DO WHILE !EOF()
	IF (	&l1a>0.and.(;
			&l1a=alelosteste.amr1;
			.or.&l1a=alelosteste.amr2;
			.or.&l1a=alelosteste.amr3;
			.or.&l1a=alelosteste.amr4;
			.or.&l1a=alelosteste.amr5)) THEN
		REPLACE machos.namr WITH namr+1
		IF machos.namr=1 THEN
			replace machos.amr1 WITH ALLTRIM(l1)+"_a"
			replace machos.mr1 WITH &l1a
		ELSE
			IF  machos.namr=2 THEN
				replace machos.amr2 WITH ALLTRIM(l1)+"_a"
				replace machos.mr2 WITH &l1a
			ELSE
				IF machos.namr=3 THEN
					replace machos.amr3 WITH ALLTRIM(l1)+"_a"
					replace machos.mr3 WITH &l1a
				ELSE
					IF machos.namr=4 THEN
					    replace machos.amr4 WITH ALLTRIM(l1)+"_a"
					    replace machos.mr4 WITH &l1a
					ENDIF
				ENDIF
			ENDIF
		ENDIF
		REPLACE &l1mra WITH &l1a
	ENDIF
	IF (	&l1b>0.and.(;
			&l1b=alelosteste.amr1;
			.or.&l1b=alelosteste.amr2;
			.or.&l1b=alelosteste.amr3;
			.or.&l1b=alelosteste.amr4;
			.or.&l1b=alelosteste.amr5)) THEN
		IF &l1b!=&l1a THEN
				REPLACE machos.namr WITH namr+1
		ENDIF
		IF machos.namr=1.and.&l1b!=&l1a THEN
			replace machos.amr1 WITH ALLTRIM(l1)+"_b"
			replace machos.mr1 WITH &l1b
		ELSE
			IF  machos.namr=2.or.&l1b=&l1a THEN
				replace machos.amr2 WITH ALLTRIM(l1)+"_b"
				replace machos.mr2 WITH &l1b
			ELSE
				IF machos.namr=3 THEN
					replace machos.amr3 WITH ALLTRIM(l1)+"_b"
					replace machos.mr3 WITH &l1b
				ELSE
					IF machos.namr=4 THEN
					    replace machos.amr4 WITH ALLTRIM(l1)+"_b"
					    replace machos.mr4 WITH &l1b
					ENDIF
				ENDIF
			ENDIF
		ENDIF
		REPLACE &l1mrb WITH &l1b
	ENDIF
	IF (	&l1a>0.and.(;
			&l1a=alelosteste.ar1;
			.or.&l1a=alelosteste.ar2;
			.or.&l1a=alelosteste.ar3;
```

```
                                        .or.&l1a=alelosteste.ar4;
                                        .or.&l1a=alelosteste.ar5)) THEN
                                REPLACE machos.nar WITH nar+1
                        ENDIF                   .
                        IF  (           &l1b>0.and.(;
                                        &l1b=alelosteste.ar1;
                                        .or.&l1b=alelosteste.ar2;
                                        .or.&l1b=alelosteste.ar3;
                                        .or.&l1b=alelosteste.ar4;
                                        .or.&l1b=alelosteste.ar5))THEN
                                REPLACE machos.nar WITH nar+1
                        ENDIF
                        IF (            &l1a>0.and.(;
                                        &l1a=alelosteste.amf1;
                                        .or.&l1a=alelosteste.amf2;
                                        .or.&l1a=alelosteste.amf3;
                                        .or.&l1a=alelosteste.amf4;
                                        .or.&l1a=alelosteste.amf5)) THEN
                                REPLACE machos.namf WITH namf+1
                                REPLACE &l1mfa WITH &l1a
                        ENDIF                   .
                        IF  (           &l1b>0.and.(;
                                        &l1b=alelosteste.amf1;
                                        .or.&l1b=alelosteste.amf2;
                                        .or.&l1b=alelosteste.amf3;
                                        .or.&l1b=alelosteste.amf4;
                                        .or.&l1b=alelosteste.amf5))THEN
                                IF &l1b!=&l1a THEN
                                                REPLACE machos.namf WITH namf+1
                                ENDIF
                                REPLACE &l1mfb WITH &l1b
                        ENDIF
                        IF  &l1b>0 THEN
                                REPLACE machos.natotal WITH machos.natotal+1
                        ENDIF
                        IF  &l1a>0 THEN
                                REPLACE machos.natotal WITH machos.natotal+1
                        ENDIF
                        REPLACE machos.naf WITH machos.natotal-(machos.nar+machos.namr+machos.namf)
                        SKIP
                ENDDO
                SELECT alelosteste
                SKIP
ENDDO
WAIT WINDOW  "FIM" NOWAIT NOCLEAR
SELECT machos
BROWSE
RETURN .T.
*-------------------------------------------------------------------------
*****************************************************************************************************
```