

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA OVINA CAMPANIÇA

RELATÓRIO DE ACTIVIDADES REALIZADA, PARA DAR CUMPRIMENTO À ACÇÃO 2.2.3 “CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA POR ANÁLISE DE ADN” PREVISTA NO PROGRAMA PRODER, TRIÉNIO 2008-2010

Unidade de Recursos Genéticos Reprodução e Melhoramento Animal do L-INIA

Maria de Fátima Marquez Madeira Santos Silva

Nuno Carolino

Maria da Conceição Oliveira e Sousa

Maria Inês Carolino

Luis Telo da Gama

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAL E MÉTODOS	4
2.1. ANÁLISE ESTATÍSTICA	4
3. RESULTADOS	6
3.1. <i>ENQUADRAMENTO DA RAÇA CAMPANIÇA COM OUTRAS POPULAÇÕES OVINAS ...</i>	8
3.2. <i>DISTÂNCIA DA RAÇA CAMPANIÇA A OUTRAS POPULAÇÕES OVINAS</i>	9
3.3. ESTRUTURA DA POPULAÇÃO CAMPANIÇA	11
4. CONCLUSÕES	12
5. BIBLIOGRAFIA	13

1. INTRODUÇÃO

A conservação dos recursos genéticos existentes é uma prioridade a nível nacional e mundial. Preservar a diversidade genética é essencial pois representa o potencial evolutivo das espécies, para fazer face às eventuais alterações ambientais que possam surgir no futuro.

A caracterização genética da diversidade intra e inter populacional, através de diversos indicadores de variabilidade, estrutura e distâncias genéticas, permite evidenciar o grau de diferenciação e as relações genéticas entre populações. Esta informação pode ser muito útil, contribuindo para identificar a relevância das populações como reserva genética, para definir prioridades de conservação e estratégias de gestão destes recursos.

Em Portugal estão reconhecidas 47 raças autóctones de espécies pecuárias, na sua maioria em risco de extinção. Esta grande diversidade de RGAn cria particulares responsabilidades na implementação de programas de conservação e utilização sustentável visando a sua salvaguarda. Face a esta situação a Direcção Geral de Veterinária (DGV), através acção n.º 2.2.3, «Conservação e melhoramento de recursos genéticos», do programa PRODER, procurou incentivar as associações de criadores a promover a caracterização genética das suas raças.

Os microssatélites ou *STRs* (*Short Tandem Repeats*) são os marcadores moleculares recomendados pela FAO (FAO, 2005), para a caracterização genética de populações de animais domésticos. São fragmentos de ADN em que motivos de 2 a 6 nucleótidos, se repetem em série, com um comprimento total geralmente inferior a 300 pb. Tem sido muito utilizados pois são marcadores altamente polimórficos, frequentes e largamente distribuídos por todo o genoma. Apresentam herança mendeliana simples e codominante o que permite a identificação directa de indivíduos homo e heterozigotos em cada *locus*. As técnicas laboratoriais para a sua análise, não são particularmente complicadas e exigem apenas pequenas quantidades de ADN. Têm a particularidade de se encontrarem em regiões não codificantes do genoma, pelo que são considerados neutros face à selecção. Consequentemente, as diferenças no padrão de microssatélites (isto é, as frequências alélicas distintas entre populações isoladas) resultam essencialmente do efeito acumulado da deriva genética, e não da selecção praticada.

Quando se analisam simultaneamente vários microssatélites numa população, a análise dos polimorfismos encontrados, permite determinar diversos indicadores que no seu conjunto traduzem a variabilidade genética presente e permitem caracterizar a população em causa, o seu grau de diferenciação e as distâncias genéticas a outras populações.

A raça ovina Campaniça, alvo deste estudo é originária do Baixo Alentejo, distribuindo-se sobretudo nos concelhos de Mértola, Almodôvar, Castro Verde e Ourique.

A extraordinária resistência da ovelha Campaniça às condições agrestes do meio, permite que seja considerada como uma realidade ecológica, resultante duma selecção quase natural. A rusticidade é a sua maior virtude, fruto de uma melhoria genética devida ao facto de desde sempre se escolheram os animais mais resistentes e não necessariamente os de maiores potencialidades produtivas (<http://www.ovinosecaprinos.com/campanicahistoria.html>)

Tal como a maioria das raças ovinas nacionais, com excepção das raças Churra da Terra Quente e Serra da Estrela, a Campaniça está classificada com o estatuto “em risco”, de acordo com o número de fêmeas reprodutoras inscritas no Livro Genealógico (Reg. CE n.º 445/2002), pelo que a sua caracterização genética a nível molecular é particularmente relevante, como contributo para a sua gestão e preservação da sua diversidade.

Para esse efeito utilizaram-se 30 amostras de ADN, e procedeu-se à amplificação de 25 microssatélites seleccionados de acordo com as recomendações da FAO. Os indicadores obtidos

permitiram avaliar a qualidade dos marcadores utilizados e a diversidade genética que caracteriza a raça. Posteriormente comparou-se a raça Campaniça com outras populações ovinas com o objectivo de avaliar o seu grau de diferenciação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho foram seleccionadas 30 amostras de ADN, na proporção de 50% de machos e fêmeas provenientes de 13 rebanhos, pertencentes ao banco do Laboratório de Genética Molecular do L-INIA Santarém. Para efeitos de comparação, foi utilizada também informação de outras populações ovinas nacionais e exóticas disponíveis no Banco de ADN deste laboratório. Para as populações nacionais utilizou-se uma amostra representativa de 30 animais no caso das populações: Merino Preto (MP), Merino Branco (MB), Merino da Beira Baixa (MBB), Saloia (SAL), Churra Mondegueira (MO), Churra Badana (BA), Churra da Terra Quente (TQ), Churra Galega Bragançana (GB), Churra Galega Mirandesa (GM) e Churra Algarvia (AL). Da Churra do Campo (CC) foram analisadas 93 amostras, da Churra do Minho (CMI), 29 e da Bordaleira de Entre Douro e Minho (BEM), 32. No caso da Serra da Estrela foram analisadas 50 amostras da variedade branca (SEB) e 28 da variedade preta (SEP). Foram também analisadas 3 populações exóticas utilizando 30 animais da população Assaf (ASS) e Ile de France (IF) e 63 animais da população Merino Precoces.

A extracção de ADN foi realizada anteriormente, mediante o protocolo comercial de ADN DNeasy™ Blood Kit – Qiagen. Após a extracção procedeu-se à amplificação de 25 microssatélites por reacção em cadeia da polimerase (PCR), mediante três reacções de PCR multiplex, tal como se descreve em (Santos Silva *et al.* 2008).

Os produtos amplificados foram separados, por electroforese em capilar, em gel de poliacrilamida, utilizando um sequenciador automático ABI PRISM 310 Genetic Analyser. Para a análise e identificação dos fragmentos recorreu-se aos softwares GeneScan Analysis® v. 3.7.1, e Genotyper® 2.5.2. Os resultados foram exportados para uma base de dados (Excel), e preparados para a análise estatística posterior, com o software adequado para o efeito.

2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise dos dados, recorreu-se a um tratamento estatístico que engloba o cálculo de diversos parâmetros da variação genética intra e inter populacional, de forma a caracterizar a população considerada, avaliar a diversidade genética e avaliar a qualidade dos microssatélites usados.

Indicadores determinados e softwares utilizados:

- As frequências alélicas, o número médio de alelos por locus, a heterozigotia média esperada (H_e) e observada (H_o) foram calculadas recorrendo à ferramenta MSToolKit do programa Excel.
- O Número Efectivo de Alelos (N_e) foi obtido por aplicação da fórmula proposta por Weir (1996), recorrendo ao programa Excel.

- O conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada microsatélite foi calculado utilizando o software Cervus 2.0 (Marshall *et al.*, 1998).
- O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi testado através do programa Genepop v. 3.1c (Raymond e Rousset, 2003).
- As estatísticas F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST}) foram calculadas pelo método de Weir e Cockerham (1984) mediante o software Genetix 4.0.4 (Belkhir *et al.*, 1998).
- A distância genética D_S (Nei *et al.*, 1983) entre populações foi calculada com o software POPULATIONS (Langella, 2002) e construiu-se um dendrograma pelo método de Neighbor-Joining (Saitou e Nei, 1987), com o mesmo programa informático.
- A estrutura populacional foi analisada mediante o software STRUCTURE v 2. (Pritchard *et al.*, 2000).

3. RESULTADOS

Os resultados dos principais indicadores obtidos para caracterizar a população Campaniça e avaliar a qualidade dos 25 microssatélites utilizados apresentam-se na tabela 1.

Tabela 1.- Loci analisados, N° de animais amostrados (N), Número de alelos detectados (NA), Número efectivo de alelos (Ne), Heterozigotia esperada (He) e observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice de Fixação de Wright (Fis) e probabilidade do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e respectiva significância, para $p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ *; NS – desvio não significativo, $p > 0,05$**

Locus	N	NA	Ne	He	Ho	PIC	Fis	p	HW
OARFCB304	29	7	3,6	0,733	0,724	0,674	0,0126	0,9461	NS
ADCYC	29	6	3,0	0,675	0,448	0,617	0,3400	0,0007	***
HSC	29	10	6,7	0,865	0,793	0,832	0,0846	0,5536	NS
OARCP49	29	13	6,3	0,857	0,862	0,828	-0,0057	0,4318	NS
MCM140	29	6	3,9	0,757	0,724	0,708	0,0439	0,1811	NS
CSRD247	29	14	7,2	0,875	0,897	0,846	-0,0246	0,9040	NS
OARFCB20	29	11	6,8	0,869	0,828	0,838	0,0482	0,0674	NS
OARFCB48	29	8	3,9	0,759	0,69	0,711	0,0924	0,4345	NS
MAF214	29	9	2,6	0,632	0,759	0,575	-0,2043	0,4397	NS
MAF65	29	6	2,6	0,626	0,552	0,573	0,1198	0,1417	NS
BM8125	30	8	4,2	0,773	0,767	0,722	0,0082	0,7233	NS
OARVH72	30	8	4,6	0,795	0,767	0,754	0,0368	0,7780	NS
INRA23	30	10	6,1	0,85	0,833	0,818	0,0203	0,2342	NS
MCM527	30	7	3,6	0,732	0,800	0,673	-0,0952	0,7400	NS
OARJMP29	30	10	4,7	0,802	0,800	0,761	0,0029	0,7084	NS
BM1824	30	4	2,2	0,55	0,533	0,479	0,0303	0,8754	NS
D5S2	30	6	3,4	0,715	0,833	0,653	-0,1694	0,0210	*
MAF209	30	9	4,2	0,776	0,700	0,738	0,0991	0,0852	NS
ETH225	30	6	1,7	0,401	0,367	0,373	0,0873	0,2136	NS
ILST005	30	7	5,3	0,825	0,800	0,786	0,0313	0,8248	NS
CSSM66	30	11	7,5	0,881	0,933	0,853	-0,0601	0,8583	NS
OarFCB193	30	7	2,5	0,607	0,533	0,565	0,1237	0,1377	NS
OarAE129	29	4	2,5	0,606	0,172	0,515	0,7189	0	***
ILST11	30	6	3,3	0,709	0,500	0,656	0,2984	0,0413	*
INRA63	30	11	7,2	0,876	0,800	0,847	0,0878	0,603	NS
MÉDIA	29,6	8,2	4,4	0,742	0,697	0,696	0,069		

O número de alelos (NA) para cada locus microssatélite ou na totalidade da população é determinado por contagem e dá uma primeira indicação da variabilidade da população. Exprime-se habitualmente pelo número total ou médio de alelos. Porém, um determinado locus pode conter alelos com frequências muito diferentes, sendo os alelos de baixa frequência pouco úteis em estudos de diversidade ou testes de paternidade. O número efectivo de alelos (Ne) é um parâmetro que tem em conta o número de alelos e respectiva frequência alélica, pois corresponde

ao número de alelos que dariam origem à variabilidade observada, se todos os alelos tivessem a mesma frequência, sendo por isso um indicador melhor da variabilidade em determinados *loci*.

Todos os microssatélites foram polimórficos, apresentando um número médio de 8,2 alelos, com um mínimo de 4 alelos nos *loci* OarAE129 e BM1824, e um máximo de 14 alelos no *locus*, CSR247. Os valores de *Ne* foram, como seria de esperar, mais baixos, variando de 1,7 (ETH225) a 7,5 (CSSM66) com um valor médio de 4,4 alelos efectivos.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) avalia o grau de polimorfismo de cada marcador, considerando-se que, microssatélites com valores de PIC superiores a 0,5 são muito informativos, entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos e inferiores a 0,25 pouco informativos, de acordo com a escala proposta por Botstein *et al.* (1980).

Do conjunto de marcadores estudados, 14 têm um PIC igual ou superior a 0,70, 9 têm valores de PIC compreendidos entre 0,50 e 0,70 e apenas 2 (ETH225 e BM1824) apresentam valores de PIC inferiores a 0,50. Estes resultados revelam que os marcadores utilizados são na maioria muito informativos na população Campaniça e adequados ao estudo da mesma, o que seria de esperar tendo em conta que são marcadores já utilizados em outras raças nacionais e internacionais e que provaram ser válidos para este tipo de estudos.

A heterozigotia representa a variação genética na população e depende do número de alelos e da sua frequência. Para a sua análise, determina-se a heterozigotia observada (*H_o*) e a heterozigotia esperada (*H_e*). A *H_o* é a proporção de indivíduos heterozigóticos observados em cada locus, população ou no total da amostra e reflecte a variabilidade genética. A *H_e* ou diversidade genética de um locus numa população corresponde à proporção de indivíduos heterozigóticos para esse locus que se esperaria encontrar na população, se esta estivesse em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

Os marcadores moleculares com valores de heterozigotia superiores a 70% são mais informativos na transmissão de alelos, sendo preferíveis para a realização de estudos de população fiáveis (Susol *et al.*, 2000).

No conjunto de microssatélites utilizado, 18 apresentaram valores de *H_e* superiores a 0,70, sendo o valor médio de *H_e* de 0,742, com um máximo de 0,881 no locus CSSM66 e um mínimo de 0,401 no locus ETH225. A *H_o* apresentou um valor médio de 0,697, com um máximo de 0,933 (CSSM66) e um mínimo de 0,172 (OarAE129).

Diferenças entre *H_e* e *H_o* significativas (significativamente diferentes de 0), traduzem desvios de EHW, que a verificar-se podem revelar processos de migração ou fluxo de genes de outra população, endogamia, etc., ocorridos na população (Rousset e Raymond, 1995). Quando se pretende estudar uma população é importante analisar o EHW para tentar compreender os processos ocorridos na mesma. Uma das formas de testar este equilíbrio consiste em verificar se uma das estatísticas *F* de Wright (1951), o valor *F_{is}* é ou não significativamente diferente de 0.

O *F_{is}*, que se determina através da fórmula, $1-(H_o/H_e)$, varia entre -1 e 1, sendo que o valor 0 indica que a população se encontra em equilíbrio, valores negativos indicam excesso de heterozigóticos e os positivos deficiência de heterozigóticos (consanguinidade ou subestrutura da população).

Neste trabalho os resultados do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (tabela 1), mostram que dos 25 loci testados 4 apresentam um *p*-value inferior a 0,05, indicativo de que não se encontram em equilíbrio nesta população. Os valores de *F_{is}* variaram de -0,204 no locus MAF214 a 0,719 no locus OarAE129, sendo que 3 dos *loci*, (ILST11, ADCYC e OarAE129), revelaram valores bastante elevados deste parâmetro.

3.1 ENQUADRAMENTO DA POPULAÇÃO CAMPANIÇA COM AS OUTRAS POPULAÇÕES AUTÓCTONES

Para tentar posicionar a população Campaniça no conjunto das populações ovinas nacionais, compararam-se os principais indicadores obtidos nesta população com os indicadores médios de 15 populações autóctones portuguesas, determinados para uma amostra média de 31 animais não aparentados de cada população, e também com os indicadores médios das três populações exóticas, anteriormente referidas (Merino Precoce, Ile de France e Assaf). Nesta análise determinaram-se os valores globais de Fis por população e no conjunto das populações, retirando dois microssatélites (ADCYC e OARAE129) por se encontrarem em desequilíbrio na maioria das populações analisadas podendo mascarar o conjunto dos resultados obtidos. Os valores de Fis são assim apresentados considerando apenas 23 microssatélites. Na tabela 2, apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 2. Indicadores médios, H_e , H_o , Número médio e efectivo de alelos, Fis global e significância determinados na raça Campaniça, em 15 populações nacionais e em três populações exóticas de ovinos.

INDICADORES	CAMPANIÇA	15 populações nacionais	3 populações exóticas
Nº médio de animais por população	30.0	35.7	40
Nº loci tipificados	25	25	25
H_e Média±DP	0,742 ±0,024	0,735 ±0,027	0,686 ± 0,019
H_o Média±DP	0,697 ±0,017	0,674 ±0,029	0,641 ± 0,008
Nº Alelos Média±DP	8,2 ±2,593	8,1 ±0.854	6,0 ± 0,54
Nº efectivo de alelos Média±DP	4,4 ±1,783	4,3 ±0,388	3,5 ±0,119
Fis global (23 Loci) Significância	0.028 NS	0.073 *	0.049 *

A população Campaniça apresentou um número médio e efectivo de alelos ligeiramente superior à média do conjunto das populações nacionais avaliadas, e bastante superior às raças exóticas. Os níveis de heterozigotia esperada e observada foram também mais elevados que os da média das restantes raças nacionais e exóticas estudadas. Quando se considera apenas o conjunto de 23 loci anteriormente referido o valor de Fis não é significativamente diferente de 0, indicando que a heterozigotia esperada não se afasta significativamente da observada e que a população não revela desvios significativos do EHW. Estes resultados mostram que a população ovina Campaniça constitui uma fonte rica de diversidade e variabilidade genética, superiores à média das outras raças autóctones e exóticas. Por outro lado, com base na amostragem realizada, não parece haver uma acumulação da consanguinidade que seja preocupante.

3.2. DISTÂNCIA DA RAÇA CAMPANIÇA ÀS OUTRAS RAÇAS NACIONAIS

A tabela 3 representa a distância genética de Nei (Ds) entre a população Campaniça (CAMP) e as 15 restantes populações de ovinos nacionais.

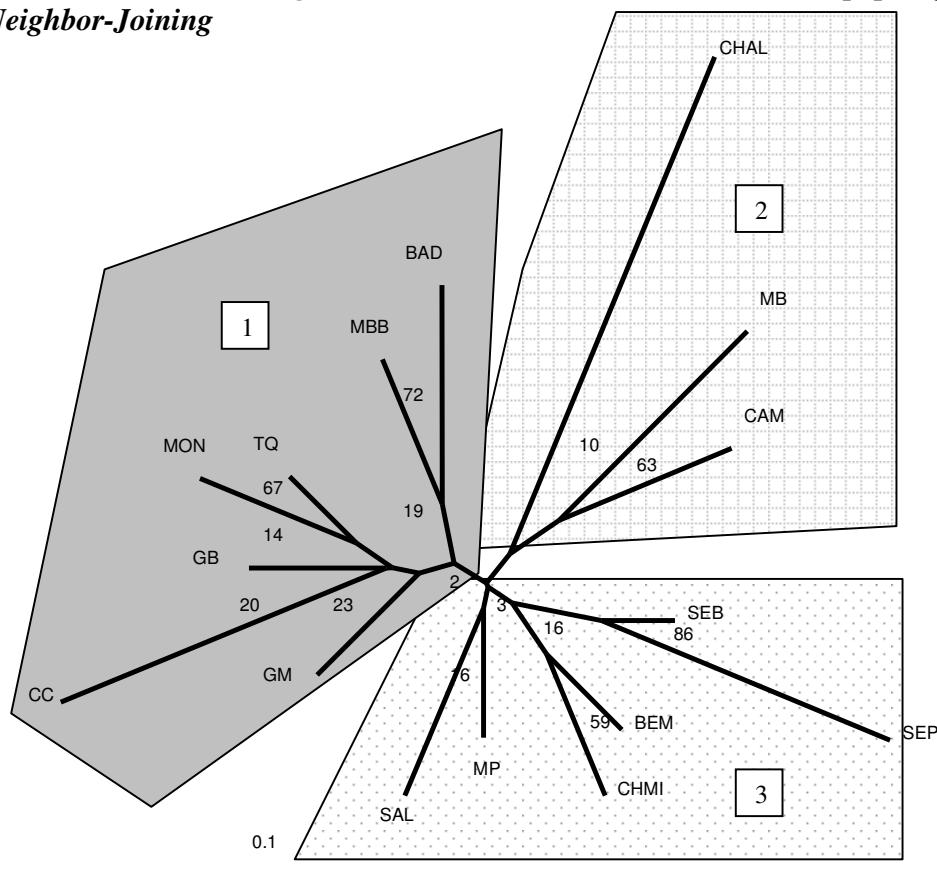
Tabela 3. Matriz de distâncias genéticas de Nei (Ds) entre 16 populações de ovinos nacionais¹ para o conjunto dos 25 loci

	SEB	SEP	BEM	CHMI	MP	MB	MBB	SAL	MO	GB	BA	TQ	GM	AL	CAM
CC	0,20	0,21	0,18	0,19	0,17	0,18	0,15	0,18	0,15	0,13	0,19	0,16	0,14	0,29	0,20
SEB	0,00	0,10	0,08	0,11	0,07	0,15	0,12	0,09	0,13	0,10	0,15	0,10	0,10	0,19	0,14
SEP		0,00	0,13	0,17	0,17	0,22	0,17	0,18	0,19	0,17	0,20	0,19	0,18	0,28	0,22
BEM			0,00	0,07	0,09	0,16	0,12	0,10	0,14	0,09	0,13	0,11	0,09	0,19	0,14
CHMI				0,00	0,12	0,14	0,12	0,13	0,16	0,12	0,14	0,13	0,12	0,17	0,12
MP					0,00	0,11	0,13	0,09	0,13	0,12	0,14	0,09	0,10	0,19	0,12
MB						0,00	0,16	0,13	0,20	0,17	0,21	0,17	0,15	0,23	0,11
MBB							0,00	0,11	0,14	0,12	0,09	0,12	0,11	0,22	0,15
SAL								0,00	0,13	0,11	0,13	0,12	0,12	0,21	0,14
MO									0,00	0,08	0,14	0,07	0,10	0,21	0,17
GB										0,00	0,12	0,08	0,07	0,20	0,15
BA											0,00	0,13	0,11	0,21	0,16
TQ												0,00	0,08	0,18	0,16
GM													0,00	0,18	0,15
AL														0,00	0,19

¹CC- Churro do Campo; EB - Serra da Estrela Branco; SEP - Serra da Estrela Preto; BEM – Bordaleira de Entre Douro e Minho; CHMI – Churro do Minho; MP – Merino Preto; MB – Merino Branco; MBB – Merino da Beira Baixa; SAL – Saloia; MO- Mondegueira; GB – Churra Galega Bragançana; BA – Churra Badana; TQ – Churra da Terra Quente; GM– Churra Galega Mirandesa; AL – Algarvia e CAM - Campaniça

Como pode ver-se na tabela, a população mais próximas da Campaniça (CAM) é a Merino Branco (MB), seguida do Merino Preto (MP). Verifica-se também que a generalidade das populações bordaleiras também são mais próximas à Campaniça do que as restantes raças, à exceção da Churra do Minho. A população mais afastada é contudo a Serra da Estrela - variedade preta (SEP), também do tronco Bordaleiro, seguida da Churra do Campo e da Algarvia. A partir da distância Ds calculada, construiu-se pelo método de Neighbour Joining, uma árvore radial de distâncias genéticas (dendrograma), que mostra as relações genéticas entre as populações consideradas, que se apresenta na figura 1.

Figura 1 – Árvore de distâncias genéticas standard de Nei (Ds) entre as populações, pelo método de Neighbor-Joining



Na figura 1 pode ver-se a árvore de distâncias Ds. Os valores nos nós (valores de bootstrapp sobre 1000 tiragens) representam a percentagem de ocorrências em 1000 replicações e indicam a robustez dos mesmos.

Através da figura verifica-se que grande parte dos valores de replicação obtidos é baixo, pelo que devemos encarar os resultados com algumas reservas, considerando-os apenas indicativos. O dendrograma mostra três agrupamentos: O agrupamento 1 inclui a maioria das raças do tronco churro e o MBB. Os ramos adjacentes e de comprimento semelhante evidenciam a proximidade entre estas populações, indicando um maior afastamento da CC, traduzido num ramo mais longo. O agrupamento 2, contém a raça Campaniça, alvo deste estudo. É constituído por um ramo que contém as populações CAMP e MB, traduzindo a proximidade entre elas, já antes evidenciada pela matriz de distâncias e que vai de encontro ao que se conhece sobre o modo de exploração destas populações (são raças exploradas em zonas geograficamente próximas). Ainda neste agrupamento um outro ramo muito mais longo, correspondente à CHA revela o maior afastamento desta população relativamente às outras. O agrupamento 3, inclui as outras raças do tronco Bordaleiro, e também as populações MP e CHMI. As populações Merinas aparecem distribuídas pelos três agrupamentos.

3.3. ESTRUTURA DA POPULAÇÃO CAMPANIÇA

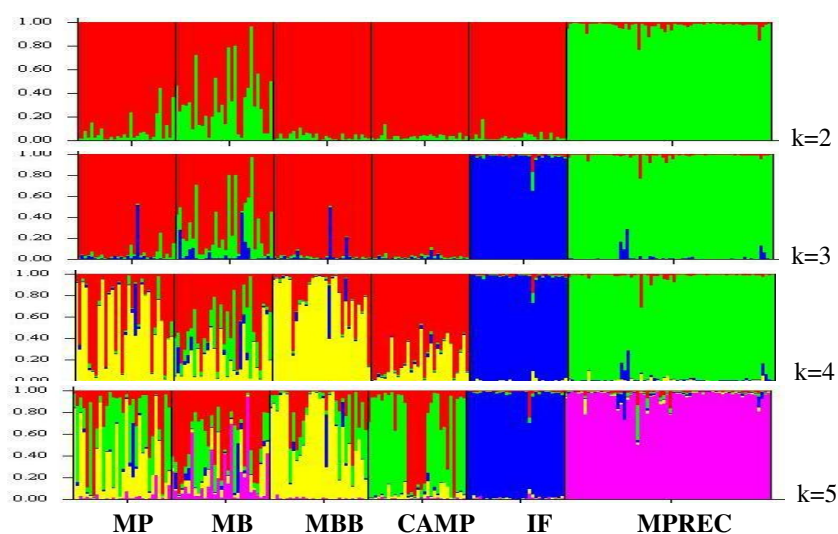
Finalmente fez-se uma análise para avaliar a estrutura e grau de miscigenação das populações ancestrais que poderão estar na origem da população Campaniça. Nesta análise incluíram-se as populações ovinas Merinas Portuguesas, MB, MP e MBB pela sua proximidade geográfica, e duas raças exóticas (Merino Precoco e Ile de France) pela influência que poderão ter tido nesta população ao longo das últimas décadas. Não foram considerados para esta análise os microssatélites OarAE129 e ADCYC, pelas razões atrás apontadas. Utilizou-se o programa Structure versão 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000), que implementa um algoritmo bayesiano, baseado na cadeia de Monte Carlo Markov (MCM). O método assume que um indivíduo pode ter diferentes graus de mistura das populações ancestrais subjacentes e permite inferir o número de populações com estrutura definida que pode ou não corresponder ao número de populações em estudo. Em função dos genótipos o programa agrupa os indivíduos em diferentes clusters (K) que representam o número de populações subjacentes aos dados, assumindo um modelo de mistura em que cada indivíduo pode conter no seu genoma percentagens variáveis das populações ancestrais de origem.

Na análise utilizou-se o admixture model com as frequências alélicas correlacionadas, com um período de “burning” de 50000, seguido de 100000 iterações MCM. Foram testados valores de K entre 2 e 6 com 3 repetições para cada valor de K.

De acordo com as simulações resultantes, considerando a informação de 6 raças, determinou-se como sendo 5 o valor óptimo para K, ou seja, o número de populações ancestrais que mais se adequa aos dados.

A figura 2 mostra graficamente os resultados obtidos quando se consideram valores crescentes de K entre 2 e 5. Na figura cada indivíduo está representado por uma linha vertical dividida em K segmentos (coloridos) proporcionais à fracção do seu genótipo atribuível a cada uma das K (6) populações inferidas (Pritchard *et al.*, 2007). As linhas pretas separam os indivíduos das diferentes raças.

Figura 2. Representação gráfica dos resultados da análise de estrutura genética de 6 populações ovinas considerando k=2 a K=5



Se observarmos os resultados desta análise por etapas verifica-se que:

Quando $K=2$, formam-se dois agrupamentos separando-se a raça Merino Precoce (verde) das restantes raças (vermelho). Já nesta fase é possível observar que parte do agrupamento verde também aparece na zona correspondente à raça Merino Branco. Quando $K=3$, dá-se a separação clara da raça IF (azul). Para $K=4$ surge um novo agrupamento (amarelo) que contribui em diferentes graus para todas as raças autóctones e especialmente para as raças Merino da Beira Baixa e Merino Preto. Nesta etapa surge também a raça Campaniça associada essencialmente ao agrupamento vermelho. Quando $K=5$ (número de populações ancestrais julgado mais adequado) verifica-se que as raças Merino Precoce (rosa) e Ile de France (azul) aparecem perfeitamente diferenciadas de todas as outras; A raça Campaniça aparece associada essencialmente ao agrupamento verde, também representado no Merino Preto e partilha o agrupamento vermelho mais associado ao Merino Branco, situação que põe em evidência a influência das populações Merinas na Campaniça. Para o Merino Branco contribui ainda o agrupamento rosa, revelando uma possível influência do Merino Precoce e, em menor grau, o verde traduzindo alguma partilha da população ancestral com a Campaniça. O Merino da Beira Baixa aparece associado essencialmente ao agrupamento amarelo. O Merino Preto mostra miscigenação nos seus indivíduos para os quais contribuem essencialmente as populações ancestrais representadas pelos agrupamentos verde e amarelo e em menor grau, o vermelho.

4. CONCLUSÕES

Em função dos resultados obtidos neste trabalho conclui-se que a população ovina Campaniça tem uns níveis de diversidade genética e variabilidade genética, superiores à média das outras raças autóctones e exóticas avaliadas neste trabalho.

A população é geneticamente heterogénea, ou seja os indivíduos que a compõem apresentam entre si diferenças substanciais, revelando um certo grau de miscigenação. Esta heterogeneidade parece indicar a existência de indivíduos de origens diferentes, com influência de outras raças (merinas) sobretudo da raça Merino Branco.

Há que ter em atenção, contudo, que uma diferenciação genética pode não corresponder a uma diferenciação morfológica e vice-versa, podendo haver diversas razões subjacentes a estas situações.

O valor de Fis não significativo e inferior ao das outras populações avaliadas não sugere a existência de problemas de consanguinidade nesta população.

Este trabalho é um contributo para conhecer a situação genética desta raça e ajudar a delinear estratégias futuras para a sua gestão.

5. BIBLIOGRAFIA

- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, H. and Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. of Hum. Gen.*, 32: 314-331.
- Belkhir, K., Borsa, P., Goudet, J., Chikhi, L. e Bonhomme, F. (1998) GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome et populations. CNRS UPR 9060. Université de Montpellier. Montpellier. France.
- FAO (2005) Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of small populations at risk (Rome. Italy, FAO).
- Langella, O. (2002) Population 1.2.28. Logiciel de génétique des populations. Laboratoire Populations, génétique et évolution, CNRS UPR 9034, Gif-sur-Yvette. (<http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/>)
- Raymond M., Rousset F. (2003). GENEPOP (Version 3.4.): Update of the version describe in Raymond M., Rousset F. (1995) (<http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>)
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Ecology*. 4: 406-425.
- Weir, B. S. and Cockerham, C.C. (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Weir, B. S. (1996) Genetic Data Analysis II: Methods for discrete population genetic data. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 445 pp
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Santos-Silva, F., Ivo, R. S., Sousa, M.C.O., Carolino, M. I., Ginja, C. and Gama, L.T. (2008) Assessing genetic diversity and differentiation in Portuguese coarse-wool sheep breeds with microsatellite markers. *Small Ruminant Res.*, 78: 32-40
- Susol, E., Eyre, S., John, S. (2000). High-throughput genotyping of microsatellite markers, pp49-66. In: SNP and Microsatellite genotyping . Markers for genetic analysis. Worthington J., John, S. (eds). Eaton publishing. 152 pp.