

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**ORIGEM DO SUÍNO CASCO-DE-BURRO E SUA RELAÇÃO GENÉTICA COM
POPULAÇÕES IBÉRICAS E AMERICANAS**

Doutorando: Aderbal Cavalcante Neto
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
FEVEREIRO – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**ORIGEM DO SUÍNO CASCO-DE-BURRO E SUA RELAÇÃO GENÉTICA COM
POPULAÇÕES IBÉRICAS E AMERICANAS**

Doutorando: Aderbal Cavalcante Neto

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui

Co-orientadores: Prof. Dr. Carlos Manuel M. Santos Fonseca

PqC. Dr^a. Maria Aparecida Cassiano Lara

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

FEVEREIRO – 2010

Cavalcante Neto, Aderbal
C376o Origem do suíno casco-de-burro e sua relação genética com
populações ibéricas e americanas / Aderbal Cavalcante Neto. --
Jaboticabal, 2010
xiii, 291 f.: il.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Jeffrey Frederico Lui
Co-orientadores: Carlos Manuel Martins Santos Fonseca, Maria
Aparecida Cassiano Lara
Banca examinadora: Sandra Aidar de Queiroz, Vera Fernanda
Martins Hossepian de Lima, Samuel Rezende Paiva, Eucleia Primo
Betoli Contel
Bibliografia

1. DNA mitocondrial. 2. DNA nuclear. 3. Conservação de recurso
genético. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 636.4:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, *Campus* de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: ORIGEM DO SUÍNO CASCO-DE-BURRO E SUA RELAÇÃO GENÉTICA COM POPULAÇÕES IBÉRICAS E AMERICANAS.

AUTOR: ADERBAL CAVALCANTE NETO
ORIENTADOR: Dr. JEFFREY FREDERICO LUI
Co-Orientador(a): Dr. CARLOS MANUEL MARTINS SANTOS FONSECA
Dra. MARIA APARECIDA CASSIANO LARA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em ZOOTECNIA pela Comissão Examinadora:

Dr. CARLOS MANUEL MARTINS SANTOS FONSECA

Dr. SAMUEL REZENDE PAIVA

Dra. EUCLEIA PRIMO BETIOLI CONTEL

Dra. VERA FERNANDA MARTINS H. DE LIMA

Dra. SANDRA AIDAR DE QUEIROZ

Data da realização: 26 de fevereiro de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora

Dr. CARLOS MANUEL MARTINS SANTOS FONSECA

Co-Orientador no exercício da orientação

DADOS CURRICULARES

Filho de José Francisco Souza Valério Neto e Héliida Cristina Cavalcante Valério, Aderbal Cavalcante Neto nasceu em João Pessoa, capital da Paraíba, em nove de maio de 1981. Concluiu o segundo grau em 1998, no Colégio Marista Pio X, em João Pessoa.

Em maio de 1999, iniciou o curso de graduação em Zootecnia, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, *Campus II*, Areia, PB. Quando graduando, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Ludmila da Paz Gomes da Silva, foi aluno bolsista PIBIC-CNPq-UFPB durante três anos, tendo concentrado suas pesquisas na área da produção de suíno. Submeteu-se à defesa do trabalho de conclusão de curso, para obtenção do título de Zootecnista, em 23 de outubro de 2003.

Em agosto de 2004, iniciou o curso de pós-graduação em nível de mestrado em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *Campus de Jaboticabal* – UNESP, sob a orientação do Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui. Continuou na linha da suinocultura, tendo realizado diversos trabalhos, principalmente na área de melhoramento de suíno. Em 24 de fevereiro de 2006, submeteu-se à defesa do trabalho de dissertação para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

Na sequência, em março desse mesmo ano, também sob orientação do Dr. Lui, ingressou no Doutorado em Zootecnia (UNESP/Jaboticabal), sendo bolsista da CAPES. Logo em seguida, estagiou no Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, SP, sob a orientação da PqC. Dr^ª. Maria Aparecida Cassiano Lara. Em 2007, iniciou o período sanduíche na Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Fonseca, ao abrigo do Programa ALBAN, Programa Europeu de Bolsa de Alto Nível Destinado à América Latina. Em 2009, seguiu para a Universidade de Córdoba, sob a orientação do Prof. Dr. Juan Vicente Delgado e da Dr^ª. Amparo Martínéz, quando, em Dezembro de 2009, concluiu o período sanduíche. Atualmente, é pesquisador em nível de mestrado do CESAM, Portugal, tendo, até o momento, publicado 23 trabalhos em revistas científicas, além de ter apresentado vários resumos em simpósios e em congressos nacionais e internacionais. Em fevereiro de 2010, Cavalcante Neto submeteu-se à defesa de sua tese para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

Existir cansa!

Você sabe que, para mim, um dos maiores castigos da vida é justamente não poder deixar de existir? Morremos, mas não morremos, vivemos. Seria tão oportuno se, em determinado momento, pudéssemos deixar de existir, suspender um pouco a nossa existência, ficarmos latentes, parados – sem pensar, sem comer, sem andar, sem sonhar... Mas, infelizmente, não é possível, porque existir é para a eternidade. Se você para sua existência do lado de cá, você continua, sendo que do lado de lá. Não adianta querer mudar de lado, a vida continuará no mesmo ponto em que você a parou, não há uma só mudança.

A. Cavalcante Neto

“Obrigado, pai, pela vida! Pela coberta que me aquece, pelo teto que me abriga e, principalmente, por tua presença amiga...”

Ao meu querido pai

JOSÉ VALÉRIO,

pelo seu exemplo de carinho, amor,

dignidade e humildade.

MINHA HOMENAGEM!

“Sem amor, eu nada seria...”

À minha querida mãe *HÉLIDA CRISTINA*,

pela confiança e estímulo;

Aos meus irmãos *RAQUEL e VÍTOR*,

pela compreensão e carinho;

Às minhas avós *HILDA DE MENDONÇA* e

ELIZABETH MENEZES (“in memoriam”),

com admiração e respeito.

DEDICO!

"Amigos como vocês valem por dois..."

Aos meus queridos PRIMOS e TIOS,
dos quais tive, pela distância,
de abdicar do convívio e das brincadeiras.

OFEREÇO!

“A vida se eterniza nas lembranças...”

É tão estranho, os bons morrem antes. Assim parece ser quando me lembro de você, que acabou indo cedo demais.

Eu continuar aqui, com meu trabalho e meus amigos, e me lembro de você, em dias assim...

Dias de chuva, dias de sol...

O que sinto não sei dizer...

(Renato Russo)

À minha querida tia **HILMA**

“in memoriam”

As lembranças afagam a saudade...

“Querer é sempre poder quando se sabe o que quer e tem DEUS no coração...”

Irmãos,

A este mundo viemos com o objetivo único de crescermos.

Este objetivo maior só conseguimos concretizar quando de fato queremos – “Querer é sempre poder”.

Aqui estamos porque, de fato, queremos estar, mas temos que ressaltar que, sem a ajuda, a compreensão, o carinho

e muitas vezes até o empurrão daqueles que nos

circundam, seria mais difícil ou mesmo impossível. Por

isso nos damos ao dever de parar para agradecer aos

nossos pais, aos nossos familiares, aos nossos mestres,

aos nossos amigos e, principalmente, a DEUS, que nos

propiciou a chance de estarmos hoje onde muitos

gostariam de estar, ao tempo em que nos comprometemos em

dar sempre o melhor de nós mesmos, o melhor de nosso

profissionalismo, na busca de um mundo mais justo,

humano e fraterno.

Que DEUS abençoe a todos!

Irmã Mãe Preta

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os castigos, por sempre estar na minha vida, auxiliando-me, e por obrigar-me a fazer e seguir sempre o bem. Agradeço-o ainda por permitir me comunicar com meu anjo da guarda, minha querida Mãe Preta.

À Irmã Mãe Preta, a quem tanto devo. Agradeço todos os conselhos, todas as lindas mensagens de otimismo e de orientação. Não sei o que fiz, para Deus me conceber um mentor espiritual tão especial. Mãe Preta, eu nunca vou esquecer o que a senhora um dia me disse: *“Na espiritualidade, não existe distância”*. Eu sinto de fato que estamos sempre perto, mesmo com o universo a nos separar, e que nunca estive só nas minhas caminhadas pela vida.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui, que me acompanhou em toda a minha formação na pós-graduação, ajudando-me sempre... Nunca imaginei que fosse crescer tanto sob sua orientação. Essa vitória não é só minha, é dele também!

À UNESP, *Campus* de Jaboticabal, por ter me proporcionado os conhecimentos que almejava como também alegrias, tristezas, boas e más amizades, críticas, entre tantas outras coisas, que contribuíram muito para a minha formação profissional e pessoal; agradeço na certeza de que foi e continuará sendo, sempre, uma grande casa.

À Universidade de Aveiro, pelo total acolhimento e suporte financeiro. Ao Prof. Dr. Carlos Fonseca, pela incondicional participação neste trabalho, sempre me apoiando e incentivando-me a seguir em frente.

Ao Instituto de Zootecnia, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Cassiano Lara, pelo total apoio dado a este trabalho na parte executada no Brasil e pelos vários momentos difíceis que, juntos, passamos. Aproveito ainda para agradecer à Silvia, pela atenção à minha pessoa e ajuda no laboratório. Ao Dr. Paulo Bardauil e à Dr^a. Maria José Valarini, por sempre terem facilitado a minha entrada naquele Instituto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) (Proc. n. 08/50827-0), ao Programa ALBAN, Programa de Bolsas de Alto Nível Destinado à América Latina (nº E07D402597BR), à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, à FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia, e ao CESAM, Centro de Estudo do Ambiente e do Mar, pelos financiamentos desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Amadeu Soares (UA/CESAM), pela atenção à minha pessoa, e ao Prof. Dr. Luis Souto (UA/CESAM), pela orientação nas análises laboratoriais do mtDNA.

Ao Prof. Dr. Juan Vicente Delgado, à Dr^a. Amparo Martínéz Martínéz e ao Dr. Vincenzo Landi, da Universidade de Córdoba, Espanha, pela grande orientação na realização dos microssatélites.

Ao conselho do curso de Pós-graduação em Zootecnia, em especial à coordenadora, Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Ruggieri. A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, que, direta ou indiretamente, contribuíram para o meu aprendizado. Em especial, à Prof^a. Dr^a. Sandra Queiroz, Prof^a. Dr^a. Vera Hossepian, Prof^a. Dr^a. Silvana Martínéz e ao Prof. Dr. Maurício Barbanti, pela grande contribuição

dada a este trabalho no exame de qualificação. E a vários outros professores que, embora não tenham participado diretamente deste trabalho, também construíram o meu aprendizado não só profissional como também pessoal: Prof^a. Rita Panizzi, Prof^a. Marta Verardino, Prof. Euclides Malheiros, Prof. João Ademir, Prof^a Vera Barbosa de Moraes, Prof. Otto Junqueira, Prof^a Jane Ezequiel, Prof^a Ana Ruggieri, Prof. Raul Gírio, Prof. Adhemar Sanches, Prof^a Nilva Sakomura, Prof. Danísio Munari, entre outros.

Aos funcionários da Unesp, que também contribuíram, tornando mais leve o meu percurso acadêmico, minha gratidão. À Iris e à Cássia, pelos momentos de descontração; à Dona Maria, pela atenção prestada; a todos os funcionários da seção de pós-graduação, por toda a ajuda e paciência nesses seis anos que aqui passei; aos funcionários da biblioteca, que sempre me receberam com muito carinho e atenção – em especial à Sr^a. Tiekko, pelo empenho nas correções bibliográficas; e à assistente social Fernanda Rego, pela ajuda necessária. Ao Paulo Tosta, pela grande ajuda na citogenética e pela convivência durante todos esses anos. Agradeço ainda ao João Boer, também pela boa convivência.

À banca de defesa: à Prof^a. Dr^a. Eucleia Primo Betioli Contel, pelo carinho com minha pessoa mas também pela imensa ajuda, indispensável à finalização deste trabalho; ao Prof. Dr. Samuel Rezende Paiva, por toda a ajuda neste trabalho desde o seu início; e às Professoras Doutoras Sandra Queiroz e Vera Hossepian, pela ajuda constante neste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ludmila da Paz Gomes da Silva (UFPB), por ter me introduzido na pesquisa, orientando-me no meu TCC, e por estar até hoje presente na minha vida profissional, incentivando-me a sempre seguir em frente. Aos demais exemplos que tive em Areia quando graduando: à Prof^a. Maria Norma Ribeiro, ao Prof. José Leite de Queiroz, à Prof^a. Gizelda da Trindade, à Prof^a. Heloísa Helena Barros, ao Prof. Walter Esfrain...

A tia Norah, por proporcionar-me o prazer de ter o seu carinho. Aos meus padrinhos, Hermano Claudio e Eva Menezes. À Eleonoura Enoque e à Lia, por poder contar com apoio e amizade sempre.

Às minhas grandes amigas e companheiras Merilândia e Leilane, pelos momentos ímpares que passamos e por poder contar com compreensão, amizade e, principalmente, paciência durante todos esses anos. À Isilda da xerox, pelo bate-papo todos os dias quando de volta para casa.

À Simone Cahino, por me permitir uma comunicação com “algo” tão especial. Meu Muito Obrigado!

Ao amigo José Mauro, pela grande convivência científica e pelas amostras dos animais da região Sudeste. À Jeane Luiza, ao Prof. Marcelo Pinheiro, ao Sebastião Vilela e ao Prof. Dr. Phil Sponenberg, por toda a ajuda na coleta das amostras dos animais, necessárias para a realização deste trabalho. À Associação Nacional dos Criadores de Suíno de Raça Bísara, à Associação Nacional dos Criadores do Porco Alentejano, à *Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico* e à Selecpor-Portugal, pelas amostras animais cedidas para este trabalho.

Aos Amigos do Colégio Marista Pio X, que me acompanharam durante toda a minha infância. Aos amigos da UFPB, *campus* de Areia, que foi com quem conheci a Zootecnia.

Aos amigos portugueses, por todos esses anos de boa convivência. A todos os amigos, Eduardo Ferreira, Tânia Caetano, Rita Rocha, Rita Torres, Nuno, Tânia Barros, Helena Moreira, Cidália, Filipa, João...

Aos amigos que fiz na Espanha, que muito me ajudaram durante este trabalho. À Maira, Maria, Axel Villalobos, Hichan, Rafael Galíndez, Miguel, Maria Antônia, Francesca, Angel Vallecillo, Puri, Mercedes, Maria Carmem...

E aos que muito contribuíram com este trabalho, Eduardo Ferreira, Nicole Grosso, Tânia Caetano, Angela Harumi Tamaru, Laura Rocha, Júnior Soares...

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contibuíram para o término de mais uma etapa da minha vida. A você, não um adeus, não uma despedida. Ficaremos na lembrança de cada um. O tempo e a distância jamais poderão apagar de nossos corações o alvitre daqueles que souberam conquistar a nossa amizade. Continuem sempre buscando os seus sonhos.

À ZOOTECNIA: REALIZAÇÃO PROFISSIONAL.

Aos Leitores

“Não te contente com o terreno já conquistado nem te lamente em face dos trechos perdidos, o teu momento de êxito começa agora, e, portanto, a tua ação deve ser iniciada de imediato”.

Joana de Ângelis

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	01
1.1 INTRODUÇÃO	02
1.2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS.....	05
1.3 JUSTIFICATIVA	06
1.4 REVISÃO DE LITERATURA	08
1.4.1 Grupos genéticos nativos de suíno.....	08
1.4.2 Conservação de raça.....	14
1.4.3 Recurso genético (RG) e o novo desafio do desenvolvimento rural	18
1.4.4 Características ligadas à resistência a doenças	21
1.4.5 Marcador molecular	23
1.4.5.1 Microssatélites	28
1.4.5.2 DNA Mitocondrial	32
1.4.6 Citogenética.....	36
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
1.6 REFERÊNCIAS.....	44
CAPÍTULO 2. SUS SCROFA: ESPÉCIE, SUBESPÉCIE E RAÇA	67
Resumo	67
2.1 INTRODUÇÃO	67
2.2 ESPÉCIE, SUBESPÉCIE E RAÇA.....	68
2.3 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS GENÉTICOS/RAÇAS ESTUDADOS.....	80
2.3.1 Grupo genético e raças de Portugal	82
2.3.2 Raças da Espanha	84
2.3.3 Raças dos Estados Unidos.....	87
2.3.4 Raças Internacionais	89
2.3.5 Grupos genéticos selvagens.....	90
2.3.6 Casco-de-burro.....	91
2.4 COLETA DAS AMOSTRAS	96

2.4.1 Processamento das amostras	98
2.4.2 Extração de DNA	99
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
2.6 REFERÊNCIAS.....	101
Capítulo 3. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE OS SUÍNOS CASCOS-DE-BURRO POR MEIO DA ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL.....	110
Resumo	110
Abstract	111
3.1 INTRODUÇÃO	112
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	113
3.2.1 Amostras.....	113
3.2.2 Extração de DNA	113
3.2.3 Amplificação dos produtos de PCR e sequenciamento	114
3.2.4 Tratamento dos dados.....	115
3.2.5 Análise dos dados	116
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
3.4 CONCLUSÕES.....	135
3.5 REFERÊNCIAS.....	135
Capítulo 4. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS SUÍNOS CASCOS-DE- BURRO E POPULAÇÕES IBÉRICAS E NORTE-AMERICANAS POR MEIO DA REGIÃO D-LOOP	143
Resumo	143
Abstract	144
4.1 INTRODUÇÃO	144
4. 2 MATERIAL E MÉTODOS	146
4. 2.1 Amostras.....	146
4.2.2 Extração de DNA	147
4.2.3 Amplificação dos produtos de PCR e sequenciamento	147
4.2.4 Tratamento dos dados.....	148

4.2.5 Análise dos dados	149
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
4.4 CONCLUSÕES	168
4.5 REFERÊNCIAS	168
CAPÍTULO 5. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE OS SUÍNOS CASCOS-DE-BURRO E RELAÇÃO FILOGENÉTICA COM POPULAÇÕES IBÉRICAS E NORTE-AMERICANAS POR MEIO DE MARCADOR NUCLEAR DO TIPO MICROSSATÉLITE	176
Resumo	176
Abstract	177
5.1 INTRODUÇÃO	177
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	178
5.2.1 Amostras	178
5.2.2 Extração de DNA	179
5.2.3 Microssatélites utilizados	179
5.2.4 Amplificação das sequências dos microssatélites	180
5.2.5 Detecção de polimorfismo por gel de poliacrilamida	182
5.2.6 Tratamento estatístico dos dados	188
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	196
5.4 CONCLUSÕES	218
5.5 REFERÊNCIAS	219
CAPÍTULO 6. CITOGENÉTICA DE SUÍNO CASCO-DE-BURRO	228
Resumo	228
Abstract	229
6.1. INTRODUÇÃO	229
6.2. MATERIAL E MÉTODOS	231
6.2.1 Métodos de obtenção de material para análise de sangue	231
6.2.2 Cultura de linfócito	232
6.2.3 Preparo das lâminas e fotomicroscopia	233

6.2.4. Construção dos cariótipos	233
6.2.5 Métodos de formação e análises das bandas C, G e NOR	233
6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	234
6.4. CONCLUSÕES.....	245
6.5. REFERÊNCIA	246
Capítulo 7. IMPLICAÇÕES.....	252
7.1 REFERÊNCIAS.....	262
POSFÁCIO.....	265
APÊNDICE 1.....	283
APÊNDICE 2.....	284
APÊNDICE 3.....	285
APÊNDICE 4.....	286
APÊNDICE 5.....	287
APÊNDICE 6.....	288
APÊNDICE 7.....	289
ANEXO	290

ORIGEM DO SUÍNO CASCO-DE-BURRO E SUA RELAÇÃO GENÉTICA COM POPULAÇÕES IBÉRICAS E AMERICANAS

RESUMO – Com os objetivos de elucidar a origem genética do suíno casco-de-burro e de contribuir para sua conservação, realizou-se uma caracterização genética em 110 animais, oriundos das regiões Nordeste (NE), Centro-Oeste (CO) e Sudeste (SE), usando-se duas classes de marcador molecular e análises citogenéticas. Foram encontrados 13 haplótipos mitocondriais entre os cascos-de-burro, sendo que apenas um foi comum às três subpopulações (NE, CO e SE). O valor médio da diversidade haplotípica e o da nucleotídica na população total foram 0,61 e 0,05 respectivamente. Por meio do DNA mitocondrial, as subpopulações de casco-de-burro apresentaram menor distância genética da população da raça portuguesa bísara. No entanto o haplótipo mais frequente nos cascos-de-burro e o único comum a todas as subpopulações pertence à raça ibérica. A variabilidade genética média obtida por meio dos 25 microssatélites na população total foi: número de alelo = 9,8; conteúdo de informação polimórfica = 0,73; heterozigose esperada = 0,69; heterozigose observada = 0,58; consaguinidade (F_{is}) = 0,15; e apenas seis *loci* apresentaram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Considerando-se a divisão da população nas três subpopulações – que, por meio do DNA nuclear, estiveram mais próximas da população *duroc* e da bísara –, os valores observados para os índices de fixação foram: 0,10 para F_{is} , 0,09 para F_{st} e 0,18 para F_{it} . Os cascos-de-burro possuem o número diploide $2n = 38$, não sendo verificado miscigenação com o javali. Os resultados demonstram origem genética ibérica para os cascos-de-burro, com posterior introgressão alélica das raças internacionais importadas no século passado.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, DNA nuclear, caracterização genética, filogenia, recursos genéticos animais, *Sus scrofa*

THE ORIGIN OF BRAZILIAN MULEFOOT PIGS AND THEIR GENETIC RELATIONSHIP WITH IBERIAN AND NORTH-AMERICAN POPULATIONS

ABSTRACT – With the purpose of elucidating the genetic origin of Brazilian Mulefoot pigs and to contribute to their conservation, 110 animals from Northeast (NE), Central-West (CW), and Southeast (SE) Brazil were characterized using two molecular marker classes and cytogenetic analysis. A total of 13 mitochondrial haplotypes was found, but only one was common to the three subpopulations (NE, CW, SE) of Brazilian Mulefoot pigs. The total population presented mean haplotype and nucleotide diversity values of 0.61 and 0.05, respectively. Mitochondrial DNA analysis showed that the Brazilian Mulefoot pig subpopulations presented the shortest genetic distance from the Portuguese *Bísara* breed. However, the most frequent haplotype found in the Brazilian Mulefoot population, and the only one common to all subpopulations belongs to the *Ibérica* breed. The mean genetic variability of the total population, obtained using 25 microsatellites, was: allele number = 9.8; polymorphic information content = 0.73; expected heterozygosity = 0.69; observed heterozygosity = 0.58; inbreeding = 0.15; and only six loci displayed Hardy-Weinberg equilibrium. Considering the three studied subpopulations – which were closer to the *Bísara* and Duroc populations, based on nuclear DNA – the values observed for the fixation indexes were: 0.09 for F_{is} , 0.10 for F_{st} , and 0.18 for F_{it} . Brazilian Mulefoot pigs have a diploid number of $2n = 38$, which indicates that there is no interbreeding with wild boars. The results demonstrate that the genetic origin of Brazilian Mulefoot pigs is Iberian, with later allele introgression from foreign breeds imported during the 20th century.

Keywords: mitochondrial DNA, nuclear DNA, genetic characterization, phylogeny, animal genetic resources, *Sus scrofa*

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em razão dos objetivos propostos e para melhor apresentar os resultados obtidos, esta tese foi estruturada em sete capítulos. Essa divisão visou à organização do trabalho e ao entendimento das singularidades de cada assunto, não significando sua independência ou especificidade. Conforme poderá ser observado, a organização define uma relação de interdependência.

Assim, neste primeiro capítulo, apresentam-se a introdução geral, os objetivos gerais e específicos deste trabalho, as justificativas para a sua realização e a revisão de literatura geral sobre os assuntos abordados no trabalho. No segundo capítulo, aplicam-se os conceitos de espécie, subespécie e raça à espécie *Sus scrofa*, são apresentados os grupos genéticos estudados e detalha-se a metodologia que é comum aos demais capítulos. O terceiro capítulo relata a variabilidade genética do DNA mitocondrial entre os animais cascos-de-burro por meio do gene do CYT-B e da região-controle (*D-loop*), enquanto, no quarto capítulo, verifica-se a relação genética dos cascos-de-burro com populações ibéricas e americanas por meio da região-controle.

No quinto capítulo, discutem-se a variabilidade genética dos cascos-de-burro e a sua relação com as demais populações por meio de marcador nuclear do tipo microssatélite. No sexto capítulo, apresenta-se a caracterização citogenética dos animais com o fenótipo casco-de-burro, e, no sétimo, as implicações e as sugestões para futuras pesquisas. Ao final, encontra-se um Posfácio, que aborda alguns conceitos gramaticais adotados neste trabalho.

1.1 INTRODUÇÃO

Este trabalho teve o seu desfecho justamente no ano dedicado ao reconhecimento da vida na Terra — 2010, Ano Internacional da Biodiversidade. Oito anos atrás, mais de 190 países concordaram, na Convenção sobre Diversidade Biológica das Nações Unidas, em reduzir a perda da biodiversidade até 2010 (MARTON-LEFÈVRE, 2010). Haverá outra convenção em outubro deste ano, em Nagoya, Japão, para avaliar o progresso e fazer acordos sobre novos objetivos, considerando-se a biodiversidade para o mundo.

A biodiversidade zootécnica nativa brasileira é fruto das diversas introduções de animais domésticos na época colonial. Os primeiros suínos que chegaram ao Brasil vieram com Martim Afonso de Souza em 1532, estabelecendo-se em São Vicente, no litoral paulista. Pertenciam às raças da Península Ibérica existentes em Portugal. Muitos escaparam do cativeiro e embrenharam-se pelas matas, formando grupos independentes (CAVALCANTI, 1985). Através de cruzamento, deu-se a formação dos grupos genéticos nativos de suíno, como canastrão, caruncho, nilo, moura, piau, pirapetinga – existindo também suínos com fenótipos casco-de-burro e rabo-de-peixe, hoje em risco de extinção (TORRES & JARDIM, 1975; CAVALCANTI, 1985; VIANNA, 1985).

Esses animais introduzidos no Brasil multiplicaram-se e formaram ecótipos adaptados às condições ecológicas brasileiras, frutos da seleção natural desde que chegaram aqui. A pressão dessa seleção – imposta pelo clima, altitude, oferta alimentar, doenças endêmicas, parasitismo etc. – resultou em inúmeros grupos genéticos, linhagens e ecótipos, que possuem composição genética própria e adaptada a nichos ecológicos específicos (ABREU *et al.*, 1998). Deve-se ressaltar que esses

grupos genéticos também sofreram efeitos de mutação, deriva genética e seleção artificial (SANTOS *et al.*, 2003). Portanto a existência dessas “raças”, que acompanharam o processo evolutivo (biológico, social e cultural) brasileiro, pode ser considerada, atualmente, um dos grandes prodígios nacionais. No entanto, nos últimos cinquenta anos, os recursos agrobiológicos vêm sofrendo, em sua diversidade, declínio e erosão de magnitude sem precedentes na história (SAHAI & VIJH, 2000).

Até então, os grupos genéticos nativos brasileiros de suíno eram importantes, pois foi muito comum o uso de gordura animal na alimentação humana até os primeiros 50 anos do século XX. Nesse período, o porco atendia às exigências do mercado consumidor, e a banha era um produto tão importante quanto suas carnes nobres, o lombo e o pernil. Com o aparecimento dos óleos vegetais, a banha deixou de ser usada, forçando o criador de suíno a buscar um novo modelo de animal para atender melhor ao consumidor, que estava mudando seu perfil nutricional, devido ao novo modo de vida (ROPPA, s.d.; PINHEIRO *et al.*, 2009).

Concomitantemente, o espaço agrário brasileiro, a partir de 1950, passou por inúmeras mudanças, com significativos impactos sobre suas funções e conteúdos. Essas mudanças estão atreladas ao projeto de modernização da agricultura, mais especificamente à modernização da estrutura produtiva do meio rural. A modernização das atividades agropecuárias visava, unicamente, ao binômio produção/produktividade, sem levar em conta as repercussões sociais e ambientais advindas desse modelo.

Essa modernização, que foi caracterizada pela intensificação, especialização, padronização e internacionalização dos produtos e do processo produtivo, constituiu a base da chamada Revolução Verde e favoreceu o início da tecnificação da suinocultura brasileira, que permitiu a concentração de grande número de animal (**Ver Pós-fácio**) em pequena área.

A Revolução Verde foi, contudo, idealizada considerando apenas o paradigma tecnológico fundamentado na modificação das condições naturais para favorecer o potencial genético das plantas e dos animais (FAO, 1996), sendo a erosão genética um dos mais sérios problemas que ela causou (LONGHI & SANTOS, 2003). Na suinocultura brasileira, esse problema começou com a importação de raça,

acompanhada do desenvolvimento das modernas técnicas de melhoramento genético em busca dos animais mais produtivos. E, para solucionar o problema dos grupos genéticos nativos, "improdutivos", passou-se a praticar cruzamentos absorventes entre os animais desses grupos e os das raças importadas, medida que foi determinante na diminuição da diversidade dos grupos genéticos nativos brasileiros. Segundo LOVATTO (1995), das raças puras registradas no *Pig Book Brasileiro* em 1995, a *landrace* teve a maior participação (26,26%), seguida pela *large white* (25,86%) e *duroc* (6,87%). O fato que chamava a atenção era a participação crescente dos animais cruzados (F_1) no registro oficial. Em 1995, eles já representavam 39% do total.

A busca por animais de carcaça mais magra, utilizando-se de cruzamentos absorventes, para atender ao novo perfil do consumidor, e por animais que favorecesse o aumento da produção, para atender aos preceitos da Revolução Verde, fez com que os grupos genéticos nativos quase chegassem à extinção. Graças ao trabalho de algumas instituições e de algumas universidades, esses grupos não foram extintos, mas estão, atualmente, em estado vulnerável, necessitando, portanto, de programas específicos para a sua conservação.

Assim, em 1974, aliada à preocupação mundial de conservação dos recursos genéticos locais, a EMBRAPA criou o Centro Nacional de Recursos Genéticos (MARIANTE *et al.*, 2009), que, em 1983, transformado em CENARGEN, iniciou o primeiro programa oficial de conservação dos recursos genéticos animais do Brasil, em parceria com universidades, empresas estaduais de pesquisa e com criadores particulares. O laboratório de genética animal do CENARGEN, criado em 1998, permitiu o início dos estudos de caracterização genética de várias raças em risco de extinção (EGITO *et al.*, 2002). Essa caracterização é uma alternativa para quantificar a diversidade genética dos animais, auxiliando, assim, os programas de conservação. O conhecimento da variação genética é de grande importância para a conservação dos recursos genéticos, a fim de evitar a erosão genética nas populações (MENEZES, 2005).

1.2 OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar geneticamente os suínos do grupo conhecido como casco-de-burro por meio de polimorfismo do DNA mitocondrial e do nuclear bem como por meio da citogenética, na tentativa de elucidar a sua origem genética e de contribuir para a conservação do germoplasma nativo. Esse objetivo favorecerá uma base sólida para a implementação de futuros programas de conservação e melhoramento desse grupo genético.

Nesse sentido, os objetivos específicos foram:

- estudar os níveis de variabilidade genética das populações de casco-de-burro por meio de análise do polimorfismo da região *D-loop* e do gene do CYT-B;
- estudar os níveis de variabilidade genética das populações de casco-de-burro por meio de análise de marcador nuclear do tipo microssatélite;
- determinar as relações filogenéticas dos animais cascos-de-burro com populações domésticas e selvagens da Península Ibérica assim como com populações domésticas americanas;
- verificar se os animais cascos-de-burro podem ser classificados como raça ou se esse fenótipo é uma característica que pode ocorrer em qualquer raça.
- e caracterizá-lo de modo citogenético, a fim de verificar seu número diploide e possível miscigenação com o javali.

1.3 JUSTIFICATIVA

O conceito de ruralidade, desenvolvido na década de 1990 e que se consolidou nos primeiros anos deste século, propiciou importantes avanços na elaboração de novos enfoques de desenvolvimento rural, revertendo a tendência que via o rural como fonte de problema (WANDERLEY, 2002). Atualmente, o meio rural é percebido igualmente como portador de solução para os problemas do desemprego, melhoria da qualidade de vida e aprofundamento das relações sociais.

A criação de suíno constitui-se em importante fixador do homem no campo por ser uma atividade que exige que os criadores residam na propriedade para melhor gerirem essa criação, contribuindo não só para a formação da renda familiar dos pequenos agricultores, uma vez que é uma atividade típica de pequena propriedade rural (SCHMIDT *et al.*, 2007; ASSMANN *et al.*, 2009), mas também para a geração de emprego. Vários produtores, entretanto, usando a suinocultura tradicional, não possuem condições para competir de igual para igual com as regiões produtoras de grão nem com a suinocultura industrial. Por isso deve-se pensar na suinocultura familiar como atividade diferenciada em manejo, alimentação (LUDKE *et al.*, 2007), instalação (COSTA *et al.*, 2006) e qualidade de seus produtos (MACHADO FILHO *et al.*, 2001), oriundos da produção tradicional e extensiva, de forma que esta seja adaptável e rentável à realidade local.

Assim, considerando-se que a carne suína é a mais consumida no mundo e levando-se em conta os problemas que o sistema convencional de produção tem enfrentado, conclui-se que a carne suína orgânica produzida no Brasil terá grande chance de ganhar a preferência dos consumidores dos países desenvolvidos, onde há mercado promissor para tal produto (DUTRA JÚNIOR, 2004). No contexto da produção

orgânica de suíno, faz-se necessário o uso de raça que responda favoravelmente a esse sistema (FÁVERO *et al.*, 2007), o que vai ao encontro da utilização dos grupos genéticos nativos, uma vez que, há séculos, estes são criados extensivamente, alimentando-se de vegetação nativa, e estão adaptados a nichos ecológicos específicos, sobrevivendo a condições adversas, convivendo com agentes etiológicos, sem, no entanto, manifestar a doença, demonstrando resistência a enfermidades (CASTRO, s.d.; SCHIVERA, s.d).

Por isso tudo, é importante conservar os suínos cascos-de-burro, não só pela sua importância histórico-cultural, dado que um grupo genético representa um patrimônio de um país, mas também pela importância que eles têm para a suinocultura de subsistência. É fundamental ratificar que “raça” nativa não traduz mais a realidade genética do meio produtivo. O que se observa são agrupamentos genéticos de raça introduzida, que se foram definindo de acordo com suas características ao longo das primeiras décadas do século passado. O que está bastante claro, atualmente, é a perda quase total dos referenciais genéticos do suíno no Brasil. Isso significa dizer que há necessidade de uma ação com o fim de resgatar, estudar e conservar esses agrupamentos (LOVATTO, 1995). Várias experiências, tendo em vista o aproveitamento dessa genética, foram desenvolvidas recentemente (GROSSI *et al.*, 2006; SOLLERO, 2006; SOLLERO *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2009).

Tendo por base recursos genéticos locais previamente selecionados por gerações de agricultor, pretende-se também contribuir para a viabilização econômica do mundo rural, numa parceria futura com o próprio agricultor, através do papel que o melhoramento pode desempenhar, quer em nível quantitativo quer qualitativo, para a viabilização econômica da exploração agrícola familiar, gestora de sistemas agrícolas policulturais. Como paradigma, tem-se que a viabilidade do desenvolvimento rural passa pela sua viabilidade econômica e que esta apenas se afirmará com a valorização dos recursos genéticos locais. Mais ainda, essa valorização deverá ser não só em qualidade como também em quantidade, numa linha progressiva e harmônica.

1.4 REVISÃO DE LITERATURA

A suinocultura brasileira é constituída hoje por animais que podem ser classificados em dois grupos: i) o de raça exótica, incluindo-se os produtos dos cruzamentos e os híbridos comerciais; e ii) o de “raça” local – também chamados de raças nativas, crioulas, autóctones, nacionais e naturalizadas – e seus mestiços (ALBUQUERQUE *et al.*, 1990). Os animais do primeiro grupo são criados geralmente em sistema intensivo, com nível elevado de tecnologia, e constituem-se nos de maior interesse para o abate industrial, dada a exigência do mercado, principalmente nos grandes centros consumidores, para carne com menor teor de tecido adiposo. Trata-se de uma suinocultura que se fundamenta, principalmente, como fornecedora de matéria-prima para o processamento de carcaça. Já os suínos de raça nativa são criados em condições mais extensivas ou semiextensivas, com características de subsistência familiar, de baixa exigência de insumo. São animais que apresentam carcaças com maiores teores de gordura (ALBUQUERQUE *et al.*, 1990; FERREIRA *et al.*, 2004; PINHEIRO *et al.*, 2009).

1.4.1 Grupos genéticos nativos de suíno

No Brasil, os primeiros exemplares de suíno foram introduzidos por Martim Afonso de Souza e eram representantes das raças portuguesas. No entanto, segundo CASTRO *et al.* (2002), as raças espanholas, italianas e asiáticas também influenciaram a formação dos grupos genéticos nativos de suíno do Brasil.

Entre esses diversos grupos, o piau (Figura 1a) é, segundo CAVALCANTI (1985), o mais importante. Há indícios de que se tenha originado na zona

compreendida pelo sul de Goiás, Triângulo Mineiro e Oeste de São Paulo (FERREIRA *et al.*, 2004). Esse grupo concentra-se principalmente na bacia do rio Parnaíba (EGITO *et al.*, 2002), sendo o que possui o maior número de exemplar localizado atualmente (CASTRO *et al.*, 2002; CAVALCANTE NETO *et al.*, 2002; CAVALCANTE NETO *et al.*, 2007). Existem vários deles na Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) e na Universidade Federal de Viçosa (MG). Em 1986, foi reconhecido como raça pelo Ministério da Agricultura, porém SOLLERO *et al.* (2009), trabalhando com microssatélites, concluíram que a raça piau não se encontra geneticamente estruturada, o que dificulta certificação racial. O trabalho de SOUZA *et al.* (2009) mostrou que essa raça possui ancestralidade materna ibérica, comum a vários outros grupos genéticos nativos brasileiros.

Há também o nilo (Figura 1b), que apresenta grande semelhança com o porco alentejano, de Portugal, e o ibérico, da Espanha, o que levava a crer que, possivelmente, tivesse se formado a partir destes, hipótese recentemente confirmada pelos resultados de SOUZA *et al.* (2009).

O pirapetinga é muito antigo na Zona da Mata, em Minas Gerais, onde existiram criações importantes desses animais (Figura 1c). Originou-se, provavelmente, em fazendas localizadas na bacia do rio Pirapetinga, de onde se disseminou para municípios vizinhos e estado do Espírito Santo (VIANNA, 1985).

O histórico da raça moura (Figura 1d) não menciona exatamente sua formação, mas relata que os animais se multiplicaram rapidamente, espalhando-se pelos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (SOLLERO, 2006). Foram registrados, na Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS), vários exemplares no estado do Paraná. Existe, atualmente, um núcleo de conservação que vem sendo mantido pela Embrapa Suínos e Aves, localizado em Concórdia (SC), e outro na UNESP, em Ilha Solteira (SP). Os resultados do trabalho de SOUZA *et al.* (2009) não são conclusivos em relação à origem materna dessa raça, que, possivelmente, poderá ter sua confirmação a partir dos resultados obtidos no presente trabalho. SOLLERO *et al.* (2009) concluíram que a raça moura se encontra estruturada geneticamente, possuindo probabilidade de certificação racial.

Existente em sua maioria no Pantanal Mato-Grossense, o porco-monteiro (Figura 1e) é considerado “asselvajado”¹. Esses porcos são frequentes no Pantanal, principalmente no central. A densidade aparente desse espécime é 0,07 grupo/km², o que levou a uma estimativa de cerca de 9.800 grupos de porco-monteiro em todo o Pantanal (MOURÃO *et al.*, 2002). Esse suíno representa o caminho inverso da domesticação. Formou-se a partir das raças introduzidas no período colonial (SILVA & MAURO, 2002), que se encontraram em boas condições na forma livre devido ao fato de inúmeras fazendas terem sido saqueadas e destruídas na Guerra do Paraguai, iniciada em 1864. Entretanto, conforme MOURÃO *et al.* (2002), porcos foram introduzidos no Pantanal provavelmente há tanto tempo quanto o gado bovino, embora os moradores locais frequentemente associem a introdução dos porcos no Pantanal ao episódio da Guerra do Paraguai (1864-1870). Com a introdução de javali no Brasil e com a consequente liberação destes na natureza (IBAMA, 1998; MIRANDA & LUI, 2003), acredita-se que eles se tenham misturado ao porco-monteiro. Segundo ROSA *et al.* (2000), o javali tem sido cruzado com o porco-monteiro com o objetivo de se obter uma carne mais saudável e saborosa. Atualmente, os monteiros vêm sendo caçados para subsistência (RODINEY *et al.*, 2004), embora os animais ferais sejam protegidos pela Lei Federal 5197/67. Os resultados de GROSSI *et al.* (2006) mostraram, por meio do DNA mitocondrial, que esses animais, de fato, descendem das raças europeias trazidas no período colonial.

Encontram-se ainda o canastrão, do tipo céltico, que descende possivelmente da raça portuguesa bísara ou da raça *celta gallega*, da Espanha; o canastra (Figura 1f), que, segundo CASTRO *et al.* (2002), é do tipo ibérico, cuja pelagem é negra e cujo perfil é concavilíneo; o caruncho (Figura 2a), que, segundo VIANNA (1985), compreende animais de porte pequeno, grandes produtores de gordura, e de temperamento tranquilo; e o tatu (Figura 2b), que se acreditava ser derivado do porco macau, uma raça asiática introduzida no Brasil nos tempos coloniais – os resultados de SOUZA *et al.* (2009) sugerem ancestralidade materna ibérica para esse grupo genético,

¹SPONENBERG & TORRES (2004) definem “animal asselvajado” como o doméstico que escapou do contato direto com o homem e regressou ao estado selvagem, destacando que a forma selvagem nunca é retomada por completo.

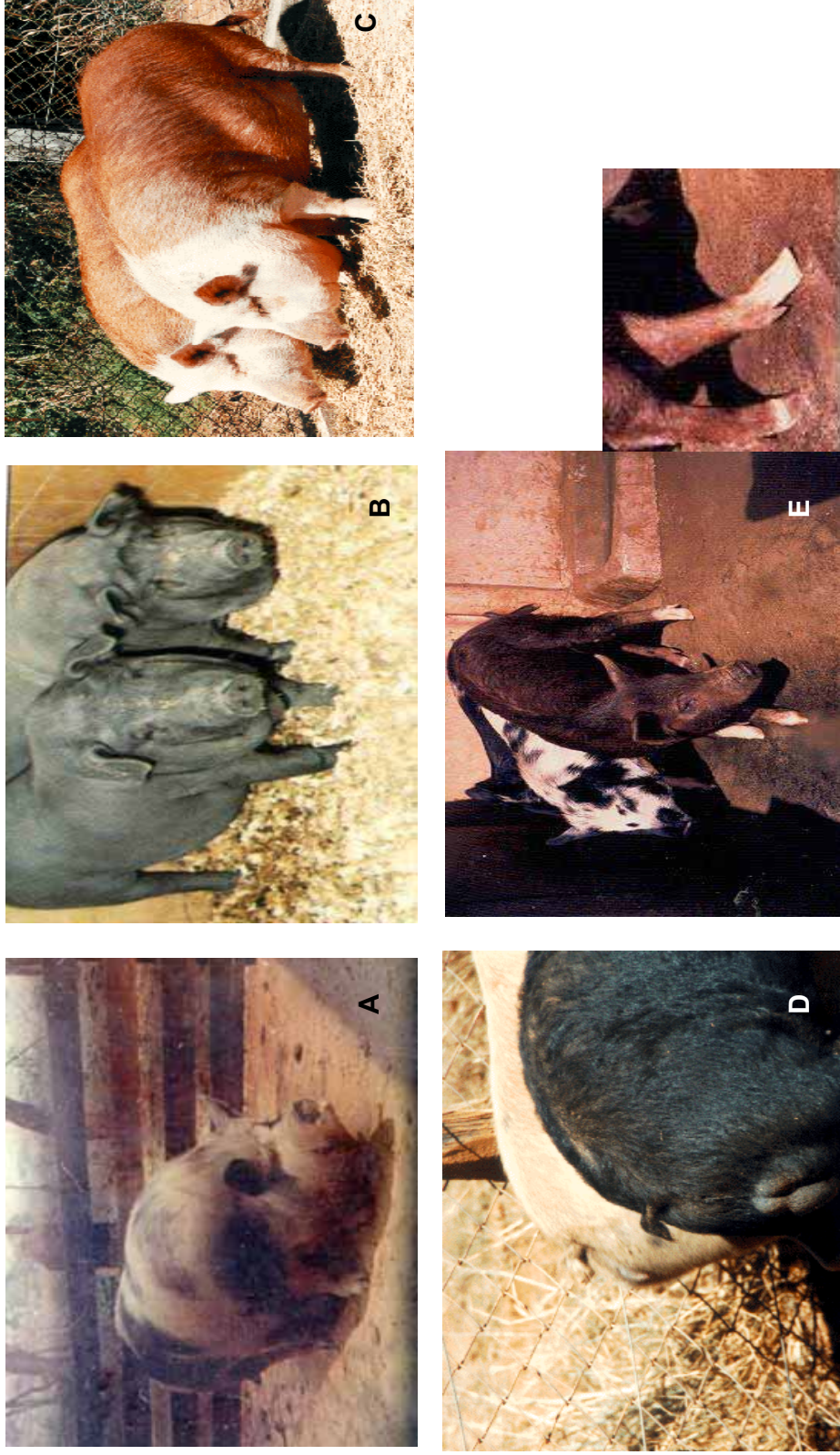
contudo ele pertence, fenotipicamente, ao tronco asiático (CASTRO *et al.*, 2002), sendo a pelagem mais comum a negra, pelada ou com cerdas raras e muito finas, e a pele também fina e macia.

Embora pouco conhecido, o simental (Figura 2c), segundo CARVALHO (1959) e GIANNONI (1973), formou-se no sul de Minas Gerais, sendo esses animais, nas décadas de 1960 e 1970, facilmente encontráveis na região de Itajubá, MG. O pereira, segundo VIANNA (1985), possui o perfil côncavo, as orelhas são grandes, do tipo ibérica, e sua pelagem, principal característica desse grupo genético, pode ser tordilha ou rosa, sendo a primeira mais comum, podendo ter pintas vermelhas.

Existem também no Brasil dois fenótipos, um conhecido como rabo-de-peixe (Figura 2d) e outro como casco-de-burro, sobre os quais ainda há controvérsia em relação à sua condição de raça – questiona-se se suas características não poderiam ocorrer em qualquer raça. A denominação casco-de-burro provém do fato de esses animais serem sindáctilos, ou seja, com casco fundido. O primeiro relato de sindactilia em suíno se deve a Charles Darwin, que a definiu como um fenômeno de mutação. Entre os grupos citados, o que contém o fenótipo casco-de-burro é o que tem suas populações em estado mais crítico (MARIANTE *et al.*, 2003). Esse grupo será mais bem apresentado no próximo capítulo, uma vez que é o objeto deste trabalho. Na Figura 2e, encontram-se dois exemplares de suíno casco-de-burro, em que se podem observar alguns dos pormenores descritos.



Figura 1. Principais grupos genéticos nativos de suíno do Brasil. Figura A: Piauí; B: Nilo; C: Pirapetinga; D: Moura; E: Monteiro; e F: Canastra



(Fonte: www.sossuinos.com.br/consultas/cascoburro.htm)

Figura 2. Principais grupos genéticos nativos de suíno do Brasil. Figura A: Caruncho; B: Tatu; C: Simental; D: Rabo-de-peixe; e E casco-de-burro, com o pormenor do seu casco fundido

1.4.2 Conservação de raça

A preocupação com a conservação da variabilidade genética começou no mundo animal, tratando-se primeiro da conservação das espécies e, posteriormente, da manutenção da diversidade genética intraespécie. Essa preocupação deu lugar ao desenvolvimento de zoológicos, áreas naturais protegidas e à aplicação de medidas conservacionistas, como as proibições, as reservas, as espécies protegidas etc. A conservação do mundo animal é entendida como a salvaguarda de um patrimônio, não sendo prioritário o conceito de funcionalidade.

Até meados do século passado, essa preocupação conservacionista do mundo doméstico não se fez extensiva, já que não se tomou consciência do perigo que se afluía sobre a variabilidade genética das espécies domésticas, tanto inter quanto intrarraça. A ausência de medidas de proteção tem gerado, no mundo selvagem, a extinção das espécies e, no mundo doméstico, um processo progressivo de homogeneização das mesmas, com a perda da multiplicidade das raças que puderam ter uma aptidão genética especial para alguns propósitos, os quais, por diversos motivos, passam a carecer de importância.

A diminuição da diversidade genética tem sido atribuída, a princípio, ao declínio populacional e à extinção de determinada raça e linhagem. No entanto, além da extinção de espécie, outra forma de perda de biodiversidade é a redução da diversidade intraespécie (REGE & GIBSON, 2003). De acordo com ZÁRATE (1996), a perda de diversidade poderá ser problemática, pois os recursos genéticos animais possuem alelos ainda não estudados, que, no futuro, poderão ser determinantes para os produtores rurais, especialmente para os das regiões tropicais.

Segundo TORO *et al.* (2000), vários fatores podem causar diminuição numérica em determinada raça, principalmente pressões econômicas advindas da mudança do sistema de produção. As duas grandes causas de erosão genética animal são a tendência de crescimento mundial da confiança na produção de poucas raças em sistemas de produção muito intensiva e o cruzamento indiscriminado entre os animais das populações locais e os das raças consideradas “melhoradoras”.

A conservação dos recursos genéticos animais no Brasil, de acordo com EGITO *et al.* (2002) e com MARIANTE *et al.* (2009), vem sendo realizada pelos Núcleos de Conservação Natural *in situ* e *ex situ*. No primeiro tipo, os animais são mantidos no seu *habitat* e monitorados conforme manejo geral preconizado para a espécie. Já na conservação *ex situ*, desenvolvem-se bancos de germoplasma, tais como o armazenamento de sêmen e de embrião. Entre as atividades desenvolvidas nos núcleos, podem-se citar: (a) identificação das populações em risco de extinção ou em diluição genética; (b) caracterização fenotípica e genética; e (c) avaliação do potencial produtivo da população.

Os núcleos de conservação natural *in situ* dos recursos genéticos suínos no Brasil, segundo SERENO & SERENO (2000), estão situados nas cidades de Boa Vista (RR), com os suínos cascos-de-burro; em Lages (SC) e Igarapé (MG), com os da raça moura; e em Curitiba (PR), com suínos SRD (sem raça definida). Contudo, apesar da afirmação de SERENO & SERENO (2000), não foi encontrado contato que garantisse ainda existirem animais cascos-de-burro em Boa Vista (RR). EGITO *et al.* (2002) confirmam a existência de suíno da raça moura no estado de Santa Catarina e da raça piau no estado de Goiás. MARIANTE *et al.* (2009) completam essa informação, informando que há núcleos de conservação em todo o país, que consistem, normalmente, em centros de pesquisa e têm o objetivo de resgatar as pequenas populações efetivas das raças em perigo de extinção; são contemplados por esses núcleos os grupos genéticos piau, moura e Monteiro.

CASTRO *et al.* (2002), visando a conservar os recursos genéticos suínos nativos, realizaram levantamento para identificar a ocorrência dessas populações no Distrito Federal e identificaram, em 26 propriedades, 253 animais de diversos grupos genéticos nativos. Nessa região, predominou o piau (n=119; 47%), seguido do nilo (n=85; 33,6%), pirapetinga (n=15; 5,9%) e caruncho (n=12; 4,7%). Esses autores identificaram um tipo conhecido como cuié (n=10; 3,9%), que tem pele negra, poucas cerdas e orelhas muito pequenas, em forma de colher. Documentaram ainda outro tipo, de porte pequeno, com patas curtas, localmente conhecido como bassé (n=12, 4,7%).

Em estudos com grupos genéticos nativos de suíno na Paraíba, CAVALCANTE NETO *et al.* (2007) concluíram que estes estão escassos no estado, notadamente nas regiões do litoral e brejo, e que a maior predominância dos animais SRD é fruto dos cruzamentos indiscriminados entre os animais de grupo nativo e os de raça importada, medida que poderá levá-los à extinção.

A crescente procura por populações mais produtivas tem causado, não somente nos suínos mas também em praticamente todas as espécies domésticas, redução no número – até mesmo a eliminação – de indivíduo, linhagem e raça, com consequente perda de material genético, cuja importância pode não ter sido suficientemente avaliada. Existe, no mundo, cerca de 40 espécies domésticas (búfalos, cabras, cavalos, bovinos, suínos etc.). Das raças existentes hoje, 70% estão nos países em desenvolvimento (REGE & GIBSON, 2003). Em uma análise global, envolvendo as raças domésticas mamíferas, observou-se a extinção de 643 raças (grupos genéticos). Dados relativos ao ano de extinção foram relatados para 27% (188) dessas raças, sendo possível observar que 15 foram extintas antes de 1990; 111 entre 1990 e 1999; e, entre 2000 e 2006, desapareceram 62 raças (FAO, 2006).

TROVO & DUARTE (1981) comentaram que o estudo e a conservação de germoplasma refletem uma preocupação mundial de avaliação da capacidade produtiva do germoplasma nas regiões de origem ou nas em que se adaptou. Portanto a preservação das raças nativas deixou de ser uma preocupação de natureza histórica para se tornar uma realidade (CAVALCANTE NETO *et al.*, 2007). Vários órgãos investem recursos para evitar que as fontes genéticas nativas desapareçam devido à tendência de a pecuária, de modo geral, supervalorizar a exploração das linhagens altamente especializadas. Devido à baixa produtividade dos animais de raça nativa, devem-se usar estratégias para conseguir maior valor agregado ao produto e, conseqüentemente, maiores lucros para os pequenos proprietários rurais (SANTOS *et al.*, 2002; PAIVA, 2005).

Sabe-se que uma das principais formas de conservação das raças locais se dá através de sua inserção em um sistema de produção – com manejo apropriado ao ambiente – no qual haja um rendimento econômico que favoreça a utilização da raça,

estimulando a sua criação (SANTOS *et al.*, 2002). Além disso, a conservação não pode ser uma ação isolada no sistema de produção local, mas, sim, fazer parte tanto dos programas de desenvolvimento quanto das pesquisas locais e regionais (UDO, 2003). BLACKBURN *et al.* (1998) propuseram que se avalie o sistema de produção nos termos biológicos e de desenvolvimento social, para que se possa determinar o valor do recurso genético, assim como entender sua capacidade e função como parte de um sistema de criação.

Não existindo estatísticas diferenciadas para a população de suíno das raças locais, a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2009) estima que a população mundial seja de 993 milhões de cabeças, com um aumento de 21% entre 1987 e 2007. Um percentual de 57,1% da população suína total encontra-se na Ásia, com 523 milhões de cabeças, o que indica a importância desses animais para a alimentação humana nessa região. Em seguida, vem a Europa, com 210 milhões de cabeças (22,9%); e a América, com 151 milhões (16,5%). Destas, 89 milhões de cabeças (9,7%) correspondem à América do Norte, pertencendo aos E.U.A. 62 milhões de cabeças (6,8%); ao Canadá, 12 milhões (1,3%); e, ao México, 14 milhões (1,5%). Enquanto isso, na América do Sul, existem 55 milhões de cabeças (6,0%), das quais, na Argentina, acham-se 3 milhões (0,3%); o Brasil está com 31 milhões (3,4%); Chile, com 2 milhões (0,2%); Colômbia, com 2 milhões (0,2%); Equador, com 3 milhões (0,3%); Paraguai, com 3 milhões (0,3%); Peru, com 3 milhões (0,3%); Venezuela, com 5 milhões (0,5%); o Caribe, com 4 milhões (0,4%); Cuba participa com 2 milhões (0,2 %); e a América Central, com 3 milhões (0,3 %). Por sua vez, a África possui 27 milhões de cabeças (2,9 %), enquanto a Oceania, 5 milhões (0,5 %).

A comunidade internacional adotou, em setembro de 2007, o primeiro plano de ação mundial sobre os recursos zoogenéticos, que compreende 23 prioridades estratégicas dirigidas a combater a erosão da diversidade animal e a utilizar, de maneira sustentável, tais recursos. Aprovou-se também a Declaração de Interlaken² sobre os recursos zoogenéticos, por meio da qual confirmaram suas responsabilidades

² Uma declaração política que reflete o compromisso dos países com uma sábia gestão dos recursos genéticos animais, visando a alcançar a segurança alimentar e o desenvolvimento sustentável.

comuns e individuais a respeito da conservação, utilização sustentável e desenvolvimento dos recursos para a alimentação e a agricultura; da segurança alimentar mundial; da melhoria do estado nutricional das pessoas; e do desenvolvimento rural (FAO, 2007).

1.4.3 Recurso genético (RG) e o novo desafio do desenvolvimento rural

Os Recursos Genéticos Animais são populações geneticamente únicas, formadas através de todo o processo de domesticação, em que cada espécie animal é utilizada para a produção de alimento e para a agricultura, junto aos parentes selvagens mais próximos, incluindo-se também, de modo geral, todas as espécies e raças que apresentem um interesse econômico, científico e cultural para a humanidade e para a agricultura ou que o terão no futuro.

O homem rural é o que vive e compreende a natureza – porque com ela se identifica. Não é meramente o habitante passivo do meio rural, mas o agricultor ativo, que interage com os RG, que deles cuida nas múltiplas formas do seu sistema agrícola, que os conserva, multiplica e melhora. Não é o empresário que busca o lucro no mais curto espaço de tempo. Ao contrário, o homem rural sabe que o seu sistema só tem viabilidade no respeito à sua sustentabilidade. Ele é o que usa os RG na ponderação de quem sabe executar a receita – o seu sistema agrícola –, que não é somente um coletor de ingrediente.

É esse RG que se considera condição imprescindível para o desenvolvimento rural que se pretende. É de toda a urgência e de toda a justiça fazê-lo retomar sua posição de dignidade. Com efeito, ele tem sido vítima do homem urbano que, dono do poder político, tem-lhe negado o reconhecimento dos serviços prestados para o bem comum ao longo das gerações.

Segundo EVANGELISTA (2000), as culturas de fumo, mandioca e feijão despontam quase exclusivas da agricultura familiar; e chamam a atenção também os percentuais alcançados na pecuária de pequenos animais – suínos e aves/ovos.

Nesse contexto, destaca-se a agricultura orgânica, sendo a demanda pela carne suína assim produzida superior à oferta na maioria dos países da União Europeia. Entretanto essa produção orgânica enfrenta dois tipos de problema: falta de matéria-prima e dificuldade para cumprir todas as normas exigidas (DAROLT, 2001).

Na produção orgânica de suíno, é proibida a utilização de promotor de crescimento, aditivo químico e de qualquer tipo de antibiótico. A sanidade do plantel é controlada por meio dos tratamentos homeopáticos e fitoterápicos. Os suínos não podem ser confinados, e sim criados em espaço aberto adequado para movimentação, alimentação, descanso e reprodução. Toda a ração dos suínos é de fabricação caseira e exclusivamente vegetal (MACHADO FILHO *et al.*, 2001; REDAÇÃO SI, 2003; LUDKE *et al.*, 2007). São permitidos a castração, o emprego da técnica de inseminação artificial e a administração de todas as vacinas. O suinocultor orgânico também cumpre obrigações sociais e legais. Por exemplo, ele não pode usar mão de obra infantil, e todos os trabalhadores devem ser registrados. A produção orgânica de suíno é fiscalizada regularmente pelas certificadoras (REDAÇÃO SI, 2003).

Outro aspecto importante que favorece a produção orgânica são justamente os métodos usuais de controle de doença na suinocultura intensiva, como medicação e isolamento dos animais, que caminham em sentido contrário ao desejo do consumidor que queira adquirir produtos de qualidade, sem a presença de droga e que não ofereçam risco à saúde nem ao meio ambiente.

DUTRA JÚNIOR (2004) afirmou que o consumo de produto orgânico cresce em torno de 20% ao ano nos Estados Unidos e na Europa, e 25% no Japão, movimentando, no mundo, US\$ 20 bilhões por ano. No Brasil, segundo o mesmo autor, na rede de supermercado Pão de Açúcar, que oferece produtos orgânicos regularmente, a procura aumentou em 50%. A rede Carrefour, em seu Programa de Garantia de Origem Carrefour, está fazendo contrato com produtores dos alimentos agroecológicos, e um dos seus objetivos é disponibilizar carne e embutidos de origem suína para seus clientes. Espera-se que a produção brasileira dos itens agroecológicos movimente, por ano, US\$ 200 milhões, e as exportações respondam por 70% desse valor.

Comparando as diferenças genéticas e ambientais, vale a pena referir que o maior produtor mundial – a China – investe mais na diversificação genética e bem-estar dos animais que na especialização genética em sistemas de confinamento, como é a tendência no Brasil (DAROLT, 2001). Até a década passada, segundo ROPPA (1999), mais de 80% da suinocultura chinesa eram de pequena granja de origem familiar, com média de dez matrizes por criador. O segredo do sucesso está no número de raça nativa utilizada, fato que vem exatamente ao encontro dos princípios da agricultura orgânica (DAROLT, 2001).

Os animais de raça nativa apresentam o perfil ideal para a suinocultura orgânica, pois se adequam perfeitamente ao sistema extensivo e, devido à sua rusticidade (SOLLERO *et al.*, 2009; CASTRO, s.d), dispensam aditivos alimentares, como promotor de crescimento, aditivo químico e antibiótico, ingredientes proibidos na produção orgânica. Ressalta-se ainda a grande aceitação que esses animais apresentam aos alimentos alternativos, bastante utilizados na agricultura orgânica (LUDKE *et al.*, 2007). Animais melhorados necessitam, para a sua máxima produção, de alimentação balanceada, ficando, porém, a despeito de serem mais produtivos, menos resistentes a doenças, ou seja, são mais exigentes em relação a cuidados sanitários, como controle dos parasitas internos e externos, sendo ainda mais exigentes em relação à alimentação e manejo (CASTRO, s.d.). Portanto esses animais são próprios para criações intensivas, sob orientação técnica específica, visando a atender, principalmente, à demanda alimentar dos grandes centros urbanos, enquanto os nativos, como já explanado, adequam-se a criações extensivas, de subsistência, ou seja, à produção para o sustento e comercialização do excedente.

Na Península Ibérica, por exemplo, suínos nativos continuam, ainda hoje, a ser criados como sempre o foram, ou seja, em perfeita liberdade e harmonia com a natureza. Ao longo do dia, no seu vagar pelo montado³, o animal encontra sustento em bolotas (*Quercus ilex*), ervas e restolhos. E é precisamente essa dieta equilibrada que dá sabor à sua carne, tornando-a tão apreciada (ver Anexo). Na verdade, o que

³ A palavra "montado" é utilizada para designar as florestas de sobreiro e azinheira e os campos de pastagem de Portugal e da Espanha, assim como o tipo de agricultura tradicional associado à região.

mudou foi o reconhecimento oficial da sua especificidade e da qualidade da sua carne pela certificação, sendo os produtos oriundos dessas raças um diferencial em relação aos mesmos produtos oriundos dos animais de criação industrial.

No Brasil, a suinocultura de subsistência, nos últimos sete anos, esteve em declínio, enquanto a industrial apresentou aumento significativo (ABIPECS⁴, 2008). Ainda segundo a ABIPECS (2008), houve expansão de 3,4% nos alojamentos, e o plantel de matriz industrial atingiu 1,52 milhão de cabeças, o que compensou, em grande parte, a retração do rebanho de subsistência. As empresas associadas à ABIPECS, que detêm 64% do plantel industrial do país, responderam por quase 90% da produção. Já o efetivo de subsistência, com 26% das fêmeas reprodutoras (865 mil), representou apenas 10% do total produzido.

1.4.4 Características ligadas à resistência a doenças

A eficiência dos sistemas de produção de suíno é frequentemente reduzida devido a falhas na reprodução e/ou a doenças, com consequente aumento dos custos para os produtores e para o mercado consumidor (SILVA *et al.*, 2003). A resistência a doenças tem sido um grande desafio para os geneticistas. Esforços em pesquisas conduzidas mundialmente descrevem vários exemplos de diferença genética entre os animais quanto à resistência às doenças (BISHOP *et al.*, 2002).

ROTHSCHILD (1999) afirmou que, considerando-se somente as doenças, há perdas de vários bilhões de dólares na indústria suinícola, em virtude do aumento de mortalidade, morbidade, custos veterinários e perdas de produto. Do ponto de vista do melhoramento genético, esses problemas ainda estão relacionados aos menores ganhos genéticos anuais, provocando aumento no intervalo de geração e/ou diminuição da intensidade de seleção. Ressalta-se, também, que a falta de efetividade de algumas vacinas é preocupante, razão pela qual é imperativo um melhor entendimento do sistema imunológico dos animais bem como cuidados com o ambiente, dado que o

⁴ Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína.

surgimento das doenças é, de modo geral, resultado da interação entre a predisposição genética do animal e o ambiente ao qual ele é exposto.

Assim, se o animal tem predisposição genética para contrair certa doença, os métodos-padrão de prevenção podem ser só parcialmente efetivos na proteção, em razão do ambiente. Uma alternativa viável pode ser a seleção para o aumento da resistência às doenças nos animais domésticos, o que é, no entanto, extremamente complexo. Mas, na Universidade de Guelph, a seleção de suíno, por meio de soluções BLUP para alta e baixa resposta imunológica, teve sucesso no estabelecimento de diferença genética (MALLARD *et al.*, 1992).

As raças nativas podem ser, todavia, fontes de alelo capaz de melhorar a resistência das raças exóticas, uma vez que, quanto mais produtivas forem as raças, maiores serão suas exigências em cuidados sanitários, de alimentação e de instalações. Portanto a necessidade de se avaliar a rusticidade dos animais e a sua resistência às doenças faz com que os suínos de raça nativa assumam grande importância do ponto de vista genético. Esses animais têm sido mantidos por diversas décadas sob seleção natural e podem, eventualmente, apresentar características zootecnicamente importantes e herdáveis – eliminadas, hoje, pela seleção artificial e dirigida, dos grupos genéticos/raças destinados à produção de carne –, podendo servir como reserva estratégica para o futuro (IRGANG, 1986; FÁVERO *et al.*, 2007).

Por isso a marginalização e a falta de informação a respeito dos grupos genéticos de suíno nativo devem ser encaradas com muita seriedade, por ser a perda desses recursos genéticos uma das grandes preocupações atuais em todos os países de suinocultura adiantada, devido à contribuição que eles podem trazer para a variabilidade genética, propiciando condições alternativas na adequação de planos de melhoramento em nova situação e exigência (BENEVIDES FILHO, 1982; FERREIRA *et al.*, 2004; FÁVERO *et al.*, 2007).

Ressalta-se que este trabalho é o primeiro que se dedica a estudar as populações de suíno casco-de-burro, que, antes de terem sido estudadas suficientemente, já se encontram em risco de extinção. O que não falta são especulações, na literatura pesquisada, a respeito de esses animais terem uma maior

resistência à aftosa que os de casco fendido (ARIAS, 2000; OSLINGER *et al.*, 2006). Porém não há nada que comprove, de fato, essa resistência, e essas especulações devem-se, basicamente, ao fato de essa enfermidade atacar apenas os animais de casco fendido, principalmente bovino, ovino, caprino, cervídeo, búfalo e, inclusive, o suíno. Afeta também elefante, camelo, lhama, rato e capivara. Mas não afeta os animais de casco fundido, como cavalo, asno e mula. Segundo BISHOP *et al.* (2002), nos suínos, a peste africana, a aftosa, a rinite atrófica e a diarreia neonatal e pós-natal já foram documentadas quanto à variação genética na resistência do hospedeiro, indicando uma base excelente para a realização de seleção para resistência a doenças.

1.4.5 Marcador molecular

Existe DNA em duas diferentes partes das células dos mamíferos, no núcleo e na mitocôndria, sendo denominados de nuclear e de mitocondrial respectivamente, ambos constituindo o DNA total. Com base nestes, é possível estudar a ancestralidade materna (marcadores uniparentais do DNA mitocondrial) e a paterna (marcadores uniparentais do cromossomo Y) assim como a ancestralidade genômica (marcador biparental autossômico).

O DNA mitocondrial e o segmento não homólogo do cromossomo sexual Y apresentam características genéticas em comum. Primeiro, eles são herdados de apenas um dos pais: o DNA mitocondrial é transmitido pela mãe por meio do óvulo para filho e filha, enquanto o cromossomo Y é transmitido pelo pai através do espermatozóide apenas para os filhos machos. Segundo, ambos não se recombinam, são transmitidos às gerações seguintes em bloco de gene denominado 'haplótipo', que permanece inalterado em "patrilinhagem" e em "matrilinhagem" até que ocorra mutação. Além disso, o DNA mitocondrial e o cromossomo Y fornecem informações complementares, que permitem alcançar inúmeras gerações no passado, e, com isso, reconstruir a história genética não só de uma espécie como também de uma raça.

Embora esteja no DNA nuclear, o cromossomo Y não apresenta uma cópia homóloga como acontece com os demais cromossomos. A falta de recombinação na maior parte desse cromossomo leva a que ele se comporte como um fragmento único

de DNA (MIRANDA, 2008; SCHWENGBER, 2008), que se transmite intacto por via paterna à descendência masculina.

As primeiras demonstrações de variação genética em nível molecular foram realizadas nos primórdios do século XX por Landsteiner, em 1901, e por Nuttall, em 1904. Esses estudos pioneiros demonstraram que os seres humanos mostravam uma variação hereditária no sistema ABO dos grupos sanguíneos, e esse conceito aplicou-se posteriormente ao primeiro estudo sistemático de variação genética em diferentes grupos humanos, realizado por Hirszfeld e Hirszfeld em 1919 (CAVALLI-SFORZA *et al.*, 1994).

Todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como isoenzima, ou um segmento específico de DNA (correspondentemente às regiões expressas ou não do genoma) é um marcador molecular (FERREIRA & GRATTAPLAGLIA, 1998; REGITANO & COUTINHO, 2001; MATIOLI, 2001). Este deve reunir várias características para que sua utilização seja maximizada (CHENG & CRITTENDEN, 1994), que, entre elas, deve ter boa distribuição ao longo do genoma e possuir alto grau de polimorfismo. A técnica para analisá-lo deve ser rápida e prática; e deve ser possível repeti-la em outro laboratório (MILACH, 1998; MATIOLI, 2001; MÉNDEZ, 2002).

O princípio básico envolvido na obtenção e detecção de cada classe de marcador consiste no uso de eletroforese. Esse termo foi criado por Michaelis em 1909, o qual descreve a migração de colóide sob a influência de campo elétrico. Entretanto foi o físico russo Reus, que, em 1807, iniciou o estudo da migração produzida pela ação de um campo elétrico em diversos colóides minerais (MARTÍNEZ *et al.*, 1985).

Ao se verificar o seu comportamento de acordo com as leis básicas de herança de Mendel, um marcador molecular pode ser classificado como genético ou não (MILACH, 1998; REGITANO & COUTINHO, 2001). Isso é feito, por exemplo, por meio do estudo do comportamento do marcador em uma população segregante. Portanto o simples fato de o marcador ser DNA ou produto da transcrição e tradução de sequência de DNA não implica que se constitua em um marcador “genético”, como se supõe frequentemente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998) – pois este se caracteriza por

ser capaz de revelar a composição genotípica dos indivíduos com base em seus fenótipos (REGITANO & COUTINHO, 2001).

Um marcador genético ideal deve apresentar os seguintes atributos: a) alto nível de polimorfismo; b) estabilidade nos diferentes ambientes; c) detecção de grande número de *locus* não ligado; e d) ser de herança simples (MILACH, 1998; MATIOLI, 2001).

Vários tipos de marcador genético vêm sendo utilizados em estudos de variabilidade genética nos animais. As primeiras contribuições foram os polimorfismos dos antígenos eritrocitários (STORMONT & CUMLEY, 1943), que, devido à sua dominância, não permitem a identificação dos indivíduos heterozigotos.

Com o desenvolvimento das técnicas de eletroforese de proteína (SMITHIES, 1955), associadas aos métodos de coloração histoquímica (HUNTER & MAEKERT, 1957), surgiu outra classe de marcador genético (isoenzima e polimorfismos de proteína), que, embora de grande importância (LARA & CONTEL, 1997; LARA *et al.*, 2001; LARA *et al.*, 2005), não tem sido muito utilizada nos estudos de população dos animais zootécnicos no Brasil. Ainda assim, polimorfismos proteicos são, segundo BAUMUNG *et al.* 2004, utilizados em 29% dos trabalhos envolvendo a análise da diversidade de Recursos Genéticos Animais. Isso porque, além de sua técnica ser barata e acessível, permite investigar a estrutura das populações, estimar o conteúdo de variabilidade e elucidar vários pontos, como fluxo gênico, deriva genética, filogenia etc., inferindo a variação genética com base em duas suposições. A primeira estabelece que as alterações nas mobilidades eletroforéticas das proteínas refletem as modificações ocorridas nas sequências codificadoras do DNA, enquanto a segunda pressupõe que os genes cujas proteínas estão sendo analisadas expressam-se codominantemente, de forma que, por intermédio dos fenótipos eletroforéticos, podem-se inferir os genótipos dos indivíduos (LARA, 1998). Entretanto apenas parte da variação genética de uma população pode ser observada por meio dessa classe de marcador: aquela resultante das mutações que ocorrem em região codificadora do genoma e que causam alteração detectável do produto gênico, ou seja, que resultam de alteração na carga líquida da proteína pela substituição dos aminoácidos básicos por ácidos ou neutros e vice-versa.

A partir de 1970, porém, essa limitação foi superada com o desenvolvimento de diversas técnicas de análise de DNA, surgindo, aos poucos, as de estudo direto da variação do DNA aplicadas à produção animal. Inicialmente, utilizaram-se as enzimas de restrição, que permitiram a análise de comprimento de fragmento de restrição de DNA (SAMBROOK *et al.*, 1975), que são os RFLP – *restriction fragment length polymorphism* –, ainda hoje muito utilizados (CULAU *et al.*, 2002; ALONSO *et al.*, 2003; LUERCE *et al.*, 2009). Com essa metodologia, comprovou-se rapidamente que os genomas tinham níveis de variação muito superiores aos observados por meio de análise de proteína. Demonstrou-se que um de cada 250 ou 500 nucleotídeos acabava apresentando alguma variação (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

Em meados da década de 1980, contudo, foram desenvolvidas inúmeras aplicações da reação em cadeia de polimerase, PCR – *Polimerase Chain Reaction* –, no campo da Biologia Molecular. A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmento de DNA via PCR abriram o caminho para uma mudança no paradigma genético básico: da inferência do genótipo por meio do fenótipo, em que Mendel foi o pioneiro na análise direta da variação na sequência de DNA. Essa mudança de enfoque foi denominada transição da “genética mendeliana” para a “genética genômica” (BECKMANN, 1988).

Desenvolvida por SAIKI *et al.* (1985) e aperfeiçoada por MULLIS & FALOONA (1987) e por SAIKI *et al.* (1988), a PCR é uma técnica da biologia molecular que permite replicação *in vitro* do DNA de forma extremamente rápida. Por meio dela, quantidades mínimas de material genético podem ser amplificadas inúmeras vezes em poucas horas, permitindo a detecção rápida e confiável dos marcadores genéticos. Ela está desenhada de acordo com o princípio natural de replicação do DNA, que é um processo que transcorre em três passos, os quais, em conjunto, designam-se como um ciclo: 1) desnaturação; 2) pareamento; e 3) extensão. Esse processo é realizado em termociclador, que é um equipamento que controla e alterna as temperaturas automaticamente durante períodos programados de tempo para o número apropriado de ciclo da PCR (entre 30 e 40 ciclos geralmente). O objetivo da PCR é produzir quantidade apreciável de um segmento específico de DNA por meio de uma quantidade mínima. O DNA molde – que pode ser qualquer forma de DNA de cadeia dupla, seja o

nuclear seja o mitocondrial – sofre amplificação controlada pela enzima Taq polimerase termoestável, obtendo-se inúmeras cópias do fragmento de DNA de interesse.

A descrição feita posteriormente por SAIKI *et al.* (1988) substituiu o fragmento de Klenow, de *E. Coli*, pela enzima Taq polimerase – que é isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, que vive em elevada temperatura –, tornando possível, assim, a utilização dos marcadores moleculares de DNA em larga escala. Isso possibilitou a reação de PCR ser passível de automatização e aumentou sua especificidade e sensibilidade, além de possibilitar a amplificação dos fragmentos maiores.

O sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma sequência precisa de DNA, aliada a simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outra espécie), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos iniciadores.

O desenvolvimento do processo de amplificação em cadeia usando-se uma DNA polimerase (MULLIS & FALOONA, 1987; SAIKI *et al.*, 1988) levou à descrição de outras classes de marcador molecular, em que grande avanço ocorreu em 1990, com a ideia de utilizar iniciadores mais curtos e de sequência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando, assim, a necessidade do conhecimento prévio da sequência. A técnica chama-se RAPD – *randomly amplified polymorphic DNA* – e foi desenvolvida nos Estados Unidos (WILLIAMS *et al.*, 1990; WELSH & McCLELLAND, 1990), a qual é, ainda hoje, muito utilizada (GIMENEZ *et al.*, 2003; GIMENEZ & LUCCA, 2005; CAPUTO, 2005; LEAL *et al.*, 2010), embora apresente baixo conteúdo de informação genética por *locus* e apenas um alelo seja detectado – que é o segmento amplificado, enquanto as demais variações alélicas são classificadas conjuntamente como alelo nulo. Devido a isso, genótipos heterozigotos não podem ser diretamente discriminados dos homozigotos – essa limitação é comumente descrita como “dominância” dos marcadores. Outra limitação é o desconhecimento prévio da base genética das bandas RAPD, que só podem ser consideradas um marcador genético depois de verificada sua segregação de parental para descendente.

Descobriram também os minissatélites (JEFFREYS *et al.*, 1985) ou VNTR – número variável de repetição *in tandem* (SIGNER *et al.*, 1994; BARROS *et al.*, 2008). Em seguida, os microssatélites (WEBER & MAY, 1989; TAUTZ, 1989), que são, na atualidade, muito utilizados em estudos de suídeo (FERREIRA *et al.*, 2009; SOLLERO *et al.*, 2009; REVIDATTI, 2009). E, posteriormente, os AFLP (VOS *et al.*, 1995) – *amplified fragment length polymorphisms* (MARCHI *et al.*, 2007; GAO *et al.*, 2008). Na nomenclatura proposta por CHAMBERS & MACAVOY (2000), os VNTR são descritos como uma grande classe, composta por microssatélites, minissatélites e satélites.

Esses principais tipos de marcador molecular podem ser classificados em dois grupos, conforme as duas metodologias utilizadas para identificá-los: hibridização e amplificação de DNA. No primeiro grupo, estão os RFLP e os minissatélites, enquanto, no segundo, encontram-se os revelados por amplificação, que incluem os marcadores do tipo RAPD, microssatélite e AFLP. Nesse último grupo, enquadram-se ainda os SCAR – *sequence characterized amplified regions* – ou ASA – *amplified specific amplicon* (XU *et al.*, 2001; YAU *et al.*, 2002).

Novos marcadores genéticos continuam sendo identificados e mapeados na espécie suína, além dos estudos das interações entre os mapas e expansão dos mapas de QTL. Recentemente, em várias espécies animais, têm sido estudados os SNP (KIM & MISRA, 2007; WIEDMANN *et al.*, 2008; RAMOS *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2009), que são as mais frequentes formas de variação genética, que se mantêm nas gerações futuras – 90% das variações genéticas vêm dos SNP. Eles têm se tornado marcadores de preferência por sua grande abundância e pelo desenvolvimento das tecnologias de genotipagem em larga escala.

1.4.5.1 Microssatélites

Na maioria das espécies, apenas pequena parte do genoma consiste dos genes que codificam proteínas. O restante do genoma, durante muito tempo, foi considerado “DNA sem função”, e, nessa parte, incluíam-se os microssatélites. No entanto estudos vêm demonstrando que diversas funções estão relacionadas às sequências repetitivas, inclusive nas regiões codificantes (SCHLÖTTERER, 2000; LI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004).

Chamados também de SSR (*simple sequence repeat* [sequência simples repetida]) ou STR (*short tandem repeat* [pequenas repetições *in tandem*]), os microssatélites são reconhecidos pelo alto polimorfismo, por especificidade (TAUTZ, 1993), por serem suscetíveis a amplificação por PCR *multiplex* e por permitirem a genotipagem em gel de fluorescência semi-automatizado (JAKABOVÁ *et al.*, 2002) como também em gel de poliacrilamida, corado com nitrato de prata.

Os microssatélites são sequências moderadamente repetitivas, formadas por repetições *in tandem* de 1 a 6 (mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos) pares de base (LITT & LUTY, 1989). Essas sequências têm sido observadas em todos os genomas eucariontes, mas, embora em muito pouca medida, nos procariontes também (HAMADA *et al.*, 1982; WEBER & MAY, 1989; ZANE *et al.*, 2002). Calcula-se que existam pelo menos 35.000 sequências desse tipo de genoma haplóide humano distribuídas aleatoriamente, o que leva a crer que se encontrem em cada 100.000 pb aproximadamente (WEBER, 1990). Nos indivíduos eucariontes, é possível encontrar pelo menos uma sequência microssatélite a cada 10.000 pb (TAUTZ, 1989). Parece que estão distribuídos uniformemente nos cromossomos (TAUTZ, 1989; LITT & LUTY, 1989), embora se tenha observado que estão pouco representados nas regiões teloméricas e centroméricas, tanto no homem (STALLINGS *et al.*, 1991) quanto em animais domésticos (WINTER *et al.*, 1992).

Os microssatélites, de acordo com sua estrutura, podem ser de três tipos: perfeitos, que contêm um único motivo nucleotídico repetido n vezes (ex.: CACACACACACA); imperfeitos, que contêm uma sequência não repetitiva intercalada entre as repetições (ex.: CACACACACATGCTCACACA); e compostos, que são constituídos de duas ou mais sequências de motivos repetitivos diferentes (ex.: CACACACACACAGAGAGAGAGA) (WEBER, 1990).

Muitas hipóteses têm sido formuladas acerca da função dos microssatélites. Uma delas é que eles podem ter uma função de manutenção da estrutura dos cromossomos, principalmente pela capacidade que algumas sequências tipo $(CA)_n$ têm de assumir uma conformação de Z-DNA (NORDHEIM & RICH, 1983), e, ainda que não se tenha elucidado completamente a função desse DNA, acredita-se que poderia facilitar o

empacotamento durante a condensação cromossômica na meiose (GROSS & GARRAD, 1986). Eles têm sido associados com regulação gênica, tanto com um incremento na velocidade da transcrição de um gene (HAMADA *et al.*, 1984) quanto com a redução na mesma (NAYLOR & CLARK, 1990). Também têm sido relacionados com pontos de alta frequência de recombinação (*hot spots*) (SLIGHTTON *et al.*, 1980; MURPHY & STRINGER, 1986). Todavia, embora seja possível que os microssatélites não tenham uma função em comum, certamente têm um mecanismo comum de evolução (TAUTZ, 1989).

DI RIENZO *et al.* (1994), no entanto, sugeriram que nem todos os microssatélites evoluem de uma mesma forma: à medida que aumenta o número de repetição, aumenta a frequência das mutações de múltiplas etapas. Os *loci* de maior longitude são mais polimórficos, o que sugeriria uma taxa mais alta de mutação (WEBER, 1990; HUDSON *et al.*, 1992), mas outros autores encontraram dados contraditórios (VALDES *et al.*, 1993). Em qualquer caso, está claro que a evolução dos microssatélites é um processo mutacional muito complexo, no qual estão implicados ao menos dois mecanismos diferentes. A dominância de cada um deles depende da estrutura da unidade repetitiva. Parece que as repetições de 3 a 5 pb evoluem segundo o Modelo de Mutação Escalonada ou Passo-a-passo (SMM – *Stepwise Mutation Model*), enquanto é mais provável que as de 1 a 2 pb o façam conforme o Modelo de Duas Fases (TPM – *Two Phase Model*), e a dominância das mutações SMM diminui à medida que aumenta a complexidade do núcleo repetitivo (ESTOUP *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Foi sugerido que os microssatélites que têm uma evolução segundo o Modelo de Alelo infinito (IAM – *Infinite Allele Model*), ou seja, os microssatélites compostos, seriam os mais apropriados para estudos de população, tais como subestrutura de população e relações genéticas (ESTOUP *et al.*, 1995), porque contêm os níveis mais baixos de homoplasia.

As taxas de mutação dos microssatélites são consideradas altas, e dois processos têm sido sugeridos para explicá-las. O primeiro está baseado na recombinação entre as moléculas de DNA que estaria alterando o tamanho dos microssatélites por *crossing-over* desigual ou conversão gênica. O segundo baseia-se no mecanismo de deslize (*slippage*), que envolve a dissociação momentânea das fitas

de DNA durante a replicação e um erro no realinhamento devido às repetições presentes na fita a ser replicada *in vivo* ou *in vitro* com o deslize da Taq DNA polimerase na PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

O elevado polimorfismo que estes marcadores apresentam e a possibilidade de poder detectar ambos os alelos (ARAÚJO, 2004) os tornam extremamente úteis à identificação individual, uma vez que é muito pouco provável que indivíduos eleitos ao acaso e analisados com alto número de microssatélite compartilhem todos os alelos (MARTÍNEZ, 2001; MÉNDEZ, 2002).

No estudo de genética de população, os microssatélites permitem a identificação de cada alelo por *locus*, a obtenção de dado populacional e o cálculo das frequências alélicas, a partir das quais se podem estimar as distâncias genéticas entre as populações e até mesmo entre os indivíduos (BOWCOCK *et al.*, 1994; REVIDATTI, 2009) assim como realizar análises filogenéticas (OLIVEIRA, 2007; MARTÍNEZ *et al.*, 2007; VALIENTE, 2007; QI *et al.*, 2009). Pelas razões apresentadas, os microssatélites vêm sendo utilizados nos diversos estudos genéticos, principalmente nos de diversidade de raça ameaçada com vistas à sua conservação (BAUMUNG *et al.*, 2004; FRANKHAM *et al.*, 2008; SOLLERO *et al.*, 2009), nos de construção de mapa genético (MARENCO, 2009), nos de detecção de QTL (PIRES *et al.*, 2008) como também nos estudos de análise de paternidade (JAKABOVÁ *et al.*, 2002; PANZARDI, 2006).

Sua utilização em estudo de relação entre as populações, relações filogeográficas (FERNÁNDEZ-STOLZ, 2007; TRINCA, 2007) e estrutura populacional (MATSUMOTO & HILISDORF, 2009; SOLLERO *et al.*, 2009) tem aumentado consideravelmente. Microssatélites podem ser utilizados ainda para medir sucessos reprodutivos (BROCKMANN *et al.*, 1994; CRAIGHEAD *et al.*, 1995); para testar os efeitos do sistema de acasalamento e da deriva genética sobre a estrutura das populações (VIARD *et al.*, 1996); e para entender mecanismos de comportamento sexual (LIFJELD *et al.*, 1997; SAINO *et al.*, 1997).

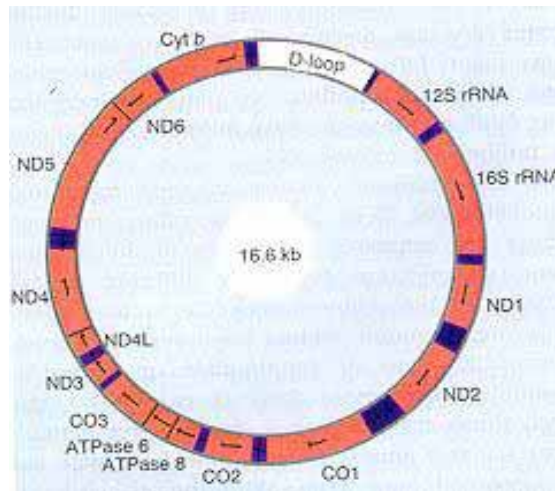
Conforme MIRANDA (2005), os microssatélites também podem ser utilizados para o estudo do processo de identificação de hibridização em javalis, e os iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domesticus* podem ser usados em *Sus scrofa scrofa* em

análise populacional e na identificação de marcadores moleculares úteis ao melhoramento genético.

Como a estruturação genética reflete o número de alelo trocado entre população, esse fato tem grandes consequências na composição genética dos próprios indivíduos. O conhecimento da estruturação da população pode resultar em importantes encaminhamentos para estratégias de conservação e manejo (ROSSITER *et al.*, 2000). Segundo KUMAR (2000), os marcadores de microssatélite são bem documentados em algumas espécies (bovinos, suínos, ovinos, equinos, aves e peixes), podendo ser usados para a caracterização de rebanho, além de estabelecer as relações filogenéticas entre diversas raças, a exemplo do trabalho de SOLLERO *et al.* (2009), que trabalharam com diversos grupos genéticos nativos de suíno do Brasil, encontrando resultados que permitem a proposição de estratégias de manejo e conservação.

1.4.5.2 DNA Mitocondrial

A mitocôndria é uma organela subcelular responsável pelo processo de respiração celular, possuindo tamanho que varia de 0,5 a 1,0 μm de diâmetro e 5,0 a 10 μm de comprimento. É considerada autêntica fábrica de produção de energia, necessária para o bom funcionamento da célula, e é provida de um genoma extracromossômico, separado e distinto do genoma nuclear, que é o DNA mitocondrial (Figura 3) (DE ROBERTIS *et al.*, 2003).



Fonte: ALVES *et al.* (2003a)

Figura 3. Estrutura do DNA mitocondrial suíno (16.679 pb). As sequências correspondentes à região-controle (*D-loop*) e ao gene do citocromo b foram analisadas neste trabalho

O citocromo b (CYT-B) e a região-controle do DNA mitocondrial, por serem *loci* altamente variáveis, são ideais para estudar a variabilidade genética em nível inter e intraespecífico. A região-controle apresenta níveis extraordinários de variação intraespecífica, permitindo determinar padrões geográficos de diversidade e evolução das populações, expansões demográficas, fluxo gênico, hibridação e dispersão (BRUFORD *et al.*, 2003). A variabilidade genética do DNA mitocondrial tem sido estudada em numerosos animais domésticos, revelando padrões de domesticação mais ou menos complexos (GIUFFRA *et al.*, 2000; LUIKART *et al.*, 2001).

Estudos realizados com base no CYT-B e na região-controle do DNA mitocondrial confirmam a existência de três grandes grupos de porco selvagem e doméstico: um grupo asiático (A), constituído por inúmeras raças domésticas e javalis asiáticos, e dois grupos europeus, EI e EII (GIUFFRA *et al.*, 2000; KIJJAS & ANDERSSON, 2001). O grupo EI engloba as raças domésticas e os javalis europeus, com exceção dos italianos, que formam o segundo grupo europeu, EII. Esses resultados apontam para um cenário de domesticação independente no Oriente Próximo e na Ásia. Com base ainda nesse marcador, ALVES *et al.* (2003b) realizaram um estudo sobre a variabilidade genética e as relações filogenéticas entre diversas

variedades de porco ibérico e javalis provenientes da Espanha. Ao que tudo indica, as raças domésticas e os javalis espanhóis fazem parte do principal grupo europeu, EI.

Os grupos genéticos de suíno do Brasil foram inicialmente estudados por GROSSI *et al.* (2006), cujos resultados mostraram a presença de haplótipo europeu em porco-monteiro, mas foi observado, em outros grupos estudados, presença de haplótipo asiático. SOUZA *et al.* (2009) caracterizaram, por meio do CYT-B, diversos grupos genéticos nativos do Brasil e concluíram que a ancestralidade deles é ibérica, embora também tenha encontrado haplótipo asiático em vários animais estudados. Poucos são os trabalhos que tratam de análise mitocondrial de suíno da América do Sul.

Além daqueles trabalhos (GROSSI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009), encontra-se o de RAMÍREZ *et al.* (2009), que caracterizou diversos grupos genéticos da América do Sul, concluindo que a ancestralidade deles é ibéricas.

Diversos estudos constataram que as cópias de DNA mitocondrial podem não ser idênticas, permitindo a existência de diversos tipos desse DNA no mesmo indivíduo (heteroplasmia), o que pode dificultar alguns estudos populacionais (COMAS *et al.*, 1995; WILSON *et al.*, 1997). A heteroplasmia pode ser observada de várias maneiras: i) os indivíduos podem ter mais de um tipo de mtDNA num único tecido; ii) os indivíduos podem apresentar um tipo de mtDNA num tecido e um tipo diferente em outro tecido; e/ou iii) os indivíduos podem ser heteroplásmicos numa amostra de tecido e homoplásmicos em outra amostra de tecido (WILSON *et al.*, 1997; BENDALL *et al.*, 1997). No caso de heteroplasmia, os cromatogramas poderão demonstrar a presença de mais de um nucleótido nas posições de diferença entre as amostras questionadas e conhecidas. Existem teorias que indicam que a heteroplasmia mitocondrial talvez se deva às mutações somáticas de um indivíduo, à heteroplasmia dos oócitos ou à transmissão acidental de mitocôndria paterna durante a fertilização (KVIST *et al.*, 2003).

Os ovócitos, no entanto, contêm de 10^5 a 10^8 moléculas de mtDNA aproximadamente, enquanto os espermatozóides, somente 10 a 100 no máximo, sendo, então, por razões de probabilidade, quase impossível ou tão mínima a quantidade de mtDNA herdada por via paterna que se atribui que a herança se herda maternamente (GROSSMAN & SHOUBRIDGE, 1996).

Uma característica vantajosa do DNA mitocondrial, portanto, consiste na sua transmissão quase exclusivamente materna. Excetuando-se possíveis mutações, as sequências de DNA mitocondrial são semelhantes para todos os indivíduos relacionados maternalmente (CASE & WALLACE, 1981; HUTCHINSON *et al.*, 1974), o que permite a definição de linhagem, sublinhando os ancestrais maternos de uma população, sem a confusa intervenção de dado biparental ou recombinação (AVISE, 1991; CARRACEDO *et al.*, 2000; PAKENDORF & STONEKING, 2005). Assim, cada tipo de DNA mitocondrial é definido como uma sequência e é tratado como um *locus* ou haplótipo (CARRACEDO *et al.*, 2000).

Apesar das funções vitais desempenhadas por esse tipo de genoma, que podem pressupor uma taxa evolutiva relativamente lenta, o DNA mitocondrial apresenta elevada taxa de mutação (cerca de 5-10 vezes superior ao material nuclear). As alterações nas sequências de DNA mitocondrial podem ter origem em diversos fenômenos, como adição, deleção e substituição. No entanto as substituições nucleotídicas são consideradas a maior causa de divergência entre as sequências em estudos filogenéticos, tendo alguns apresentado taxas de substituição nucleotídica silenciosa de ordem de $4,7 \times 10^{-8}$ sítio/ano nesse genoma, apesar de esse valor ser ainda controverso (AVISE, 1991; HOELZEL *et al.*, 1991; PAKENDORF & STONEKING, 2005).

Um relaxamento nas obrigações funcionais ou a falta ou, ainda, ineficácia de um sistema de reparação que possa corrigir as mutações características do DNA mitocondrial pode também explicar a rápida evolução desse DNA (AVISE, 1991). A existência de um sistema de reparação deveria resultar numa divergência uniforme em todas as posições nucleotídicas do DNA mitocondrial, mas diversos estudos fazem referência a zonas hipervariáveis – zonas com maior concentração de alterações genéticas que a média –, sendo sugerido algum tipo de seleção como explicação para esse fenômeno (AVISE, 1991; STONEKING, 2000).

As ferramentas fornecidas pela ciência hoje em dia permitiram a otimização de técnicas na utilização de DNA mitocondrial para a análise forense, mais especificamente para a identificação de indivíduo ou definição de relação de parentesco

por meio da linhagem materna. Este é o DNA utilizado em situações com amostras em estado avançado de degradação, em que existe pouca quantidade de DNA nuclear (ALLEN *et al.*, 1998; WILSON, 1995), como é o caso das amostras provenientes de fatalidade em massa ou crime (acidentes, catástrofes naturais, situações de guerra, violações, assassinatos), em que se é necessário identificar cadáveres humanos ou um suspeito (COBLE *et al.*, 2004). Esse genoma é supostamente resistente à degradação possivelmente por causa da sua estrutura circular fechada e da sua localização, que é dentro da célula (KIMBER, 2000).

Outra vantagem do DNA mitocondrial é a sua aplicação nas situações em que só existem parentes de linhagem materna como amostra de referência (COBLE *et al.*, 2004). Todavia esse DNA apresenta uma desvantagem, que reside no seu baixo poder de discriminação (KIMBER, 2000). Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de maximizar esse poder, tanto pelo desenvolvimento de técnica que aperfeiçoe os resultados obtidos por DNA mitocondrial nas aplicações forenses quanto pelo desenvolvimento de prática laboratorial que minimize a possível interferência de contaminações e erros na análise das amostras (PARSONS & COBLE, 2001; COBLE *et al.*, 2004; JUST *et al.*, 2004).

O melhor exemplo de reconstrução da evolução a partir do DNA mitocondrial foi apresentado por CANN *et al.* (1987). Eles estudaram o DNA mitocondrial de 147 humanos de várias origens geográficas e elaboraram uma árvore filogenética que apontava apenas um ancestral comum: o DNA mitocondrial de uma mulher que viveu na África há cerca de 200 mil anos, que ficou conhecida como “Eva Mitocondrial”.

1.4.6 Citogenética

A citogenética é a área da biologia que se dedica ao estudo do número, da morfologia, da estrutura, da propriedade e da dinâmica dos cromossomos durante a divisão celular somática (mitose) assim como das células germinativas (meiose). Para tais finalidades, a citogenética dispõe de uma série de procedimento que visa à preparação cromossômica de boa qualidade, de modo a permitir conclusões a respeito

da influência dos cromossomos sobre o fenótipo e dos fatores que provocam as alterações cromossômicas numéricas e estruturais (HARE & SINGH, 1984).

A partir das informações obtidas com essa técnica, é possível conhecer os diferentes organismos sob o ponto de vista citogenético, auxiliar na classificação sistemática dos mesmos, realizar comparações entre as espécies e fazer inferências evolutivas (GUERRA, 1988). A citogenética veterinária é aplicada como instrumento diagnóstico e prognóstico em problemas clínicos que afetam os animais domésticos e para compreensão das patologias, visando ao aumento da *performance* reprodutiva, à capacitação genética e à manutenção da saúde (HALNAN, 1989).

Segundo a revisão realizada por MCFEELY (1993), o estudo cromossômico iniciou-se em 1857, quando Virchow observou, pela primeira vez, a divisão celular. Desse período até a primeira metade do século XX, citogeneticistas realizaram trabalhos com plantas, invertebrados e vertebrados inferiores e foram acumulando conhecimentos sobre a morfologia e o comportamento cromossômico.

O interesse pela citogenética dos mamíferos aumentou com a descoberta do dimorfismo sexual por BARR & BERTRAM (1949), quando analisavam cortes histológicos de tecido nervoso de gato, acompanhada pelo aprimoramento da técnica, em que alguns eventos foram cruciais nesse processo, como o uso da solução hipotônica (HSU, 1952) – melhorando a visualização e diminuindo a sobreposição dos cromossomos –, a utilização da colchicina – que tornou os cromossomos mais facilmente distinguíveis ao interromper a divisão celular em metáfase (FORD & HAMERTON, 1956) – e o desenvolvimento da técnica de cultura de sangue a curto prazo com agente mitótico (MOORHEAD *et al.*, 1960). A partir de então, novas descobertas foram realizadas, como a detecção da primeira alteração cromossômica numérica por TIJO & LEVAN (1956), posteriormente associada à síndrome de Down.

A 1ª Conferência Internacional para padronização dos cariótipos de animal doméstico foi realizada em 1976, com o objetivo de facilitar as comparações entre as pesquisas citogenéticas desenvolvidas em vários países. A comissão reencontrou-se em 1989 e estabeleceu um Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética para os Animais Domésticos (ISCNDA), o qual está em vigor até o momento (DIBERARDINO

et al., 1990). A padronização do cariótipo suíno (*Sus scrofa domesticus*) foi estabelecida por GUSTAVSSON (1988), e o número diploide da subespécie foi determinado como $2n = 38$.

Outros suídeos também tiveram sua ploidia estabelecida desde então: $2n = 34$ para *Phacochoerus aethiopicus*, resultado da fusão cêntrica entre os cromossomos equivalentes ao 15;17 e ao 13;16 do suíno doméstico (BOSMA, 1978); $2n = 32$ para *Hylochoerus meinertzhageni*, cujo cariótipo não possui nenhum cromossomo acrocêntrico; $2n = 34$ para *Potamochoerus porcus*, que apresenta uma peculiaridade quanto ao mecanismo de determinação do sexo (MELANDER & HANSEN-MELANDER, 1980); $2n = 38$ para as espécies *Sus verrucosus* e *Sus celebensis*, semelhante ao cariótipo de suíno, exceto pelo padrão de bandamento C, G e pela orceína observada nos cromossomos 10 e Y; $2n = 38$ para *Sus scrofa vittatus*, com padrão de bandamento G idêntico ao suíno doméstico (BOSMA *et al.*, 1991); e $2n = 38$ para *Babirusa babirusa*, decorrente de vários rearranjos detectados por bandamento R e FISH (hibridação *in situ* com fluorescência), quando em comparação com o cariótipo padrão do suíno (THOMSEN *et al.*, 1996).

A citogenética vem sendo utilizada para identificar o número diploide dos porcos selvagens europeus (*Sus scrofa scrofa*) desde a década de 1960 (MCFEE *et al.*, 1966), sendo aplicada rotineiramente no Brasil para identificar os animais puros da subespécie ($2n = 36$), com o intuito de formar ou garantir um plantel de javali puro, que preserve suas características produtivas naturais. No entanto o cariótipo $2n = 36$ é um critério de pureza genética para javali somente quando se consideram a população e muitas gerações, bem quando todos os indivíduos cariotipados apresentarem 36 cromossomos ou forem de origem conhecida e controlada. Isso porque um exemplar cruzado ($2n = 37$), quando retrocruzado com javali puro ($2n = 36$) ou com suíno puro ($2n = 38$), pode gerar indivíduos tanto com ploidia $2n = 36$, característica do javali puro, quanto com $2n = 38$, própria do suíno (GIMENEZ *et al.*, 2003; MIRANDA & LUI, 2003), o que impossibilita afirmar se o indivíduo oriundo desse cruzamento com ploidia $2n = 36$ é cruzado ou puro quando o seu fenótipo se aproximar muito do fenótipo do javali – esta é uma das limitações da citogenética para verificar a procedência dos indivíduos pelo cariótipo.

As primeiras alterações cromossômicas estruturais em animais domésticos foram descritas por GUSTAVSSON & ROCKBORN (1964) e por HENRICSON & BACKSTROM (1964), revelando, respectivamente, a translocação Robertsoniana 1;29 em bovino e a translocação recíproca 11;15 em suíno. A detecção dos rearranjos cromossômicos avançou lentamente devido à dificuldade de identificação dos cromossomos por técnicas convencionais. Então, em 1971, as técnicas de bandamento foram sendo progressivamente adaptadas às espécies domésticas (POPESCU, 1989).

No início da citogenética, com as técnicas de coloração homogênea, um cromossomo só podia ser distinguido pelo seu tamanho e pela posição do centrômero. Durante os últimos anos da década de 1960, foram desenvolvidas técnicas de coloração especiais (bandamento cromossômico), que permitiram não só a identificação precisa de todos os pares cromossômicos como também a detecção da maioria das alterações estruturais (SILVA *et al.*, 1991). Quando um número limitado de rearranjo ocorre em um cariótipo, o padrão de análise por bandamento é muito informativo para determinadas homologias (PATAK & STOCK, 1974). Entre as técnicas mais usadas, estão as bandas G e C e a de coloração Ag-RON.

O procedimento para bandamento G (SEABRIGHT, 1971) permite a visualização de bandas escuras e claras, as quais são segmentos cromossômicos que se condensam, respectivamente, mais cedo e mais tarde na prófase (GUERRA, 1988). Tal padrão de banda permite a detecção apurada de rearranjos e facilita a comparação entre cariótipo.

Esse bandamento é hoje o principal método utilizado na rotina da citogenética clínica, pois permite não só uma melhor caracterização de cada cromossomo como também detecção e identificação de anormalidades estruturais (GARDNER & SUTHERLAND, 1989). Isso permite também a comparação cariotípica entre espécie, as considerações sobre especiação etc. (GIANNONI *et al.*, 1989).

O bandamento G ou Giemsa foi desenvolvido inicialmente por SUMNER *et al.* (1971), através do método ácido/salina/Giemsa (GAG – G - bands by acetic saline using Giemsa), e, paralelamente, por SEABRIGHT (1971), através do método baseado na digestão enzimática parcial (GTG – G - bands by trypsin using Giemsa). O princípio de ambos os métodos está na exposição do material a condições denaturantes, seja à

solução salina aquecida (65°C) seja à tripsinização com ou sem a presença de uréia, seguida da coloração com corante Giemsa, Leishman's, Wright's ou similares (ARRIGHI & HSU, 1974).

BOSMA (1976) sugeriu, com base na técnica de bandamento G, que o cariótipo do javali puro fosse composto por 34 cromossomos autossômicos distribuídos em 6 pares submetacêntricos, 2 pares subacrocêntricos, 5 pares metacêntricos e 4 pares acrocêntricos, mais 2 cromossomos sexuais metacêntricos, sendo o Y o menor de todos, dispostos similarmente ao cariótipo do suíno doméstico. Porém GIANNONI *et al.* (1980), com base em dados morfométricos, encontraram um cariótipo composto por 5 pares submetacêntricos, 8 pares metacêntricos e 4 pares telocêntricos, além do par sexual metacêntrico. O número fundamental (NF = 64), o comprimento do DNA do lote diploide igual a 83,8 μ , a área de material genético da ordem de 150,8 μ^2 e o valor médio de redução entre um par cromossômico e outro de aproximadamente 0,16 μ foram também determinados nesse trabalho. Já MIRANDA & LUI (2003) distribuíram os cromossomos autossômicos no cariótipo de modo que ficaram estabelecidos 5 pares submetacêntricos, 2 subteloacrocêntricos, 6 metacêntricos e 4 pares telocêntricos.

Com a técnica de bandamento C (SUMNER, 1972), é possível visualizar as regiões de heterocromatina constitutiva, que estão geralmente localizadas nas regiões centroméricas dos cromossomos. Essa heterocromatina é altamente condensada, repetitiva e rica em A-T ou C-G (FERNANDEZ *et al.*, 2002). A coloração Ag-RON ou NOR, suscitada pela impregnação de prata (HOWELL & BLACK, 1980), localiza os sítios cromossômicos de DNA ribossômico 45S que estão em atividade transcricional (WANG *et al.*, 2003) e pode ser uma importante ferramenta em estudos evolutivos e citotaxonômicos (GALETTI *et al.*, 1995).

O bandamento cromossômico é um método efetivo, entretanto há situações em que muitos dos processos genéticos que contribuíram para a diferenciação das espécies ocorreram no nível gênico ou na forma de rearranjos cromossômicos complexos, só podendo ser evidenciados cromossomicamente pela citogenética molecular.

Assim, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) é uma técnica recentemente utilizada para um delineamento mais refinado do DNA cromossômico e consiste

basicamente no pareamento de determinado segmento de DNA ou RNA marcado com uma molécula de fácil identificação, chamada sonda, e com uma sequência complementar de nucleotídeos situada no cromossomo, chamada sequência-alvo. O objetivo da técnica é verificar se algum cromossomo na célula possui essa sequência e qual a sua exata localização (GUERRA, 2004).

A pintura cromossômica, também chamada de pintura cromossômica comparativa ou ZOO-FISH, é uma variação da técnica de FISH e tem sido uma importante ferramenta para detectar homologias cromossômicas, gerar informações sobre o processo de evolução cariotípica como também para a citotaxonomia (MATSUBARA *et al.*, 2004). Nessa técnica, segmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros de uma espécie podem ser usados como sondas hibridizadas em outra espécie, e as variações detectadas entre os cariótipos por microscopia de fluorescência. As sondas cromossomo-específicas podem ser obtidas pelas técnicas de separação por fluxo (*flow sorting*), que é uma variação da citometria de fluxo, ou por microdissecção cromossômica usando-se um aparelho de micromanipulação (GUERRA, 2004). Após a aplicação de qualquer uma das técnicas de obtenção da sonda cromossômica, o DNA é amplificado por PCR e marcado para ser utilizado em experimentos de FISH. As primeiras sondas cromossomo-específicas foram produzidas a partir de cromossomos humanos e foram hibridizadas em outras espécies de mamífero, causando uma revolução na citogenética comparativa (ALKALAEVA *et al.*, 2002).

Entretanto não se deve tirar o mérito nem a importância da citogenética clássica devido à evolução das técnicas moleculares. Uma análise feita somente por bandamento G pode levar a erros de interpretação, pois nem sempre é possível saber se uma banda (em uma espécie A) é equivalente em tamanho ou composição de DNA à outra (na espécie B). Porém apenas o uso da pintura cromossômica também não fornece informações sobre os rearranjos intracromossômicos, como as inversões. Assim, há uma forte complementação de informações entre os bandamentos clássicos e a pintura cromossômica (PIECZARKA & NAGAMACHI, 2004).

1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em síntese, procurou-se, até aqui, apresentar a perspectiva teórica conceitual que motivou e que orienta este trabalho. A elaboração deste capítulo envolveu a leitura, análise e interpretação de vários livros, periódicos, manuscritos e de outros documentos. Todo o material recolhido foi submetido a uma triagem, a partir da qual foi possível estabelecer um plano de leitura, tentando-se conhecer as diferentes contribuições científicas disponíveis sobre os diversos temas. Após a análise dos materiais localizados, percebeu-se que, em relação aos grupos genéticos nativos de suíno, a literatura encontrada é, de modo geral, bastante antiga, oriunda de um tempo em que existiam muitas criações desses animais; as obras mais recentes demonstram o quanto são necessárias medidas para a sua conservação.

Os suínos do tipo banha enfrentam, desde o surgimento dos óleos vegetais, dificuldades para se manterem, mas, como visto, este não foi a única causa da diminuição drástica da diversidade suína, embora seja muito comum ver, na literatura, essa perda associada aos óleos vegetais. Como se registrou neste capítulo, o surgimento de novos conceitos, aliado à necessidade de aumento de produção, fez com que apenas algumas raças fossem, a partir de então, utilizadas. Mas há uma tendência natural a que a ordem de importância dos conceitos se reverta, visto que o de sustentabilidade hoje aparece à frente de todos os outros.

Uma observação a ser feita é que o problema não se resume apenas à perda das raças, o que por si só é gravíssimo. Na realidade, junto com as raças, perdeu-se, ao longo do tempo, conhecimento sobre o uso, manejo e adaptação ecológica das mesmas aos ecossistemas originais – perdeu-se todo um conhecimento que havia passado de geração em geração, mas que agora torna-se necessário resgatar.

Conservar a biodiversidade animal local é estratégico para manter a autonomia dos agricultores no abastecimento de proteína bem como para que eles tenham opções de variedade adaptada ao manejo agroecológico. Além disso, é fundamental que os agricultores mantenham uma diversidade de opção, que atenda aos diferentes usos da agricultura familiar.

As ferramentas fornecidas pela biologia molecular hoje em dia permitem a otimização dos marcadores moleculares para a utilização do DNA em diversos tipos de estudo, como de evolução, de diversidade genética inter e intraespecífica, de identidade, de origem genética, de identificação de novas variantes e em estudos forenses, gerando informações importantes para subsidiar diferentes ações de pesquisa desde a coleta de amostra até a utilização dos recursos genéticos em programas de melhoramento.

A escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado em determinado estudo depende, entre tantos fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada. A caracterização genética dos cascos-de-burro permitirá obter conhecimento genético sobre os mesmos e, conseqüentemente, auxiliar programas para a sua conservação. Portanto o uso de marcador nuclear do tipo microssatélite e de marcador uniparental do tipo mitocondrial possibilitarão propor estratégias de conservação, além de fornecer uma ferramenta útil para a caracterização de evidências biológicas e históricas.

A citogenética é mais uma ferramenta que a genética dispõe e que será utilizada neste trabalho para se obter a caracterização citogenética dos cascos-de-burro. Por meio das análises convencionais de coloração e das técnicas de bandamento C, NOR e G, pode-se determinar a morfologia dos homólogos e o número de cromossomo, que indicará possivelmente se os cascos-de-burro estão ou não misturados aos javalis.

1.6 REFERÊNCIAS⁵

ABREU, U. G. P.; MARIANTE, A. S.; SANTOS, S. A. Conservação genética de raças naturalizadas do Pantanal. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 1, n. 5, p. 18-21, 1998.

ALBURQUERQUE, M. S. M. *et al.* **Projeto**: identificação e caracterização de grupamentos de suínos nacionais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1990.

ALKALAEVA, E. Z. *et al.* Comparative chromosome painting. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 38, n. 8, p. 1034-1042, 2002.

ALLEN, M. *et al.* Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. **Journal of Forensic Science**, Hoboken, v. 43, n. 3, p. 453-464, 1998.

ALONSO, V. *et al.* Efeito do gene receptor de prolactina sobre características quantitativas de interesse econômico em suínos. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n.5, p. 366-372, 2003.

ALVES, E. *et al.* El origen del cerdo ibérico a la luz del análisis del ADN mitocondrial. **Solo Cerdo Ibérico**, Zafra, n. 10, p. 27-33, 2003a.

ALVES, E. *et al.* Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 319-324, 2003b.

⁵Baseada na NBR – 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

- ARAÚJO, A. M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no Brasil por meio de microssatélites de DNA**. 2004. 56 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- ARIAS, D. El cerdo sindha colombiano. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE RAZAS AUTOCTONAS Y CRIOLLAS, 5., 2000, Havana: **Anais...**Havana: CYTED, 2000. 270 p.
- ARRIGHI, F. E.; HSU, T. C. Staining constitutive heterochromatin and Giemsa crossbands of mammalian chromosomes. In: YUNIS, J. J. **Human chromosome methodology**. 2^a ed. New York: Academic Press, 1974. p. 59-71.
- ASSMANN, J. M. *et al.* Produção de matéria seca de forragem e acúmulo de nutrientes em pastagem anual de inverno tratada com esterco líquido de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 8, p. 2408-2416, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DE CARNE SUÍNA. ABIPECS. **Relatório Anual**. São Paulo: ABIPECS, 2008. 22 p. (Série Texto Técnico, TT/PCC/01). Disponível em: <<http://www.abipecs.org.br/pt/relatorios.html>>. Acesso em: 14 dez. 2009.
- AVISE, J. C. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 25, p. 45-69, 1991.
- BARR, M. L.; BERTRAM, E. G. A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. **Nature**, London, v. 163, n. 4148, p. 676-677, 1949.
- BARROS, P. *et al.* Evolution of a complex minisatellite DNA sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Maryland Heights, v. 49, n. 2, p. 488-494, 2008.
- BAUMUNG, R.; SIMIANER, H.; HOFFMANN, I. Genetic diversity studies in farm animals – a survey. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 361-373, 2004.
- BECKMANN, J. S. Oligonucleotide polymorphisms: a new tool for genomic genetic. **Nature Biotechnology**, London, v. 6, p. 1061-1064, 1988.

BENDALL, K. E.; MACAULAY, V. A.; SYKES, B. C. Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individuals' hair roots. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 61, n. 6, p. 1303-1308, 1997.

BENEVIDES FILHO, I. M. **Análise genética do desempenho de suínos da raça piau do nascimento à desmama**. 1982. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

BISHOP, S. C.; CHESNAIS, J.; STEAR, M. J. Breeding for disease resistance: issues and opportunities. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7., 2002, Montpellier. **Proceedings...** Montpellier: WCGALP, 2002. p. 19-23.

BLACKBURN, H.; LEBBIE, S. H. B.; VAN DE ZIJP, A. J. Animal genetic resources and sustainable development in animal genetic resources and sustainable development. In: WORLD CONGRESS ON GENETIC APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6., 1998, Armidale. **Proceedings...** Armidale: WCGALP, 1998. p. 3-10.

BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BOWCOCK, A. M. *et al.* High resolution of human evolution with polymorphic microsatellites. **Nature**, London, v. 368, p. 455-457, 1994.

BOSMA, A. A. The Chromosomal G-Banding Pattern in the Warthog, *Phacochoerus aethiopicus* (Suidae, Mammalia) and its Implications for the Systematic Position of the Species. **Genetica**, Dordrecht, v. 49, n. 1, p. 15-19, 1978.

BOSMA, A. A. Chromosomal Polymorphism and G-Banding Patterns in the Wild Boar (*Sus scrofa* L.) from the Netherlands. **Genetica**, Dordrecht, v. 46, n. 4 p. 391-399, 1976.

BOSMA, A. A. *et al.* Comparative Cytogenetic Studies in *Sus verrucosus*, *Sus celebensis* and *Sus scrofa vittatus* (Suidae, Mammalia). **Genetica**, Dordrecht, v. 83, n. 3, p. 189-194, 1991.

BROCKMANN, H. J.; COLSON, T.; POTTS, W. Sperm competition in horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Heidelberg, v. 35, n. 3, p.153-160, 1994.

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 4, n. 11, p. 900-910, 2003.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, London, v. 325, n. 1, p. 31-36, 1987.

CAPUTO, D. Z. **Variabilidade genética entre suínos, javalis e seus híbridos**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

CARRACEDO, A. *et al.* DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 79-85, 2000.

CARVALHO, H. Contribuição ao reconhecimento da raça suína “Simental”. **O solo**, n. único, p. 87-92, 1959.

CASE, J. T.; WALLACE, D. C. Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, New York, v. 7, n. 1, p. 103-108, 1981.

CASTRO, S. T. R. **Produção orgânica de suínos poderá usar raças naturalizadas em risco de extinção**. Disponível em: <http://www.homeopatiaveterinaria.com.br/producao_organica_de_suinos.htm>. Acesso em: 20 mai. 2009.

CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; GERMANO, J. L. Census of Brazilian naturalized swine breeds. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, n. 193, p. 235-239, 2002.

CAVALCANTE NETO, A. *et al.* Censo e caracterização fenotípica de rebanhos de suínos nativos existentes no Estado da Paraíba. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 1.; CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO

MERCOSUL, 3.; CONGRESSO DA ALVEC, 9., 2002, Foz do Iguaçu. **Anais...**Foz do Iguaçu: Pork World, 2002. p. 1-3.

CAVALCANTE NETO, A. *et al.* Censo e caracterização fenotípica de suínos de grupos genéticos naturalizados brasileiros existentes no Estado da Paraíba. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 123-126, 2007.

CAVALCANTI, S. S. **Produção de suínos**. Campinas, SP: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 453 p.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; MENOZZI, P.; PIAZZA, A. **The history and geography of human genes**. Princeton: Princeton University Press, 1994. 428 p.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative biochemistry and physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, Filadélfia, v. 126, n. 4, p. 455-76, 2000.

CHENG, H. H.; CRITTENDEN, L. B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. **Poultry Science**, Savoy, v. 73, n. 4, p. 539-546, 1994.

COBLE, M. D. *et al.* Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 118, n. 3, p. 137-46, 2004.

COMAS, D.; PAABO, S.; BERTRANPETIT, J. Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. **Genome Research**, New York, v. 5, n. 1, p. 89-90, 1995.

COSTA, O. A. D. *et al.* **Sistema alternativo de criação de suínos em cama sobreposta para agricultura familiar**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2006. 7 p. (Comunicado Técnico, 419).

CRAIGHEAD, L. *et al.* Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic Grizzly Bears. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 255-261, 1995.

CULAU, P. O. V. *et al.* A contribuição do gene halotano sobre as características de qualidade da carne suína. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 115-119, 2002.

DAROLT, M. R. **Produção de suíno ao ar livre**: alternativa para os produtores orgânicos. 2001. Disponível em: <www.planetaorganico.com.br/trabdsuino.htm>. Acesso em: 20 mai. 2009.

DE ROBERTIS, H. P.; HIB, J.; PONZIO, R. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003. 413 p.

DIBERARDINO, D. *et al.* International System for Cytogenetic Nomenclature of Domestic Animals. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 53, n. 2/3, p. 65-79, 1990.

DI RIENZO, A. *et al.* Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 8, p. 3166-3170, 1994.

DUTRA JÚNIOR, W. M. Perspectiva da exploração de suínos com base nas populações nativas. In: CONGRESSO NORDESTINO DE PRODUÇÃO ANIMAL, 3.; SIMPÓSIO NORDESTINO DE ALIMENTAÇÃO DE RUMINANTES, 9.; SIMPÓSIO PARAIBANO DE ZOOTECNIA, 4., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: SNPA, 2004. p. 1-4.

EGITO, A. A. *et al.* Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, n. 193, p. 39-52, 2002.

ESTOUP, A.; JARNE, P.; CORNUET, J. M. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 9, p. 1591-1604, 2002.

ESTOUP, A. *et al.* Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.). Populations: hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models. **Genetics**, Bethesda, v. 140, n. 2, p. 679-695, 1995.

EVANGELISTA, F. R. **A agricultura familiar no Brasil e no Nordeste**. Fortaleza: Banco do Nordeste-Leitura Recomendada, 2000. 12 p.

FAO. **Enseñanzas de la revolución verde**: hacia una nueva revolución verde. Roma, 1996. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/w2612s/w2612s06.htm>>. Acesso em: 20 mar 2009.

FAO. **The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture - first draft**. Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/a1260e/a1260e00.htm>>. Acesso em: 20 abr. 2009.

FAO. **Fuentes de carne**. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_sources.html>. Acesso em: 20 out. 2009.

FAO. **Global plan of action for animal genetic resources and the Interlaken declaration**. 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/010/a1404e/a1404e00.htm>>. Acesso em: 20 set. 2009.

FÁVERO, J. A. *et al.* A raça de suínos Moura como alternativa para a produção agroecológica de carne. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 1, p. 1-4, 2007.

FERNANDEZ, R. *et al.* New C-band protocol by heat denaturation in the presence of formamide. **Hereditas**, Malden, v.137, n. 2, p. 145-148, 2002.

FERNÁNDEZ-STOLZ, G. **Estudos evolutivos, filogeográficos e de conservação em uma espécie endêmica do ecossistema de dunas costeiras do sul do Brasil, *Ctenomys flamarioni* (Rodentia-Ctenomyidae), através de marcadores moleculares microssatélites e DNA mitocondrial**. 2007. 193 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p.

FERREIRA, R. A.; FIALHO, E. T.; LIMA, J. A. F. **Boletim: criação técnica de suínos**. Lavras, MG: UFLA, 2004. 59 p.

FERREIRA, E. *et al.* Genetic structure of the wild boar population in Portugal: evidence of a recent bottleneck. **Mammalian Biology**, Jena, v. 74, n. 4, p. 274-285, 2009.

FORD, C. E.; HAMERTON, J. L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. **Biotechnic and Histochemistry**, London, v. 31, n. 6, p. 247-251, 1956.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.

GALETTI, P. M. *et al.* Post-zygotic modifications and intra and interindividual nucleoli organizing region variations in fish: report of a case involving *Leporinus friderici*. **Chromosome Research**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 285-290, 1995.

GAO, Y. *et al.* Genetic variation of indigenous chicken breeds in China and a Recessive White breed using AFLP fingerprinting. **South African Journal of Animal Science**, Hatfield, v. 38, n. 3, p. 193-200, 2008.

GARDNER, R. J. M.; SUTHERLAND, G. R. **Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling**. 3^a ed. New York: Oxford University Press, 1989. 577 p.

GIANNONI, M. A. **Estudo cariotípico de alguns representantes da família suidae**. 1973. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1973.

GIANNONI, M. L.; GIANNONI, M. A.; FERRARI, I. Métodos para a formação de padrões de bandas cromossômicas. **Citogenética aplicada às aves: Técnicas**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 52 p.

GIANNONI, M. A.; FERRARI, I.; GIANNONI, M. L. Estudo biométrico do cariótipo da subespécie *Sus scrofa scrofa* (javali europeu). In: DUARTE, F. A. M.; PINHEIRO, L. E. L. **Tópicos Avançados em Reprodução Animal**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1980. p. 27-41.

GIMENEZ, D. L.; LUCCA, E. J. O uso de marcadores moleculares de rapd como potencial informativo para a distinção entre javali *sus scrofa scrofa*, o suíno doméstico *sus scrofa domesticus* e seus híbridos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 4, n. 1, p. 1-3, 2005.

GIMENEZ, D. L. *et al.* Análise cromossômica e molecular do javali europeu *Sus scrofa scrofa* e do suíno doméstico *Sus scrofa domesticus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 146-154, 2003.

GIUFFRÀ, E. *et al.* The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, Bethesda, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GROSS, D. S.; GARRAD, W. T. The ubiquitous potential z-forming sequence of eucaryotes (dT-dG)_n(dA-dC)_n is not detectable in the genomes of eubacteria, archaebacteria or mitochondria. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 6, n. 8, p. 3010-3013, 1986.

GROSSI, S. F. *et al.* Genetic diversity in wild (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 4, p. 564-568, 2006.

GROSSMANN, L. I.; SHOUBRIDGE, E. A. Mitochondrial genetics and human disease. **BioEssays**, West Sussex, v. 18, n. 12, p. 983-991, 1996.

GUERRA, M. S. **FISH**: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176 p.

GUERRA, M. S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 142 p.

GUSTAVSSON, I. Standard Karyotype of the Domestic Pig. **Hereditas**, Malden, v. 109, n. 2, p. 151-157, 1988.

GUSTAVSSON, I.; ROCKBORN, G. Chromosome abnormalities in three cases of lymphatic leukaemia in cattle. **Nature**, London, v. 203, n. 4948, p. 990, 1964.

HALNAN, C. R. E. **Cytogenetics of animals**. Wallingford: CAB International, 1989. 568 p.

HAMADA, H. *et al.* A novel repeat element with z-DNA forming potential is widely found in evolutionary diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 79, n. 21, p. 6465-6469, 1982.

HAMADA, H. *et al.* Enhanced gene expression by the poly(dT-dG)poly(dA-dC) sequence. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 4, n. 12, p. 2622-2630, 1984.

- HARE, W. C. D.; SINGH, E. L. **Citogenética de la reproducción animal**. Zaragoza: Acribia, 1984. 150 p.
- HENRICSON, B.; BACKSTROM, L. Translocation heterozygosity in a boar. **Hereditas**, Malden, v. 52, p. 166-170, 1964.
- HOELZEL, A. R.; HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Evolution of the cetacean Mitochondrial D-Loop region. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 8, n. 4, p. 475-493, 1991.
- HOWELL, W. W.; BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia**, Basel, v. 36, n. 8, p. 1014-1015, 1980.
- HSU, T. C. **Chromosomal variation and evolution in the virilis group of Drosophila**. Texas: University of Texas Publication, 1952. p. 10-72.
- HUDSON, T. J. *et al.* Isolation and chromosomal assignment of 100 highly informative human simple sequence repeat polymorphisms. **Genomics**, San Diego, v. 13, n. 3, p. 622-629, 1992.
- HUNTER, R. L.; MARKERT, C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, Washington, v. 125, n. 3261, p.1294-1295, 1957.
- HUTCHINSON, C. A. *et al.* Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. **Nature**, London, v. 251, n. 1, p. 536-538, 1974.
- IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 102 de 15 jul. 1998. **Diário oficial [da] União**, Brasília, 15 jul. 1998.
- IRGANG, R. Suínos de raças nativas: o interesse da pesquisa. **Suinocultura Industrial**, Porto Feliz, v. 87, p. 13-20, 1986.
- JAKABOVÁ, D. *et al.* Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. **Czech Journal of Animal Science**, Prague, v. 47, n. 12, p. 497-501, 2002.

- JEFFREYS, A. J.; V. WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, London, v. 314, n. 7, p. 67-73, 1985.
- JUST, R. S. *et al.* Toward increased utility of mtDNA in forensic identifications. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 146S, supl., p. S147-S149, 2004.
- KIJAS, J. M.; ANDERSSON, L. A. Phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 52, n. 3, p. 302-308, 2001.
- KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: technologies and biomedical applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, Palo Alto, v. 9, p. 289-320, 2007.
- KIMBER, C. Interpretation of mitochondrial DNA sequencing. **Science and Justice**, Oxford, v. 40, n. 3, p. 217-218, 2000.
- KUMAR, D. DNA markers for the differentiation of farm animal breeds. In: SAHAI, R.; VIJH, R. K. (Ed.) **Domestic animal diversity: conservation and sustainable development**. Karnal: SI Publications, 2000. p. 305-312.
- KVIST, L. *et al.* Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, n. 2, p. 243-247, 2003.
- LARA, M. A. C. **Variabilidade genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento**. 1998. 215 f. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.
- LARA, M. A. C.; CONTEL, E. P. B. A new allele of peptidase-B in cattle. **Brazilian Journal of genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 9-12, 1997.
- LARA, M. A. C.; CONTEL, E. P. B.; SERENO, J. R. B. Caracterización genética de poblaciones cebuínas através de marcadores moleculares. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 54, n. 206, p. 295-303, 2005.
- LARA, M. A. C. *et al.* Estudio preliminar de relaciones genéticas entre razas naturalizadas brasileñas, cebuínas y europeas. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 50, n. 189, p. 165-170, 2001.

- LEAL, A. A. *et al.* Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 9-18, 2010.
- LI, Y. C. *et al.* Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.
- LI, Y. C. *et al.* Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v.11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.
- LIFJELD, J. T.; SLAGSVOLD, T.; ELLEGREN, H. Experimental mate switching in Pied Flycatchers: male copulatory access and fertilization success. **Animal Behaviour**, London, v. 53, n. 6, p. 1225-1232, 1997.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, n. 3, p. 397-401, 1989.
- LONGHI, A.; SANTOS, M. S. **O CETAP e a biodiversidade**. 2003. Disponível em: <cetap.org.br/wp-content/uploads/2008/11/o-cetap-e-a-biodiversidade.pdf>. Acesso em: 20 mar. 2009.
- LOVATTO, P. A. Histórico e raças. In: LOVATTO, P. A.; OLIVEIRA, V. **Suinocultura geral**. Santa Maria: CCR, 1995. p. 1-16.
- LUDKE *et al.* Avaliação de dietas para sistema orgânico de criação de suínos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 1, p. 369-372, 2007.
- LUERCE, T. D. *et al.* An improved method for characterization of the mutation associated to porcine stress syndrome by PCR amplification followed by restriction analysis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 5, p. 1577-1580, 2009.
- LUIKART, G. *et al.* Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 10, p. 5927-5932, 2001.
- MACHADO FILHO, L. C. P. *et al.* Produção agroecológica de suínos – uma alternativa sustentável para a pequena propriedade no Brasil. In: CONFERÊNCIA

INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA, 2., 2001, Concórdia. **Anais...** p.1-18. Disponível em: <<http://www.conferencia.uncnet.br/pork>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

MALLARD, B. A. *et al.* Use of estimated breeding values in a selection index to breed Yorkshire pigs for high and low immune and innate resistance factors. **Animal Biotechnology**, New York, v. 3, n. 2, p. 257-280, 1992.

MARCHI, M. *et al.* Assessing genetic diversity in indigenous Veneto chicken breeds using AFLP markers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 101-105, 2007.

MARENGO, S. **Mapeamento genético de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao “huanglongbing” (greening) dos citros.** 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Instituto Agronômico, Campinas, 2009.

MARIANTE, A. S. *et al.* Pig biodiversity in Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 199, p. 245-248, 2003.

MARIANTE, A. S. *et al.* Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 204-212, 2009.

MARTÍNEZ, A. M. **Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares.** 2001. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2001.

MARTÍNEZ, A. M. *et al.* Estudio de la diversidad genética del cerdo Negro Canário con microsatélites de ADN. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, n. 1, p. 425-428, 2007.

MARTÍNEZ, J. M. *et al.* **Inmunogenética animal.** Cuba: Editora Científico-Técnica, 1985. 245 p.

MARTON-LEFÈFRE, J. Biodiversity is our life. **Science**, Washington, v. 327, n. 5970, p. 1179, 2010.

MATIOLI, S. R. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismo de ácidos nucleicos. *In*: _____. **Biologia molecular e evolução.** Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.

- MATSUBARA, K. *et al.* Karyotypic evolution of Apodemus (Muridae, Rodentia) inferred from comparative FISH analyses. **Chromosome Research**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 383-395, 2004.
- MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF, A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 395-402, 2009.
- MCFEE, A. F.; BANNER, M. W.; RARY, J. M. Variation in chromosome number among European wild pigs. **Cytogenetics**, Basel, v. 5, n. 1/2, p. 75-81, 1966.
- MCFEELY, R. A. Advances in veterinary science and comparative medicine. **Domestic Animal Cytogenetics**. San Diego: Academic Press, 1993. v. 34. 250 p.
- MELANDER, Y.; HANSEN-MELANDER, E. Chromosomes Studies in African Wild Pigs (*Suidae*, *Mammalia*). **Hereditas**, Malden, v. 92, n. 2, p. 283-289, 1980.
- MÉNDEZ, J. A. A. **Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas em risco de exticcion**. 2002. 212 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade de Bacelona, Bacelona, 2002.
- MENEZES, M. P. C. **Caracterização genética de cabras brasileiras utilizando microssatélites**. 2005. 133 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005.
- MILACH, S. C. K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: _____. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p. 17-28.
- MIRANDA L. L. **Caracterização genética de javalis (*Sus scrofa scrofa*) através de marcadores microssatélites – STRs**. 2005. 51 f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- MIRANDA, L. L.; LUI, J. F. Citogenética do javali em criatórios comerciais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1289-1295, 2003.

MIRANDA, L. M. S. **Estudo genético-populacional de Timor-Leste: antropologia e aplicações forenses**. 2008. 263 f. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas) – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

MOORHEAD, P. S. *et al.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral. **Experimental Cell Research**, Maryland Heights, v. 20, p. 613-616, 1960.

MOURÃO, G. M. *et al.* **Levantamentos aéreos de espécies introduzidas no Pantanal: porcos ferais (porco monteiro), gado bovino e búfalos**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 22 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 28).

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURPHY, K. E.; STRINGER, J. R. Recombination independent recombination of poly d(GT)-d(CA) in PBR322. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 14, n. 18, p. 7325-7340, 1986.

NAYLOR, L. H.; CLARK, E. M. d(TG)_nd(AC)_n sequences upstream of the rat prolactin gene form z-DNA and inhibit gene transcription. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 6, p. 1595-1601, 1990.

NORDHEIM, A.; RICH, A. The sequence (dC-dA)_n X (dG-sT)_n forms left-handed z-DNA in negatively supercoiled plasmids. **Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America**, Washington, v. 80, n. 7, p. 1821-1825, 1983.

OLIVEIRA, E. J. *et al.* Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, J. C. V. **Variabilidade genética em caprinos**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia – Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

OSLINGER, A. *et al.* Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 55, p. 45-50, 2006.

- PAIVA, S. R. **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**. 2005. 138 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- PAKENDORF, B.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and human evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 6, p. 165-183, 2005.
- PANZARDI, A. **Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.
- PARSONS, T. J.; COBLE, M. D. Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. **Croatian Medical Journal**, Zagreb, v. 42, n. 3, p. 304-09, 2001.
- PATAK, S.; STOCK, A. D. The X chromosome of mammals: karyological homology as revealed by banding techniques. **Genetics**, Bethesda, v. 78, n. 2, p. 703-714, 1974.
- PIECZARKA, J. C.; NAGAMACHI, N. Y. Pintura cromossômica como instrumento para estudos filogenéticos em primatas. In: GUERRA, M. **FISH**: conceitos e aplicações na citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2004. 176 p.
- PINHEIRO, M. S. M. *et al.* Levantamento do Perfil da Suinocultura no Município de Pontes e Lacerda, MT. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOBER, 2009. p. 1-5.
- PIRES, A. V. *et al.* Mapeamento de locos de características quantitativas associados à composição de carcaça, no cromossomo seis de suíno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 725-732, 2008.
- POPESCU, P. C. Historique. **Cytogénétique dès Mammifères D'Élevage**. Paris: INRA, 1989. 114 p.
- QI, Y. *et al.* Genetic diversity and relationships of 10 chinese goat breeds in the Middle and Western China. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 88-93, 2009.

- RAMÍREZ, O. *et al.* Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, n. 9, p. 2061-2072, 2009.
- RAMOS *et al.* Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. **PLoS one**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e6524, 2009.
- REDAÇÃO SI. O que é suinocultura orgânica? **Suinocultura industrial**, 2003. Disponível em: <http://www.suinoculturaindustrial.com.br/PortalGessulli/WebSite/Noticias/o-que-e-a-suinocultura-organica,5518,20081118090907_P_871.aspx>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- REGE, J. E. O.; GIBSON, J. P. Animal genetic resources and economic development: issues in relation to economic valuation. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 45, p. 319-330, 2003.
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.
- REVIDATTI, M. A. S. **Caracterización de cerdo crioulo do Nordeste argentino**. 2009. 241 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2009.
- RODINEY, M.; PAES, R.; PEREIRA, M. Origen y utilización potencial de Porco Monteiro en el Pantanal. In: BERMEJO, J. V. D. **Biodiversidad porcina iberoamericana: caracterización y uso sustentable**. Córdoba: Universidade de Córdoba, 2004. p. 49-60.
- ROPPIA, L. **Atualização sobre os níveis de colesterol, gordura e calorias da carne suína**. Disponível em: <www.abipecs.org.br/colesterol.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2009.
- ROPPIA, L. O vice-versa da criação de suínos. **Globo Rural**, São Paulo, v. 4, n. 165, p. 46-50, 1999.
- ROSA, G. O. *et al.* Avaliação do Javonteiro – produto resultante do cruzamento do javali com o Porco-Monteiro. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SOCIOECONÔMICOS DO PANTANAL, 3., 2000, Corumbá. **Resumos...**Corumbá: Embrapa Pantanal, 2000. p. 294.

ROSSITER, S. J. *et al.* Genetic variation and population structure in the endangered great horseshoes bat *Rhinolophus ferrumequinum*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 8, p. 1131-1135, 2000.

ROTHSCHILD, M. F. **Selection for disease resistance in the pig**. 1999. Disponível em: <<http://mark.asci.ncsu.edu/nsif/98proc/rothschild.htm>>. Acesso em: 20 set. 2008.

SAHAI, R.; VIJH, R. K. **Domestic animal diversity** - conservation & sustainable development. Karnal: SI Publications, 2000. 355 p.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAIKI, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAINO, N. *et al.* A experimental study of paternity and tail ornamentation in the Barn Swallow (*Hirunda rustica*). **Evolution**, Oxford, v. 2, n. 51, p. 562-570, 1997.

SAMBROOK, J. *et al.* Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 97, n. 3, p. 369-90, 1975.

SANTOS, S. A. *et al.* **Estratégias de conservação *in situ* do cavalo pantaneiro**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 29 p. (Documentos, 55).

SANTOS, S. A. *et al.* **Princípios básicos para a produção sustentável de bovinos de corte no Pantanal**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 25 p. (Documentos, 37).

SCHIVERA, D. **Raising organic pigs**. Disponível em <<http://www.mofga.org/LinkClick.aspx?fileticket=jH9XkXCtD48%3D&tabid=133>>. Acesso em: 20 mai. 2009.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromossoma**, London, v. 109, n. 6, p. 365-371, 2000.

SCHMIDT, V.; GOTTARDI, C. P. T.; NADVORNY, A. Segurança sanitária durante a produção, o manejo e a disposição final de dejetos de suínos. In: SEGANFREDO, M. A.

(Ed.). **Gestão ambiental na suinocultura**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 259-286

SCHWENGBER, S. P. **Utilização de marcadores de cromossomo Y como ferramenta visando a elucidação de casos de crimes sexuais na genética forense**. 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lancet**, London, v. 2, n. 7731, p. 971-972, 1971.

SERENO, J. R. B.; SERENO, F. T. P. S. Recursos genéticos animales brasileños y sus sistemas tradicionales de explotación. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 49, n. 187, p. 405-414, 2000.

SIGNER, E. N. *et al.* A pseudoautosomal minisatellite in the pig. **Mammalian Genome**, New York, v. 5, n. 1, p. 48-51, 1994.

SILVA, E. *et al.* Técnicas de bandeamento cromosômico. **Citogenética Humana**. Manual de Procedimientos. Colômbia: Instituto Nacional de Salud, 1991.

SILVA, M. P.; MAURO, R. Utilización de pasturas nativas por mamíferos e herbívoros en el pantanal. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, n. 193, p.161-173, 2002.

SILVA, M. V. *et al.* Utilização de marcadores genéticos em suínos. I. Características reprodutivas e de resistência a doenças. **Archivos Latinoamericano de Produção Animal**, Maracaibo, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2003.

SLIGHTTON, J. L.; BLECHL, A. E.; SMITHIES, O. Human fetal G gamma- and A gamma-globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. **Cell**, Cambridge, v. 21, n. 3, p. 627-638, 1980.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, London, v. 61, n. 4, p. 629-641, 1955.

- SOLLERO, B. P. **Diversidade genética das raças naturalizadas de suínos no Brasil por meio de marcadores moleculares microssatélites**. 2006. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.
- SOLLERO, B. P. *et al.* Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 8-15, 2009.
- SOUZA, C. A. *et al.* Iberian origin of brazilian local pig breeds based on cytochrome b (MT-CYB) sequence. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 759-762, 2009.
- SPONENBERG, D. P.; TORRES, R. Qué es una raza, porque es importante? Taller terminología de la conservación. In: SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE LA CONSERVACIÓN Y UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGENÉTICOS, 5., 2004, Puno. **Anais...** 2004. p. 240-243.
- STALLINGS, R. L. *et al.* Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics**, San Diego, v. 10, n. 3, p. 807-815, 1991.
- STONEKING, M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 67, n. 4, p. 1029-1032, 2000.
- STORMONT, C; CUMLEY, R. W. Celular antigens in cattle blood. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 34, p. 35-41, 1943.
- SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, Maryland Heights, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.
- SUMNER, A. T.; EVANS, H. J.; BUCKLAND, R. New technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biology**, London, v. 232, n. 27, p. 31-32, 1971.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. **EXS**, Basel, v. 67, p. 21-28, 1993.

- THOMSEN, P. D.; HOYHEIM, B.; CHRISTENSEN, K. Recent fusion events during evolution of pig chromosomes 3 and 6 identified by comparison with the babirusa karyotype. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 73, n. 3, p. 203-208, 1996.
- TIJO, J. H.; LEVAN, A. The chromosome number of man. **Hereditas**, Malden, v. 42, p. 1-6, 1956.
- TORO, M. A. *et al.* Genealogical analysis of a closed herd of black hairless iberian pigs. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 14, n. 6, p. 1843-1851, 2000.
- TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Manual de zootecnia: raças que interessam ao Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1975. 301 p.
- TRINCA, C. S. **Diversidade genética e padrões filogeográficos da lontra neotropical (*Lontra longicaudis* [Olfers, 1818])**; (Mammalia: Mustelidae). 2007. 150 f. Dissertação (Mestrado em Biociência - Zoologia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- TROVO, J. B.; DUARTE, F. A. M. Levantamento de núcleos de criação de bovinos da raça Caracu no Brasil. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 19, n. 4, p. 245-63, 1981.
- UDO, H. **Use of ruminant livestock resources in resource-poor farming systems: back to the future**. 2003. Disponível em: <<http://www.zod.wau.nl/aps/papers.ftml>>. Acesso em: 20 nov. 2009.
- VALDES, A. M.; SLATKIN, M.; FREIMER, N. B. Allele frequencies at microsatellite loci: the SSM revisited. **Genetics**, Bethesda, v. 133, n. 3, p. 737-749, 1993.
- VALIENTE, J. Q. **Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas**. 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2007.
- VIANNA, A. T. **Os suínos: criação prática e econômica**. 14. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 384 p.
- VIARD, F. *et al.* Microsatellite and the genetics of highly selfing populations in the Freshwater Snail *Bulinus truncatus*. **Genetics**, Bethesda, v. 142, p. 1237-1247, 1996.

- VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- WANDERLEY, M. N. B. Territorialidade e ruralidade no Nordeste: por um pacto pelo desenvolvimento rural. In: SABOURIN, E.; OLIVIO, A. T. (Ed.). **Planejamento e desenvolvimento dos territórios rurais: conceitos, controvérsias e experiências**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2002. p. 39-52.
- WANG, J. X. *et al.* Chromosomal polymorphisms due to heterochromatin growth and pericentric inversions in white-bellied rat, *Niviventer confucianus*, from China. **Hereditas**, Malden, v. 138, n. 1, p. 59-64, 2003.
- WEBER, J. L. Informativeness of human DNA (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, San Diego, v. 7, n. 4, p. 524-530, 1990.
- WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 44, n. 3, p. 388-396, 1989.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.
- WIEDMANN, R. T.; SMITH, T. P.; NONNEMAN, D. J. SNP discovery in swine by reduced representation and high throughput pyrosequencing. **BMC Genetics**, London, v. 4, p. 9-81, 2008.
- WILLIAMS, J. G. K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- WILSON, M. R. Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 108, n. 2, p. 68-74, 1995.
- WILSON, M. R. *et al.* A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. **Human Genetics**, New York, v. 100, n. 2, p. 167-171, 1997.

WINTER, A. K.; FREDHOLM, M.; THOMSEN, P. D. Variable (dG-dT)_n.(dC-dA)_n sequences in the porcine genome. **Genomics**, San Diego, v. 12, n. 2, p. 281-288, 1992.

XU, J. Y.; XU, G. B.; CHEN, S. L. A new method for SNP discovery. **Biotechniques**, Natick, v. 46, n. 3, p. 201-208, 2009.

XU, M.; HUARACHA, E.; KORBAN, S. S. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. **Genome**, Ottawa, v. 44, n. 1, p. 63-70, 2001.

YAU, F. C. F. *et al.* Generation of a sequence characterized amplified region probe for authentication of crocodylian species. **Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution**, Hoboken, v. 294, n. 4, p. 382-386, 2002.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZÁRATE, A. V. Breeding strategies for marginal regions in the tropics and subtropics. **Animal Research and Development**, Tuebingen, v. 43, p. 99-118, 1996.

CAPÍTULO 2. *SUS SCROFA*: ESPÉCIE, SUBESPÉCIE E RAÇA

Resumo - Neste capítulo, objetivaram-se aplicar os conceitos de espécie, subespécie, raça e grupo genético à espécie *Sus scrofa*; descrever os grupos genéticos e as raças que foram utilizados para auxiliar nas análises filogenéticas e de divergência genética; e apresentar a metodologia comum aos demais capítulos, descrevendo todos os procedimentos realizados na coleta e no processamento das amostras. Com base na revisão de literatura, verificou-se que aqueles conceitos diferem quando aplicados à espécie *Sus scrofa*, devido, principalmente, à sua grande diversidade genética e geográfica, proporcionando a sua divisão em inúmeras subespécies e raças. Por último, sugere-se a utilização do termo nativo, local, autóctone ou crioulo ao invés de naturalizado e nacional para as raças dos animais domésticos do Brasil, uma vez que a real definição dos termos naturalizado e nacional os torna inadequados quando aplicados às raças formadas no Brasil.

2.1 INTRODUÇÃO

O suíno, bem como o javali, pertence ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, classe *Mammalia*, subclasse *Theria*, ordem *Artiodactyla*, subordem *Suinae* (Suiformes), família *Suidae*, subfamília *Suinae*, gênero *Sus* e à espécie *Sus scrofa* (ORR, 1986). Ambos pertenciam à ordem *Artiodactyla* por serem mamíferos ungulados de dígitos pares; recentemente, entretanto, houve uma reclassificação taxonômica, que o reclassifica como *Cetartiodactyla* (FONSECA & CORREIA, 2008; OLIVER & LEUS, 2008).

Os cetartiodáctilos constituem uma ordem de mamífero placentário, que reúne as antigas ordens dos cetáceos (*Cetacea*) e dos artiodáctilos (*Artiodactyla*). Os cetáceos são os mamíferos marinhos, como os golfinhos, as baleias e outros, enquanto os artiodáctilos são, entre outros, os camelos, os bovinos, os suínos e os hipopótamos. Os mamíferos placentários teriam tido a sua origem no Cretácico Inferior, há 125 milhões de anos (ROACH, 2002; Ji *et al.*, 2002), e pertencem a uma infraclasse (*Placentalia*) que se caracteriza pelo fato de as crias ficarem no útero materno durante a gestação, onde são alimentadas por uma placenta córion-alantóide (YOUNG, 1977). Acredita-se na existência de mais de 5.100 espécies de mamífero placentário (CHAPMAN, 2006).

De acordo com NOWAK (1991), o gênero *Sus* compreende cinco espécies vivas, que são de mamífero placentário: *Sus salvanius*, *Sus barbatus*, *Sus verrucosus*, *Sus celebensis* e *Sus scrofa*. Acredita-se que existam, pelo menos, 16 subespécies na espécie *Sus scrofa* (CHEN & LEIBENGUTH, 1995; OLIVER *et al.*, 1993; GIUFFRA *et al.*, 2000), como o javali europeu (*S. s. scrofa*), o da Malásia e Indonésia (*S. s. vittatus*) assim como o porco doméstico (*S. s. domesticus*). Naturalmente, as subespécies selvagens ocorrem na Eurásia e no Noroeste da África. No entanto, de forma geral, essa espécie pode ser dividida em dois grupos: selvagem e doméstico.

Este capítulo tem como objetivos aplicar os conceitos de espécie, subespécie, raça e grupo genético à espécie *Sus scrofa*; descrever as raças e os grupos genéticos utilizados para auxiliar nas análises filogenéticas e de divergência genética; e apresentar a metodologia comum aos demais capítulos, descrevendo todos os procedimentos realizados na coleta e no processamento das amostras.

2.2 ESPÉCIE, SUBESPÉCIE E RAÇA

A espécie é um agrupamento de indivíduo com profunda semelhança recíproca (estrutural e funcional), que demonstra ainda acentuadas similaridades bioquímicas: idêntico cariótipo e capacidade de reprodução entre si, originando novos descendentes férteis e com o mesmo quadro geral de característica. Do ponto de vista estritamente sistemático ou da taxonomia, é a hierarquia compreendida entre o gênero (ou o subgênero, se existir) e a subespécie. Esta é, portanto, em taxonomia, uma subdivisão

da espécie. Geralmente, isso ocorre quando duas ou mais populações de uma mesma espécie se separam, habitando regiões diferentes e, separadas por barreiras geográficas durante muitas e muitas gerações, não compartilham as mutações que ocorrem no transcurso do tempo. Assim, inexistindo troca de alelo entre tais populações, sobrevivem as diferenciações genéticas e, conseqüentemente, surgem subespécies ou raças.

Uma espécie está separada de outra pelo isolamento reprodutivo, enquanto uma subespécie está separada de outra apenas por diferenças morfológicas, genéticas, fisiológicas e geográficas (FOX & WOLF, 2006). A biologia reconhece espécies monotípicas – nas quais não é possível classificar os indivíduos em diferentes subespécies ou raças – e espécies politípicas – nas quais é possível identificar subespécies ou raças distintas (BAMSHAD *et al.*, 2004). A espécie *Sus scrofa* é politípica, pois, além de possuir várias subespécies, contém inúmeras raças na subespécie *Sus scrofa domesticus*, daí a impossibilidade de se alcançar uma classificação consensual.

Geralmente, considera-se raça um sinônimo de subespécie, caracterizada pela comprovada existência de linhagem intraespecífica distinta. Portanto, para a delimitação de subespécie (ou raça), a diferenciação genética é uma condição essencial (MAYR, 1969; PONZONI, 1997). A espécie *Sus scrofa*, entretanto, possui várias subespécies que nada têm a ver com raça, uma vez que essa atribuição apenas é conferida aos distintos grupos que compõem única e exclusivamente a subespécie *Sus scrofa domesticus*; não é comum se dividir espécie nem subespécie selvagens em raça.

Em princípio, raça poderia ser considerada uma classificação muito útil para os animais de produção, mas, a partir das realizações dos criadores ingleses do século XVIII e início do XIX, com a aparição do cavalo puro sangue inglês, dos bovinos *durham* e *aberdim* bem como do ovino *disley* e do porco *yorkshire* o conceito de raça passou a ser estudado de forma mais complexa (MARTINÉZ, 2001). Desde então, são muitas as definições de raça abordadas por diferentes autores (KRONACHER, 1937; DOBZHANSKY, 1941; CUENCA, 1950; JORDANO-BAREA, 1951; SÁNCHEZ, 1960;

DOMINGUES, 1968; LERNER & DONALD, 1969; CARTER & COX, 1982; OROZCO, 1985; CLUTTON-BROCK, 1992; PONZONI, 1997).

De acordo com RODERO & HERRERA (2000), as raças são populações com origem e localização em uma determinada área, que possuem um ambiente comum e que se distinguem nos aspectos físicos, os quais são determinados geneticamente e que as diferenciam de outras populações da mesma espécie.

Conforme afirma DOMINGUES (1968), raça é um conceito convencional, que diz respeito a um grupo de animal da mesma espécie, com origem comum, apresentando caracteres particulares (inclusive atributos econômicos), que tornam seus indivíduos semelhantes entre si, tanto quanto diferentes de indivíduos de outros agrupamentos da mesma natureza, e que são ainda capazes de gerar, em condições ambientais idênticas ou semelhantes, descendência com os mesmos caracteres morfológicos, fisiológicos e econômicos.

Diz-se que é convencional pelo fato de, para o criador ou mesmo para o zootecnista, a raça passar a existir desde que os criadores de uma população animal estabeleçam as bases de seu padrão, comprometendo-se a mantê-la por seleção de seus reprodutores e por castiçamento, instituindo, para esse propósito, um livro genealógico para os animais que apresentem o padrão estabelecido, e que o Ministério da Agricultura reconheça a população como raça (DOMINGUES, 1968). Trata-se de um conceito tão convencional que reconhece que animais descendentes de pais, avós e outros ascendentes puros podem afastar-se do padrão. E, apesar da sua pureza de sangue, decorrente de serem descendentes diretos de animais registrados, não logram ser inscritos no livro genealógico da raça. Como exemplo, cita-se o caso dos porcos das raças *wessex* e *hampshire*, cujos padrões exigem uma faixa branca, mas é possível que nasçam indivíduos sem a tal faixa ou com a faixa irregular, sendo estes recusados à inscrição.

Por isso tudo, pode-se afirmar que raça é um conceito artificial, apoiado em uma realidade biológica, e a decisão de admitir um grupo genético como raça está subordinada à proposição dos criadores e ao reconhecimento dos técnicos da administração.

Quando um grupo de animal cujos indivíduos têm a mesma origem, apresenta caracteres particulares que tornam seus membros semelhantes entre si, mas diferentes dos indivíduos de outros agrupamentos de mesma natureza, e gera, sob as mesmas condições ambientais, descendência com os mesmos caracteres particulares, mas não possui associação de criador nem livro genealógico, tampouco é reconhecido pelo Ministério da Agricultura como raça, diz-se que é um grupo genético. Ou seja, este atende aos requisitos biológicos existentes no conceito de raça, mas não aos convencionais, que são primordiais para o reconhecimento de um grupo como raça. Assim, dos grupos genéticos de suíno nativo do Brasil, apenas dois são reconhecidos como raça pelo Ministério da Agricultura, o piau e o moura.

De acordo com a origem, as raças podem ser primitivas, quando naturais de certa região, ou derivadas, quando provêm de outras raças (DOMINGUES, 1968). No decorrer dos anos, as raças nativas brasileiras, que são derivadas das introduzidas pelos colonizadores, passaram a ser conhecidas como crioulas, locais, nacionais e até mesmo naturalizadas. Entretanto aqueles animais que vieram nas embarcações e que se naturalizaram de fato no Brasil – devido a cruzamentos absorventes entre eles (mestiçagem) e à seleção natural propiciada pelo ambiente diferenciado e pelas condições edafoclimáticas diversas – deram origem às raças nativas do país, que são únicas no mundo. Por isso é mais adequado referir-se a elas como nativas, locais, autóctones ou crioulas que como naturalizadas – uma vez que “naturalização” é o ato pelo qual um indivíduo adquire uma “nacionalidade” que não é a sua própria – ou nacionais – já que, segundo DOMINGUES (1968), a raça é definida como do país, e não da nação.

Para ALMEIDA (s.d), raças nativas são as que se formaram em um determinado país ou região, oriundas de animais trazidos de outros países ou de outras regiões. É o caso, segundo ele, das raças formadas no Brasil, tais como o bovino curraleiro, os caprinos da raça moxotó, canindé e outros. Essas raças, segundo ALMEIDA (s.d), não existiam nem existem em Portugal, mas foram formadas no Brasil a partir dos animais trazidos de lá. Esse autor ressalta ainda que raça naturalizada é aquela que já estava formada em outro país e, quando transferida para novos países, passou por um

processo de adaptação. É o caso das raças bovinas nelore, gir e guzerá, trazidas da Índia e que estão muito bem adaptadas ao Brasil.

Segundo DOMINGUES (1968), na naturalização, que é uma forma de aclimatação genética, a raça aclima-se sem necessariamente ocorrer um processo de variabilidade, ou seja, sem haver afastamento do padrão racial. Como exemplo de naturalização, esse autor também cita as zebuínas (bovinos). A naturalização é um processo mais rápido, mais fácil, mais simples. Mas a sua ocorrência, na maioria das vezes, só se verifica quando as regiões são homoclimáticas.

A FAO (*Food and Agriculture Organization*) propõe uma classificação de raça associada ao meio onde se dá a criação, diferenciando-se, segundo o Boletim de Informação sobre Recursos Genéticos Animais (FAO, 2001), nas seguintes variantes:

1. Raças exóticas, entre as quais se distinguem:

a) raças de recente apresentação: importadas uma única vez e pelo menos há umas cinco gerações;

b) e raças importadas continuamente: aquelas cujo acervo genético local se repõe periodicamente com material importado.

2. Raças locais, entre as quais se encontram, por sua vez:

a) Raças autóctones ou nativas: procedentes de uma região particular, à qual estão adaptadas e onde são utilizadas; e

b) Raças adaptadas localmente: que estiveram em um país ou em uma região durante tempo suficiente para se adaptar geneticamente a um ou mais sistemas tradicionais ou regionais de produção.

Percebe-se que, de acordo com a FAO (2001), o termo “raça localmente adaptada” também não é adequado para se referir às raças nativas do Brasil, pois a *landrace* e a *duroc*, por exemplo, depois de quase 100 anos de introdução, estão “localmente adaptadas” ao Brasil, mas não são raças locais, ou seja, não são nativas. Entende-se que a expressão “localmente adaptada” estaria mais relacionada à raça naturalizada que à nativa. Ou seja, a raça introduzida está localmente adaptada, “naturalizou-se”, mas nunca virá a ser nativa. Entretanto as raças derivadas das

introduzidas são nativas, conforme deixa claro DOMINGUES (1968). Para ele, raça nativa é aquela natural ou derivada, que se formou em certa região do país por seleção natural, acompanhada ou não de ação seletiva e conservadora do homem. Como exemplo, esse autor cita a pirapetinga e a piau.

As raças de suíno do Brasil, embora derivadas, formaram-se aqui, por isso suas origens são brasileiras. É, portanto, contraditório dizer que se investigam suas respectivas origens ou que são naturalizadas, ou seja, que se formaram em outro país e naturalizaram-se no Brasil – o que se investigam, na verdade, são suas procedências. Nesse sentido, questiona-se se o casco-de-burro, de fato, tenha-se originado em terras brasileiras a partir das raças ibéricas introduzidas no período colonial ou se é originário dos Estados Unidos (MARIANTE *et al.*, 2003; MARIANTE & CAVALCANTE, 2006; CASTRO, 2007), tendo sido importado posteriormente. Nesse último caso, os animais cascos-de-burro seriam mais um grupo genético introduzido, que estaria localmente adaptado, mas não seria nativo do Brasil.

O termo naturalizado é muito usado no Brasil para se referir aos grupos genéticos nativos desse país. Mas isso ocorre pelo equívoco com relação ao fato de a espécie *Sus scrofa* ter sido introduzida no país, não sendo, de fato, nativa. Devido ao tempo de introdução, a subespécie *Sus scrofa domesticus* já pode ser considerada naturalizada. Nesse caso, sim, o termo é o adequado, uma vez que essa subespécie, embora introduzida, adaptou-se e fixou-se para além do seu local de introdução inicial, formando populações que se mantêm e que se reproduzem com êxito tanto com quanto sem a intervenção do Homem (a exemplo do que ocorre com o porco-monteiro); quando isso acontece, diz-se que a espécie está naturalizada (RUNDEL *et al.*, 1998). Mas a subespécie *Sus scrofa scrofa* é exótica e invasora, embora também introduzida, pois as suas populações – pela ação direta ou indireta do homem – reproduzem-se sem controle, ocasionando, segundo alguns autores (MIRANDA & LUI, 2003; GROSSI *et al.* 2006), danos ambientais relevantes. Portanto a espécie *Sus scrofa* pode ser considerada tanto naturalizada, quando se referir à subespécie *Sus scrofa domesticus*, quanto exótica e invasora, quando se referir à *Sus scrofa scrofa*.

APARÍCIO (1946), citado por DOMINGUES (1968), baseado na maior ou menor influência do homem ou do ambiente sobre as raças dos animais domésticos, estabelece dois grupos: i) raça mesológica, constituída por animais que foram e são marcadamente influenciados pelo ambiente, mas muito discretamente pelo homem, e ii) melhorada, que, em oposição à mesológica, é aquela sensivelmente influenciada pela ação do homem. Assim, pode-se afirmar que as raças de suíno nativas do Brasil são mesológicas. Há, contudo, um grupo genético considerado nativo por alguns autores, que é o produto do cruzamento entre raça estrangeira e nativa, conhecido como sorocoba (GODINHO, 1986). Este pode ser considerado um grupo genético sintético, uma vez que é fruto de cruzamento dirigido, representando um grupo nativo melhorado, na concepção de APARÍCIO (1946).

De acordo com a aptidão zootécnica, os grupos genéticos/raças de suíno nativo do Brasil se enquadram no tipo banha, embora existam raças de aptidão mista, tipo banha e tipo carne, como a piau.

E, por fim, considerando-se a filiação étnica das raças, as suínas estariam distribuídas em três troncos (LIMA, 1919): céltico, ibérico (ou mediterrâneo) e asiático.

Dadas as diferenças na abundância e escassez de alimento, muito variável do norte para o sul da Europa e mesmo na própria Península Ibérica, desenvolveram-se dois tipos de suíno bastante diferentes, o celta no norte *versus* ibérico no sul. Essas diferenças são bastante acentuadas, devido aos variados sistemas de alimentação das populações rurais das áreas onde tais tipos foram desenvolvidos. Os celtas orientavam a produção dos animais para a comercialização de carne fresca e produtos de salsicharia, enquanto os ibéricos destinavam as carnes e os toucinhos dos suínos para produtos curados e de longa duração (COELHO, 2003).

Os indivíduos do tronco céltico são braquiocéfalos, o corpo é comprido, com o dorso convexo e o peito chato. Eles são longilíneos, de altura superior à média e de costados achatados (MARTINÉZ, 2001).

Nesse tronco, enquadram-se as raças bísara (Portugal) e *celta gallega* (Espanha). Estas se caracterizam por terem os sistemas ósseo e muscular desenvolvidos, sobretudo no terço anterior, com cabeça forte, grande e musculosa;

membros grandes, pele despigmentada e cerdas grosseiras, abundantes e de cor variável (branca, preta, amarelada ou avermelhada). As orelhas são grandes e caídas, chegando a tapar os pequenos olhos (REIS, 2000).

O animal adulto pode alcançar 80 cm de altura do solo à cernelha. Seu tronco mede, em média, 1 m no sentido longitudinal, o perímetro torácico é 118 cm aproximadamente, o diâmetro intercostal é sempre inferior a 30 cm e seu peso médio é 120 kg, chegando alguns exemplares a alcançar os 200 kg (REIS, 2000).

As fêmeas possuem um aparelho mamário que contém de 12 a 18 tetos, são cobertas entre o sétimo e o oitavo mês de vida, têm gestação com duração média de 114 dias, variando entre 110 e 118 dias, apresentam boa prolificidade (12-14 leitões/parto) e boas características maternas (CARRIL, 2001).

O tronco porcino céltico tem como qualidades a rusticidade, a fertilidade, a prolificidade e a qualidade cárnica, sendo a sua baixa produção de carne por leitão compensada pelo número de leitão por parto e pela qualidade das suas carcaças, que são utilizadas na produção de leitão assado.

Os representantes do tronco céltico encontram-se, para além de Portugal e Espanha, em distintos países da Europa, como França, Bélgica, Dinamarca, Rússia, Suécia, Noruega, Alemanha, Áustria, Hungria e Suíça (CARRIL, 2001), existindo também no continente americano, onde são derivados das raças introduzidas, mas mantêm as características do tronco de origem, sendo a canastrão a raça brasileira representante desse tronco (Figura 1 do Capítulo 1).

Os indivíduos do tronco ibérico, que LIMA (1919) situa entre o céltico e o asiático por terem caracteres morfológicos intermédios entre os dois antecedentes, são dolicocefalos, com pouca depressão frontonasal.

A pele é sempre pigmentada e coberta de cerdas pouco abundantes, pretas, ruivas ou, menos regularmente, brancas. Trata-se de animais rústicos, vigorosos e bons caminhantes, presta-se, otimamente, à exploração em regime pastoril, e as porcas, menos fecundas, parem de 8 a 10 leitões. Têm boa produção de gordura, mas pouca de carne, ambas de sabor agradável (REIS, 2000).

Os animais pertencentes ao tronco Ibérico encontram-se espalhados pelo sul da Europa, sobretudo na bacia do Mediterrâneo, existindo no sul da Espanha e de Portugal, nas ilhas mediterrânicas, no sul da França, Itália, Grécia, Áustria, Hungria, Bulgária e de Malta. Esses animais também se espalharam pelo mundo, na época da colonização, principalmente da América (VIANNA, 1985; RAMIREZ *et al.*, 2009) e da Austrália (GONGORA *et al.*, 2004). No Brasil, como representantes desse tronco, citam-se as raças piau e caruncho (Figuras 1 e 2 do Capítulo 1 respectivamente).

Os suínos do tronco asiático, também braquiocéfalos, têm fronte larga e chata, e os ossos nasais curtos formam, juntamente com os frontais, um ângulo quase reto. O pescoço é curto, confundindo-se com as papadas, que são fortes e gordas. Têm pequena estatura, a pigmentação da pelagem é variável (vai do preto ao cinzento claro, podendo até ser despigmentada); as cerdas, pouco abundantes, são geralmente brancas. As orelhas são pequenas, eretas ou quase eretas.

Esses animais, rústicos, muito precoces, dotados de extraordinário apetite e eficiência digestiva, engordam rapidamente. A sua fecundidade é notável, podendo parir 17 ou até mesmo 24 leitões. A carne é esbranquiçada, um pouco mole e bastante gorda (VICENTE, 2006).

Originários da Ásia, povoavam a China, o Japão e a Polinésia (PÓVOAS-JANEIRO, 1944). Introduzidos na Inglaterra no século XVIII, serviram de base aos notáveis mestiços ingleses, disseminando-se por todo o mundo e contribuindo para a formação de diversas raças. A pirapetinga e a tatu são raças representantes desse tronco no Brasil (Figuras 1 e 2 do Capítulo 1 respectivamente).

São descritos como altamente prolíficos, com grande precocidade sexual, apresentam qualidade da carne aceitável e boa adaptabilidade à criação extensiva, além de considerável longevidade produtiva. Em contrapartida, têm taxas de crescimento mais lentas e menor percentagem de carne (ROTHSCHILD & RUVINSKY, 1998; LI *et al.*, 2004).

Os porcos desses três troncos serviram de base, sobretudo na Inglaterra, a muitíssimos cruzamentos, visando a produzir animais que transformassem rapidamente alimentos em carne. Os produtos resultantes, conjugados entre si, deram lugar a

numerosos grupos mestiços, alguns dos quais foram considerados raças, embora essas populações nem sempre apresentem tipos definidos (VICENTE, 2006).

O grande feito na formação de qualquer nova raça é conseguir reunir materiais genéticos diferenciados, para, nas gerações seguintes, atingir-se uma ou mais características com homogeneidade relativa e fixidez razoável. E a virtude está em chegar lá sem perder muita variabilidade genética. Por isso, quando se parte de tronco ou origem étnica bem distintos, parte-se de um material genético mais rico, foi o que aconteceu com as “raças” nativas brasileiras, oriundas de cruzamento absorvente entre raça de vários troncos.

Ressalta-se que as raças introduzidas no século passado para fins de aumento de produção não contribuíram em nada na formação dos grupos genéticos nativos brasileiros de suíno. No entanto é comum constatar, na literatura especializada, que tais raças – principalmente a *duroc* – contribuíram nas suas formações. Aquela afirmação apoia-se na data de chegada dessas raças ao Brasil, nas primeiras décadas do século passado, quando as nativas já existiam, uma vez que estas são mais que seculares. Hoje, a possível relação genética entre as raças nativas e as mais recentemente introduzidas pode ser concebida como introgressão alélica, mestiçagem, mas não como contribuição na formação da raça.

Devido, entre vários fatores, ao elevado grau de mestiçagem existente nas populações nativas, atualmente, no Brasil, constitui tarefa bastante difícil separar os suínos em agrupamentos genéticos distintos. Alguns trabalhos foram realizados (CAVALCANTE NETO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2002; CAVALCANTE NETO *et al.*, 2007) na tentativa de localizar e classificar animais de raça nativa nos seus respectivos grupos, utilizando-se dos elementos descritivos mais adequados para a espécie: cor da pelagem, presença ou ausência de cerda, tipo de orelha e de perfil. Na Figura 1, apresentam-se os diversos tipos de perfil cefálico e, na 2, os diversos tipos de orelha da subespécie *Sus scrofa domesticus*.

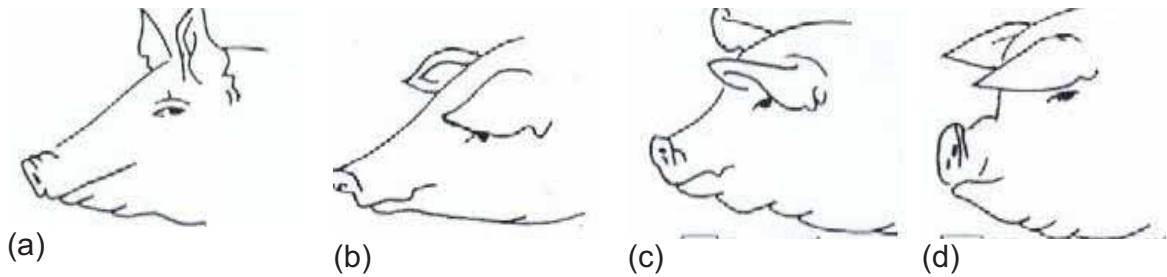


Figura 1. Diversos tipos de perfil dos suínos. (a) Perfil retilíneo: nenhuma depressão frontonasal; (b) Perfil subcôncavo: acentuada depressão frontonasal; (c) Perfil côncavo: proberância do occipital elevada; e (d) Perfil ultracôncavo: forte depressão frontonasal. Adaptado de ALBUQUERQUE *et al.* (1990)

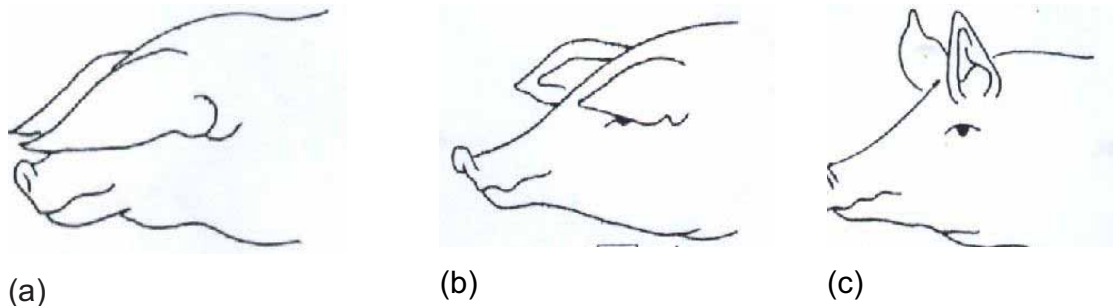


Figura 2. Diversos tipos de orelha dos suínos. (a) Céltica: grandes e pendentes; (b) Ibérica: médias com a ponta dobrada ou caídas para frente; e (c) Asiática: pequenas e eretas. Adaptado de ALBUQUERQUE *et al.* (1990)

Os caracteres raciais nem sempre são apenas raciais, pois podem ser confundidos com os caracteres da espécie (DOMINGUES, 1968). Nos suínos, por exemplo, as orelhas podem ser ibéricas, célticas e asiáticas. Isso seria uma característica racial, visto que, nessa espécie, os animais podem apresentar quaisquer desses tipos de orelha. Contudo o casco fendido pode ser considerado uma característica da espécie, e não racial, devido ao fato de todas as raças apresentarem o mesmo tipo de casco (fendido), não servindo esse parâmetro para separar grupos intraespécies.

Considerando-se os indivíduos do grupo conhecido como casco-de-burro, questiona-se se, de fato, o casco fendido é uma característica da espécie, uma vez que ela também pode apresentar o casco fundido – no entanto é devido ao característico casco fendido que essa espécie pertencida à ordem Artiodactilos e que pertence agora à

Cetartiodáctilos. Para que isso fique mais claro, convém destacar que, nos cavalos, a pelagem é uma característica racial, e não da espécie, já que, nessa espécie, há vários tipos de pelagem que caracterizam os diversos grupos raciais. Contudo, entre os cavalos, o casco fundido é uma característica da espécie, mas não racial, pois não há diferenças nesse atributo entre as diversas raças (ou indivíduos).

O critério “tipo de casco”, no entanto, pode-se tornar racial em suíno, sendo este a principal característica da “raça” casco-de-burro, mas não deve ser a única, uma vez que, para proceder à classificação de uma raça suína, deve-se considerar o tipo de orelha e de perfil, a presença ou ausência de cerda bem como a cor da pelagem.

Outro aspecto a esclarecer é que, no meio natural, a conservação parece se circunscrever ao âmbito da espécie, tanto quanto, no mundo doméstico, tende-se a centralizar a conservação no âmbito da raça. Seria mais adequado ampliar a conservação para a biodiversidade, em particular na esfera doméstica, e levar em conta as formas e os níveis que uma população doméstica pode adotar. No espaço subespecífico, situa-se a raça, mas, no intrarracial, podem ser encontrados distintos conceitos de população, pouco ou não claramente definidos, como são a estirpe, a linha, o tipo étnico, a variedade e o ecótipo, que devem ser levados em conta da mesma maneira que os níveis mais altos, a raça e a espécie. A erosão genética ocorre em todos os níveis, e a perda de uma raça é tão grave como a de sua variabilidade interna.

Vários autores reconhecem grupos intrarraciais (DOMINGUES, 1968; FORERO-VIZCAÍNO, 1999; RODERO & HERRERA, 2000; CARAVACA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003), como as sub-raças, formadas principalmente pelo efeito da seleção natural, e as variedades, formadas principalmente por meio da seleção artificial (RODERO & HERRERA, 2000). Esse último conceito, no entanto, contrasta com o de outros autores (DOMINGUES, 1968; FORERO-VIZCAÍNO, 1999; CARAVACA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2003), para os quais a variedade é formada por indivíduos de uma mesma raça que, em consequência da diversidade das condições ambientais, apresentam diferenças fenotípicas em alguns caracteres, uma vez que as características ambientais podem limitar a expressão do genótipo e determinar um fenótipo específico. Por esse motivo,

uma raça possuirá maior número de variedade quanto mais ampla for sua dispersão geográfica e quanto mais diferentes forem os sistemas de exploração da mesma.

Quando as diferenças que favorecem o surgimento das variedades se devem às questões geográficas, as variantes são chamadas de ecótipos (MOLLES, 2006). Segundo RIEGER *et al.* (1991), esse termo corresponde a grupos ou raças locais cujos genótipos se tenham adaptados a um ambiente particular como resultado da seleção natural e refere-se também à aceção biológica que descreve indivíduos ecológica e fenotipicamente diferenciados.

A estirpe é um subgrupo da variedade e tem o objetivo de assegurar a presença de determinados caracteres (FORERO-VIZCAÍNO, 1999). A linhagem é um grupo animal, mais ou menos amplo, que procede de um mesmo progenitor, mantendo determinados caracteres desejados (DOMINGUES, 1968; FORERO-VIZCAÍNO, 1999). RODERO & HERRERA (2000) conceituam estirpe como uma população fechada de animal de mesma raça, explorada para reprodução consanguínea, sem a introdução de material externo pelo menos durante cinco gerações, ao passo que a linhagem é a subdivisão da estirpe, originada por métodos de cruzamento adequado, que exigem o isolamento de menor número de geração que a estirpe.

2.3 DESCRIÇÃO DOS GRUPOS GENÉTICOS/RAÇAS ESTUDADOS

Este trabalho contempla raças e grupos genéticos de suíno do continente americano e do europeu, mais precisamente do Brasil, dos Estados Unidos, de Portugal e da Espanha, (Figura 3).

Portugal, apesar de ser um país bastante pequeno, possui diversos tipos de ambiente, como o montado, com características próprias tanto no âmbito estrutural, climatérico, quanto paisagístico, permitindo originar e manter, ao longo dos anos, uma enorme biodiversidade, que está bem clara no alto número de raça autóctone de interesse pecuário (13 bovinas, 13 ovinas, 5 caprinas, 4 equídeas e 3 galináceas) (GAMA *et al.*, 2004).

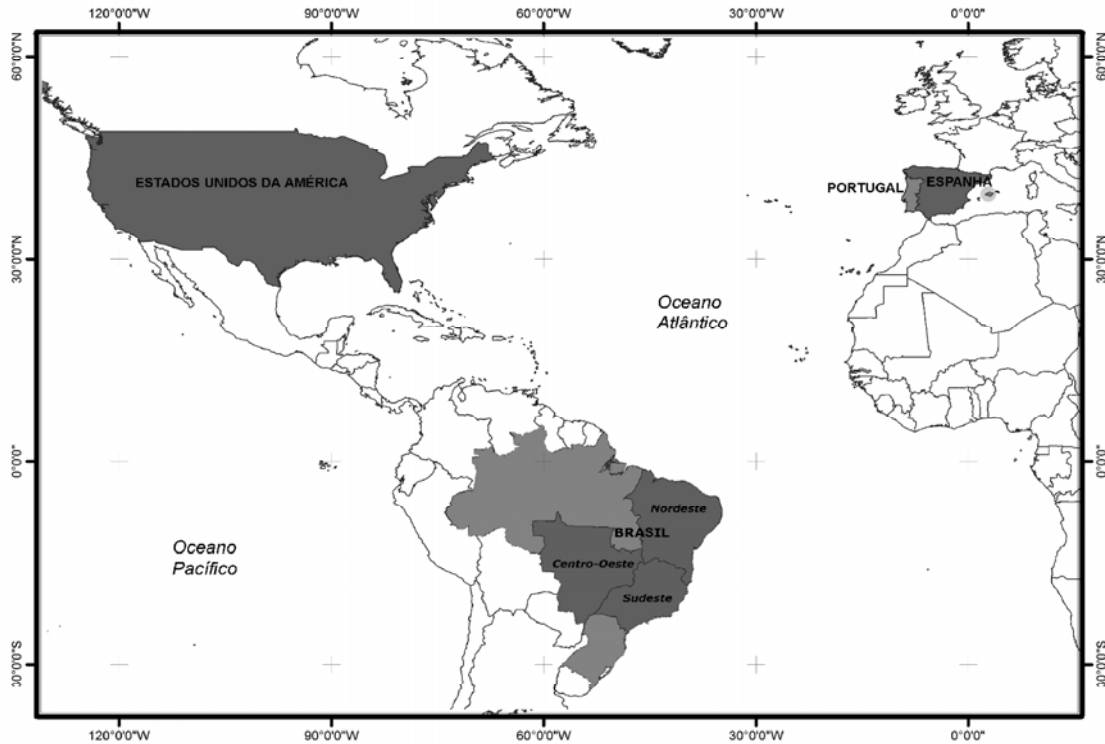


Figura 3. Distribuição geográfica dos grupos genéticos de suíno estudados neste trabalho, que são oriundos do Brasil (das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste), dos Estados Unidos e da Península Ibérica (Portugal e Espanha)

O montado está historicamente associado ao sistema tradicional de produção dos suínos da raça alentejana em Portugal e da ibérica na Espanha, animais perfeitamente adaptados às suas condições. Nesse sistema, o porco alimenta-se de tudo o que o montado dá. Come a bolota que cai da azinheira (*Quercus rotundifolia*) ou a glande que cai do sobreiro (*Quercus suber*), assim como ervas, minhocas e cogumelos. E, ao mesmo tempo, com seu estrume, vai fertilizando a terra.

Em Portugal, existem duas raças de suíno autóctone, alentejana e bísara, e o país possui, ainda, um grupo genético, conhecido como malhado-de-alcobaça.

Na Espanha, há um número maior de raça suína autóctone, que se classifica nas de tronco céltico [*celta gallega, chato vitoriano, gochu asturcelta, catalana, lerreña de*

burgos e baztanes de navarra (DELGADO *et al.*, 2000)], localizadas no noroeste da Península Ibérica e que chegaram com as civilizações que invadiram essa área desde o centro até o norte da Europa, e ibérico (*negro mallorquín, vasco, ibérico, chato murciano, formenteira*), o qual chegou à Espanha com as civilizações que invadiram a Península Ibérica desde a zona Mediterrânea, povoando o Sudeste da península e as ilhas Baleares.

Na Espanha, a demarcação por zonas dos tipos céltico e ibérico seguia uma linha divisória que ia desde a desembocadura do rio Miño até Valência, dividindo-a em duas partes. Ao norte da linha divisória, na Galícia, Astúrias, Leão, ambas as Castillas, País Basco, Navarra, Aragão, Catalunha e norte de Valência, predominava o tipo céltico. Ao sul da linha divisória, na Extremadura, Andaluzia, Múrcia, sul de Castilla-La Mancha e de Valência, predominava o tipo ibérico (REVIDATTI, 2009).

Há também um tipo africano, chamado negro canário, que é encontrado nas ilhas Canárias. Embora com origem africana (DELGADO *et al.*, 1998), a atual população pode ter influência da variedade *entrepelado* da raça ibérica (PAZ, 1995).

Na literatura, há autores (MARIANTE *et al.*, 2003; MARIANTE & CAVALCANTE, 2006; CASTRO, 2007) que afirmam que os animais cascós-de-burro do Brasil são oriundos da raça *mulefoot*, dos Estados Unidos. Então, com o intuito de ver a relação dos cascós-de-burro com o *mulefoot*, utilizaram-se neste trabalho animais com esse fenótipo, provenientes dos Estados Unidos.

2.3.1 Grupo genético e raças de Portugal

Todos os três grupos genéticos de suíno nativo de Portugal (duas raças e um grupo genético) foram estudados neste trabalho. O grupo malhado-de-alcobaça (Figura 4) resulta do cruzamento de porcos das raças bísara, *berkshire* e *yorkshire*, sendo conhecido por sintrão, torrejano, raça da granja, porco da terra (VICENTE, 2006). Apresenta animais de coloração malhada, cabeça de perfil côncavo, orelhas compridas, corpo longilíneo e membros altos e, na atualidade, encontra-se, infelizmente, numa só exploração, pertencente à Selecpor SA.

O porco de raça bísara (Figura 4) encontra-se nas pequenas explorações do interior norte de Portugal, cujas principais características socioeconômicas são a pluriatividade, a utilização de mão de obra familiar e a produção de bens alimentares orientados para o auto-consumo. Entretanto a dinâmica do projeto PAMAF-IED n° 7173, intitulado “Preservação, recuperação e desenvolvimento do porco bísaro”, induziu a um crescente número de animal e de exploração que utiliza agora o porco de raça bísara de acordo com as normas legais do exercício da atividade. Por conseguinte a rastreabilidade dos produtos está agora mais facilitada nessas explorações. O inventário genético e a caracterização dos genes de efeito visível (caracteres morfológicos) realizados pelo projeto supracitado permitiram a identificação de bísaros de diferentes genótipos e a constituição de dois núcleos de conservação *in vivo* e *in situ* desse suíno (COSTA *et al.* 2001).

Conhecido vulgarmente por porco-preto e pata-preta, o porco de raça alentejana (Figura 4) continua, ainda hoje, a ser criado como sempre o foi, ou seja, em perfeita liberdade e harmonia com a natureza. Ao longo do dia, no seu vaguear pelo montado, o animal encontra sustento em bolota, ervas e restolhos. E é precisamente esta equilibrada dieta que dá sabor à sua carne e a torna tão apreciada. Na verdade, o que mudou foi o reconhecimento oficial da sua especificidade e da qualidade da sua carne (FREITAS, 1998).



Malhado-de-Alcobaça



Bísara



Alentejana

Figura 4. Grupo genético (malhado-de-alcobaça) e as raças portuguesas de suíno

2.3.2 Raças da Espanha

Foram estudadas duas raças da Espanha, a *celta gallega*, escolhida pela falta de informação genética sobre a mesma, e a ibérica, escolhida pela importância econômica. E ambas escolhidas também pela possível relação com os animais cascós-de-burro, visto que são raças antigas da Espanha.

Possuidora de grandes variedades [negras (*lampiño* e *entrepelado*) e coloradas (*retinto*, *rubio*, *torbiscal* e *manchado-de-jabugo*)], a raça ibérica é a principal da Península Ibérica (Figura 5 e 6). Essa raça possui, além das variedades, inúmeras

estirpes e linhas (Figura 5). A variedade *retinto* é, em Portugal, chamada de raça alentejana. Portanto essa última nada mais é que uma variedade da raça ibérica da Espanha.

Assim, embora os suínos da raça alentejana de Portugal pertençam ao agrupamento racial denominado ibérico na Espanha, optou-se por também investigar esse último, pois os animais que possivelmente vieram para o Brasil no período colonial pertenciam a esse agrupamento, sendo importante considerar grupos de ambos os países; é igualmente importante estudar um grupo oriundo de Portugal (alentejano) e outro da Espanha (ibérico). Por isso, nesta pesquisa, utilizaram-se quatro variedades do agrupamento racial ibérico da Espanha (*retinto*, *lampiño*, *entrepelado* e *dorado gaditano*), escolhidas por serem mais ancestrais, enquanto as outras variedades são cruzamentos entre essas variedades. Essas quatro populações estudadas da raça ibérica da Espanha foram consideradas como distintas nas análises.

Representante do tronco céltico, a raça *celta gallega* (Figura 6) é a única originária da Galícia, Espanha. Era a mais importante nessa comunidade até começo do século XX, sofrendo, desde então, uma contínua redução e abandono dos costumes de criação de suíno ao pastoreio. Na metade desse século, somente 14% do censo suíno *gallego* era da raça *celta*, chegando a quase desaparecer do território espanhol. Atualmente, essa raça está incluída no *Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España* como autóctone em proteção especial e, desde 1997, em perigo de extinção. É bastante rústica, com boa aptidão para criação ao pastoreio devido ao forte aparelho locomotor, que lhe permite andar grandes distâncias. Sua grande rusticidade concede-lhe uma perfeita adaptação aos bosques nativos *gallegos*, onde pastoreia e aproveita os recursos naturais estacionais (SÁNCHEZ *et al.*, 2000).

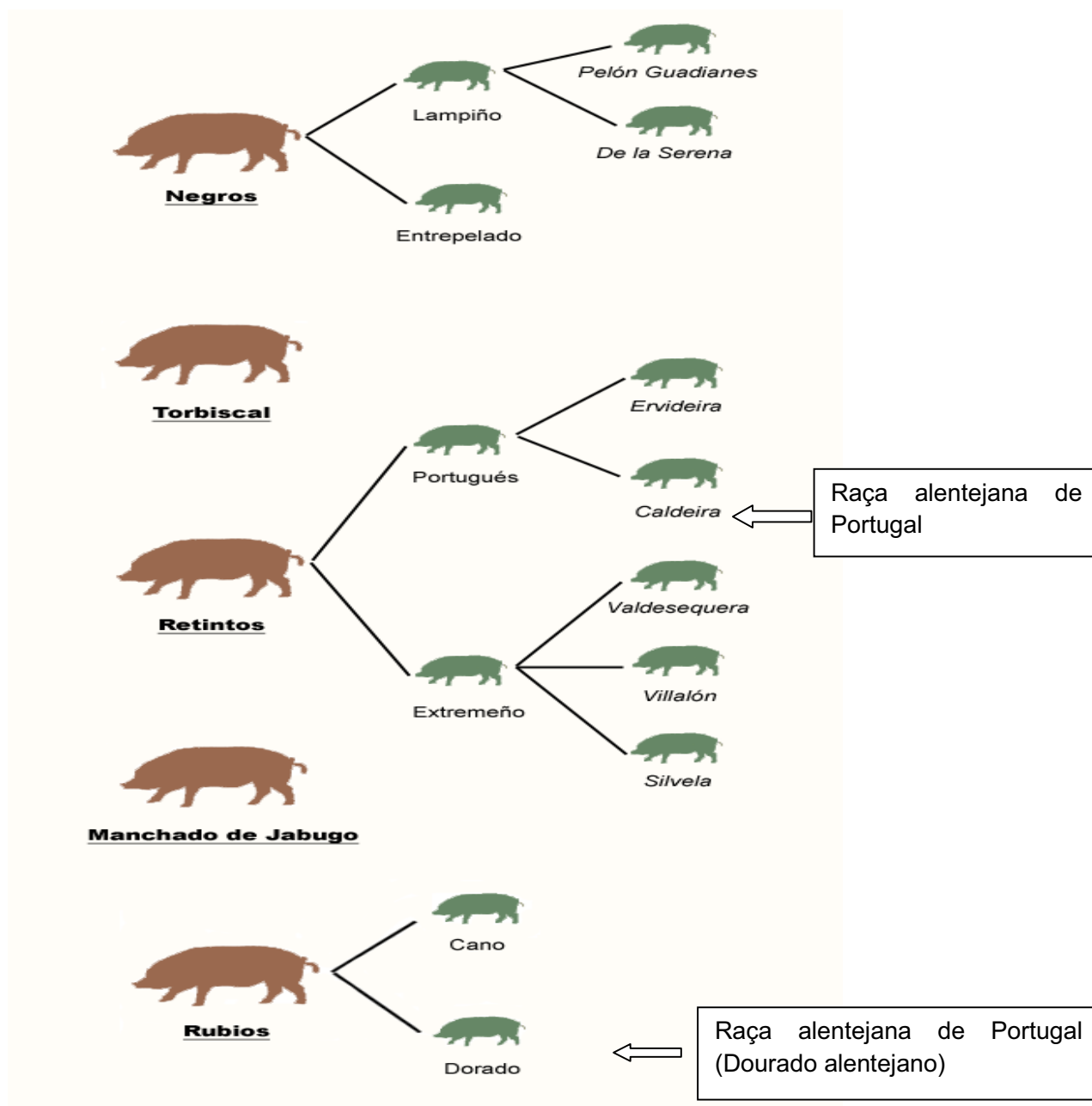


Figura 5. Classificação das variedades, estirpes e linhas da raça ibérica da Espanha

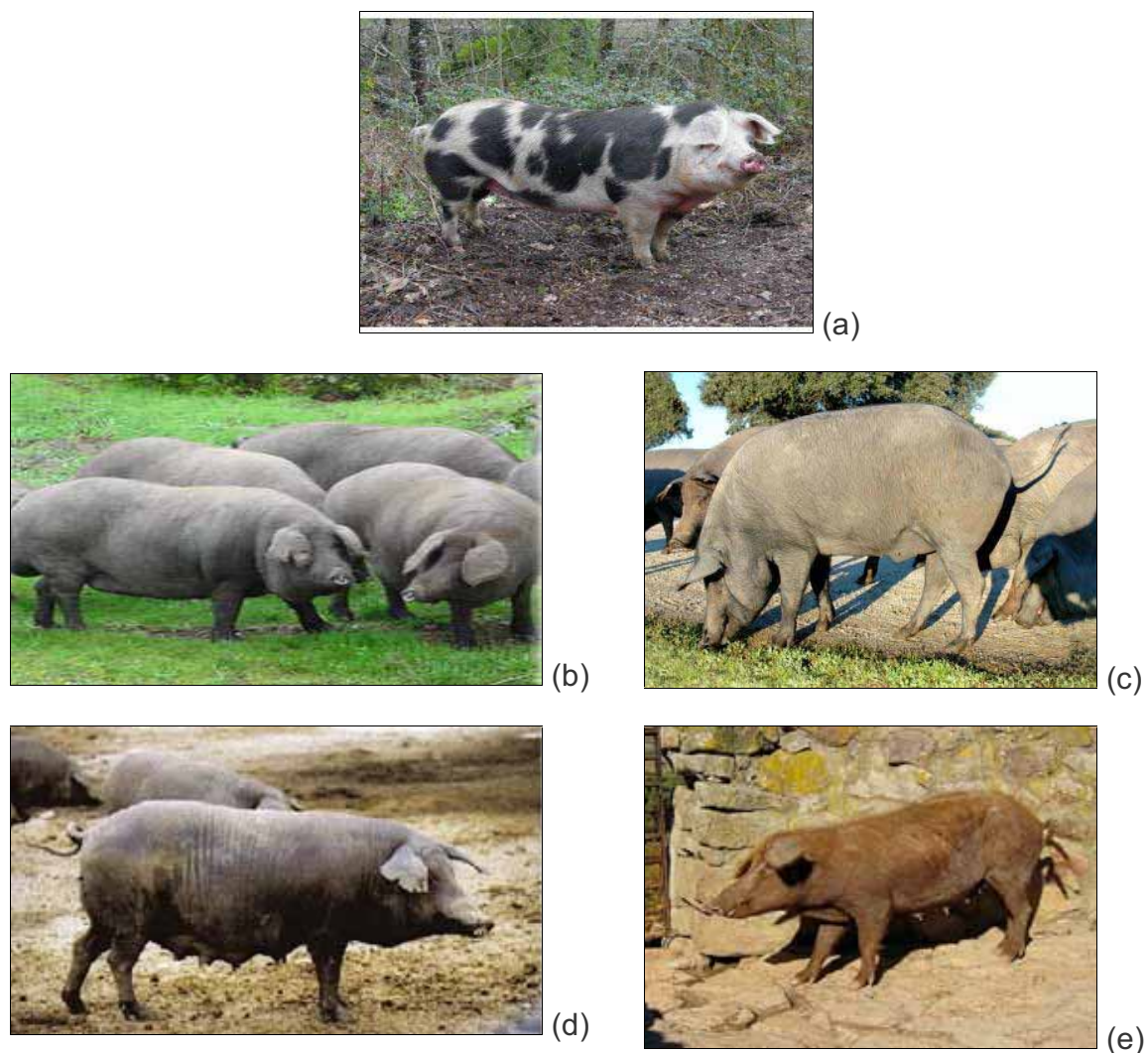


Figura 6. Raças da Espanha utilizadas neste trabalho: (a) *celta gallega* (b) *lampiño**, (c) *retinto**, (d) *entrepelado** e (e) *dorado gaditano**⁶

2.3.3 Raças dos Estados Unidos

Os espanhóis, em 1565, fizeram sua primeira tentativa de colonizar o território que, hoje, é a Flórida. As referências históricas iniciais sobre os animais domésticos indicam que números reduzidos de bovino, caprino e suíno foram enviados pelo estado para o uso dos colonizadores (KIRK, 1936).

⁶ *Compõem o agrupamento racial denominado ibérico.

Os suínos *mulefoot* (Figura 7) compreendem uma raça americana que descende possivelmente dos porcos que os espanhóis trouxeram para a Flórida e para o Costa do Golfo no século XVI. A característica mais distintiva desses animais é justamente o casco fundido, igualmente ao do casco-de-burro do Brasil. Engordam com bastante facilidade, e um porco adulto pesa entre 185 e 220 kg. Por causa do elevado teor de gordura, essa raça é particularmente boa para fiambre de qualidade extra (AMERICAN..., 2009).

Esses animais tiveram o seu pico de popularidade há cerca de um século, com muitos criadores nos estados do Centro-Oeste e do Sul, mas chegou a um ponto em que havia apenas um criador, RM Holliday de Missouri. A seleção para produção forte e consistente de Holliday manteve uma raça uniforme e característica. O *mulefoot* é a mais rara raça norte-americana de suíno (AMERICAN..., 2009). Devido ao seu estatuto de risco e ao valor histórico, é necessária a sua conservação.

Além dos suínos *mulefoot*, também utilizaram-se, neste trabalho, animais das raças norte-americanas *red wattle* e *guinea* (Figura 7), com o intuito de verificar se os suínos *mulefoot* apresentam a mesma origem materna de outros suínos da sua região.

A história do *red wattle* não é clara. Existem imensas possibilidades sobre quem, o quê e quando surgiu. Eram utilizados em algumas criações para cruzamento, pois ofereciam porcos maiores e mais magros. A *American Livestock Breed Conservancy* (ALBC)⁷ organizou uma conferência em meados de 1980 no ensejo de ajudar a unificar os criadores, mas a maioria não percebeu a razão. Em 1990, a ALBC reportou 272 crias de raça pura. Em 1999, no entanto, restavam apenas 42 animais de criação, pertencentes a 6 criadores. A partir desse ano, há um pouco mais de pessoas envolvidas, mas o número de *red wattle* não aumentou muito.

A *guinea* é uma raça de porco doméstico originária dos Estados Unidos. Apesar do nome, não é da Guiné, visto que se acredita que a fundação do estoque foi derivada do oeste da África. Possui pele preta, cauda enrolada e orelhas em pé. São porcos pequenos comparados às raças modernas; eles pesam menos que 72 kg e produzem

⁷ Disponível em: < <http://www.albc-usa.org/>>.

de 22 a 45,36 kg de carne e gordura. Eles são bons pastejadores livres como também vivem bem em casas de fazenda, tendo temperamento calmo. Não são usados para fins comerciais por causa do seu tamanho reduzido e alto conteúdo de banha. Há dois tipos de porco da Guiné na América do Norte, os de ossos curtos e os de ossos longos, sendo que esse último possui pernas mais compridas (KIRK, 1936; DOHNER, 2001).



Mulefoot



Red Wattle



Guinea

Figura 7. Suínos das raças norte-americanas

2.3.4 Raças Internacionais

Supõe-se que os cascos-de-burro descendam dos porcos introduzidos pelos colonizadores ou dos suínos *mulefoot* dos Estados Unidos. Mas as populações de

suíno de raça nativa do Brasil têm recebido grande influência das raças tidas como “internacionais” – assim chamadas devido à sua facilidade de se adaptar a diversos ambientes e de serem usadas internacionalmente em suinocultura industrial –, que são as raças *landrace*, *large white* e *duroc*. Então utilizaram-se também essas raças neste trabalho, no intuito de ver a miscigenação dos cascacos-de-burro com elas, uma vez que são usadas, desde sua introdução, pelo pequeno criador, o de raça nativa, com o objetivo de melhorar a *performance* do seu rebanho.

A *duroc* foi a primeira raça a ser introduzida no país e, portanto, a que iniciou o melhoramento e a tecnificação da suinocultura brasileira, sendo registrada, no *Pig Book Brasileiro*, a partir do ano de 1958 (LARRAMBEBERE & COSTA, 1983). A rusticidade e a fácil adaptação a todas as regiões do país fizeram com que seu uso em cruzamentos industriais propiciasse uma melhoria na qualidade da carne das raças nativas como também das brancas.

A *large white* descende de um antiga raça de porco grande, pernudo e ossudo do norte da Inglaterra. É a raça mais numerosa e mais importante na Grã-bretanha, tendo sido exportada para vários países, em muitos dos quais, destaca-se entre as demais (TORRES & JARDIM, 1975).

A raça *landrace* vem sendo aperfeiçoada pelos dinamarqueses há mais de um século, visando a excelentes qualidades criatórias, além de uma conformação ideal para a produção de carne magra (TORRES & JARDIM, 1975). Como nenhum país, até então, havia conseguido resultados semelhantes com suas raças, passaram a introduzi-la, quer para a formação de novas raças quer para melhorar as raças locais para carne magra. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Suínos, das raças puras registradas no *Pig Book Brasileiro* em 1995, a *landrace* teve a maior participação (26,26%), seguida pela *large white* (25,86%) e *duroc* (6,87%). Os machos da raça *duroc* sempre foram usados para cruzamento com fêmeas F1 (*landrace* x *large white*), sendo a fêmea *duroc* usada somente para a produção de *duroc* puro, por isso um menor número de *duroc* no *Pig Book Brasileiro*.

2.3.5 Grupos genéticos selvagens

Ancestral do porco doméstico, o javali (*Sus scrofa scrofa*) encontra-se distribuído por todo o Portugal Continental, com exceção dos grandes centros urbanos e de algumas porções do cordão litoral (FONSECA, 2004). Uma vez que o javali também é, hoje em dia, uma espécie distribuída por quase todo o território espanhol continental, contatando-se com os núcleos portugueses ao longo de quase toda a região fronteiriça (BLANCO *et al.*, 1998; ROSELL & HERRERO, 2002), pode-se afirmar que esse animal se encontra disseminado praticamente por toda a Península Ibérica. Nesse contexto, há mais sentido falar em populações ibéricas do que em população de javali de Portugal ou da Espanha, uma vez que a distribuição desse ungulado é contínua. Por isso a importância de se ter amostras de *Sus scrofa* na forma selvagem tanto de Portugal quanto da Espanha, uma vez que estas permitirão avaliar a contribuição destes para o *pool* das raças suínas autóctones e, eventualmente, desenvolver marcadores que distingam a forma doméstica da selvagem.

Sua caça está regulamentada na Península Ibérica, mas só é permitida de acordo com a legislação em vigor e com acompanhamento das autoridades responsáveis. Essas caçadas esporádicas, denominadas montarias⁸, são carregadas de simbolismo, visto que envolvem toda uma tradição, em que os iniciados têm o papel principal, sendo feito um batismo sempre que o iniciado abate o seu primeiro javali (VINGADA *et al.*, 2010).

2.3.6 Casco-de-burro

Atualmente, dos treze grupos genéticos de suíno identificados no Brasil, doze estão ameaçados de extinção, e os cascos-de-burro (Figura 8) encontram-se, segundo MARIANTE *et al.* (2003), criticamente ameaçados. Existe, entretanto, controvérsia em relação ao casco-de-burro ser, de fato, raça ou se esse fenótipo poderia ocorrer em qualquer raça.

⁸ Processo de caça – aquele em que o caçador aguarda, em local previamente definido, para capturar exemplares de caça levantados por matilhas de caça maior, conduzidas por matilheiros.



Figura 8. Suíno casco-de-burro da região Centro-Oeste, no estado do Mato Grosso. Animal com “mamela” (brinco)

Chamado também de pata-de-burro, pata-de-mula e casco-de-mula, a denominação casco-de-burro provém do fato de serem sindáctilos, ou seja, com casco fundido. Há quem aponte o Brasil como o centro de origem desses animais (CASTRO, 2007). Mas, segundo alguns autores (MARIANTE *et al.*, 2003; MARIANTE & CAVALCANTE, 2006; CASTRO, 2007), os animais que, no Brasil, chamam-se casco-de-burro têm origem provavelmente na raça *mulefoot*, encontrada nos Estados Unidos. Segundo DETLEFSEN & CARMICHAEL (1921), a condição de casco fendido nos suínos é produzida pelo genótipo homozigoto recessivo mm, enquanto a de casco-de-burro, pelo genótipo dominante M₋. Essa característica apresenta penetrância incompleta, conforme pode ser observada no Apêndice 1.

Estes formam o grupo genético mais importante deste trabalho, que busca caracterizá-lo e tenta elucidar sua origem, uma vez que não existem animais com esse fenótipo na Península Ibérica, que é, de acordo com a literatura pesquisada, de onde vieram os primeiros suínos chegados ao Brasil. Aliás, não existem indícios de suíno com esse fenótipo em toda a Europa.

Um suíno do México apresentando sindactilia tanto nas patas traseiras quanto nas dianteiras foi estudado por LEMUS *et al.* (2003), em que, por meio de raio-X,

verificaram que a primeira das três falanges era similar às aquelas dos porcos sem sindactilia. Notaram-se que as segundas falanges eram mais curtas e que havia outra falange entre os dedos principais, resultando em cinco segundas falanges ao invés de quatro, como é o normal para a espécie *Sus scrofa* (SISSON & GROSSMAN, 1979). Eles apresentaram também uma terceira falange entre os dedos principais, que eram mais longos que os dos suínos sem sindactilia. A segunda e a terceira falange dos principais dedos eram fundidas, o que não permite a separação dos dedos principais, produzindo, assim, sindactilia, mantendo o casco fundido. No entanto os raios-X não mostraram diferenças na estrutura dos ossos entre os animais com e sem sindactilia.

Também é observado sindactilia em bovinos, em que ocorre a fusão ou a não divisão de dois dígitos desenvolvidos nas patas (LEIPOLD *et al.*, 1969; DRÖGEMÜLLER *et al.*, 2007). A variável expressa pelo fenótipo de sindactilia em bovino é vista com mais frequência nas patas dianteiras, mas todas as quatro patas poderão estar envolvidas (DRÖGEMÜLLER & DISTL, 2006). A sindactilia bovina consiste, sobretudo, em pares de falanges sinostóticas horizontais e mudanças adaptativas estruturais desenvolvidas na proximidade dos dígitos fundidos (LEIPOLD *et al.*, 1969). A sindactilia bovina demonstrou segregar um traço monogênico recessivo com penetrância incompleta em várias raças de bovino (LEIPOLD *et al.*, 1998; DRÖGEMÜLLER *et al.*, 2007).

O estudo de DRÖGEMÜLLER *et al.* (2007) indica que a sindactilia congênita em bovinos pode ocorrer em diferentes raças devido a mutações no gene do receptor da proteína 4 relacionada com a lipoproteína de baixa densidade (LRP4). Quatro novas mutações no gene bovino LRP4 foram detectadas no trabalho de DRÖGEMÜLLER *et al.* (2007), que poderia causar sindactilia em bovinos, uma vez que nenhuma dessas variantes de sequência foi observada nos cromossomos dos não afetados.

O mapeamento genético localizou o *locus* da sindactilia no cromossomo 15 bovino (CHARLIER *et al.*, 1996). Essa região do cromossomo bovino é homólogo ao segmento do cromossomo 2 dos ratos, contendo um gene do receptor da proteína 4 relacionada com a lipoproteína de baixa densidade (*LRP4*), também designada como gene do domínio 7 do fator de crescimento epidérmico (*MEGF7*). Os ratos com

deficiência de *LRP4* em homozigose têm atrasos no crescimento, com polisindactilia total penetrante nos membros anteriores e posteriores (JOHNSON *et al.*, 2005).

Recentemente, foram identificados dois porcos tendo “patas extras” (polidactilia pré-axial) em uma população de suíno de raça *yorkshire* (GORBACH *et al.*, 2010). Os porcos com polidactilia são raros, mas vários relatos já foram registrados, o primeiro em 1931 (CURSON, 1931), com reportes adicionais em 1938 (HUGHES, 1938), 1959 (GAEDTKE, 1959; citado por DRÖGEMÜLLER *et al.*, 2007) e 1963 (PTAK, 1963).

No trabalho de GORBACH *et al.* (2010), nasceram 14 porcos afetados (metade nasceu morta) em 110 porcos que nasceram ao abrigo do projeto desse trabalho, usando-se porcos (portadores) que tiveram origem nos animais que fundaram a população (Figura 9). No entanto, quando um porco que havia tido prole com polidactilia foi acasalado com porcas com parentesco e sem parentesco, não foram observadas alterações entre os 129 leitões das 12 fêmeas. Em conjunto, esses dados sugerem um modo recessivo de herança dessa característica. Ao mesmo tempo, o número de leitão afetado foi menor que o esperado para um simples modo de herança recessiva. Portanto este não deverá ser um simples modo de herança recessiva. Mais ainda interessante foi que, dos 155 porcos nascidos nesse projeto (de pais portadores ou filhos de portador), pelo menos 40 porcos (26%) nasceram mortos e pelos menos 13 fetos mumificados (8%), muito mais do que se esperaria nessa população. Esses dados sugerem também algum tipo de expressão letal, mas não foi estatisticamente diferente de um modo recessivo de herança para a mortalidade. Os relatórios de HUGHES (1938) também sugerem que não há uma penetração total dessa característica, uma vez que os acasalamentos entre os porcos afetados produzem porcos afetados e não-afetados.

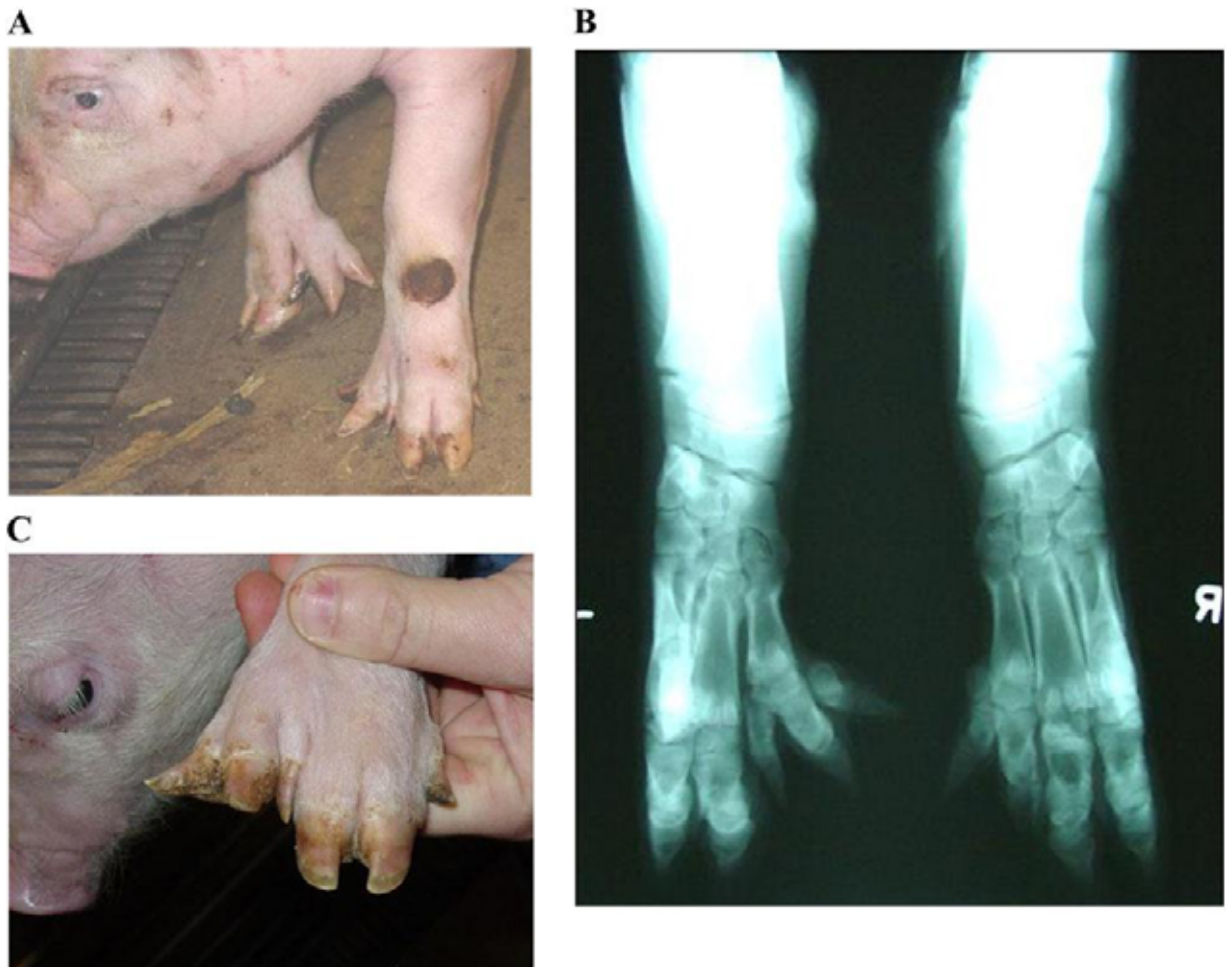


Figura 9. Porcos portadores de polidactilia em uma população de suíno *yorkshire*. (A) suíno macho. (B) Radiografia demonstrando ambas as patas da frente do suíno macho. (C) Suíno fêmea. Fonte: GORBACH *et al.* (2010)

Para a realização do presente trabalho, foram localizados animais com o fenótipo casco-de-burro em três diferentes regiões brasileiras: Sudeste, em Minas Gerais (35 animais, pertencentes a 11 criações); Centro-Oeste, no Mato Grosso (29 animais, pertencentes a 8 criações); e Nordeste, na Paraíba (46 animais, pertencentes a 13 criações). Sendo assim, este trabalho aborda animais de três diferentes regiões (Apêndice 2, 3 e 4), o que totaliza 110 animais com esse fenótipo, pertencentes a 32 rebanhos.

Havia indícios da existência desses animais em Roraima, região Norte (SERENO & SERENO, 2000), mas não foi encontrado contato que garantisse ainda existir esses animais por lá. Isso é fruto da falta de política voltada à gestão e conservação do patrimônio genético nativo, o que, sem sombra de dúvida, ocasionará em perda da biodiversidade dos animais domésticos de raça nativa do Brasil.

2.4 COLETA DAS AMOSTRAS

Para garantir uma amostragem representativa de cada um desses grupos genéticos/raças, realizou-se uma amostragem aleatória a partir de animais não-aparentados em diferentes rebanhos, com uma amostra equilibrada das variedades existentes em cada grupo. A ideia constituiu-se em coletar sangue de, no mínimo, 30 animais (metade macho) de cada grupo genético a partir da seleção de dois animais de sexo diferente por cada leitegada, de modo que a amostragem fosse oriunda de 15 cachaços e 15 matrizes não-aparentados. Mas não foi possível proceder assim na maioria das populações, devido a dificuldade de se encontrar animais de determinadas raças (Tabela 1).

Nos grupos genéticos domésticos, o sangue foi colhido em animais vivos por punção da veia jugular ou da cava após assepsia prévia, usando-se seringa de 5 ml com agulhas hipodérmicas calibre 0,7 mm x 25 mm. Os animais eram contidos pelos tratadores com o uso de cachimbos adequados. Efetuava-se, então, a desinfecção do local de coleta usando-se algodão embebido em álcool iodado, e o sangue era puncionado lentamente da veia, a fim de evitar hemólise. O volume total das amostras coletadas variava entre 1 e 4 ml.

Tabela 1. Raças/Grupos genéticos utilizados neste trabalho, país de origem, número de rebanho amostrado e número de animal utilizado

Raça/Grupo Genético	Localidade	Nº de Rebanho	Tamanho da amostra
Casco-de-burro	Brasil (Minas Gerais)	11	35
Casco-de-burro	Brasil (Mato Grosso)	08	29
Casco-de-burro	Brasil (Paraíba)	13	46
Alentejano	Portugal	01	31
Bízaro	Portugal	04	51
Malhado-de-Alcobaça	Portugal	01	23
<i>Retinto</i>	Espanha	03	30
<i>Lampiño</i>	Espanha	02	30
<i>Entrepelado</i>	Espanha	02	30
<i>Dorado Gaditano</i>	Espanha	01	07
<i>Celta Gallega</i>	Espanha	02	35
<i>Mulefoot</i>	USA	04	40
<i>Red Watlle</i>	USA	01	08
<i>Guinea</i>	USA	02	22
<i>Landrace</i>	Brasil	02	35
<i>Large White</i>	Brasil	02	35
<i>Duroc</i>	Brasil	02	34
Javali	Portugal	06*	27
Javali	Espanha	07*	25

*Refere-se ao número de local de captura.

Para a coleta das amostras de javali, foram acompanhadas 15 montarias nas épocas venatórias⁹ 2008-2009 em Portugal (Figura 9) e na Espanha, onde se coletaram as amostras dos javalis – a partir do coração, que foi dissecado para esse fim, ou mesmo de outra parte do corpo, na qual o sangue estivesse isento de impurezas; o sangue dos javalis caçados foi colhido individualmente para tubos contendo um agente anticoagulante (K₃EDTA).

As amostras de sangue dos grupos genéticos amostrados eram identificadas e armazenadas em bolsa térmica com gelo em gel para, posteriormente, serem processadas no laboratório.

Na maioria dos casos, não há dados da genealogia dos animais, mas todas as informações de identificação dos animais (sexo, raça, idade, pelagem e peso) e dos

⁹ Época de caça, período entre 1 de junho e 31 de maio do ano seguinte.

seus proprietários ou do lugar de captura no caso dos javalis foram anotadas em planilhas para controle dos resultados e para posterior repasse de informação.



Figura 9. Javalis abatidos em uma montaria realizada na cidade de Penacova em Portugal

2.4.1 Processamento das amostras

À medida que se coletavam as amostras de sangue, estas eram conduzidas ao laboratório para se dar início ao seu processamento no mesmo dia.

Depois de chegarem ao laboratório, as amostras sanguíneas eram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min para a separação do plasma, que foi estocado a -80°C , para futuras análises de polimorfismo de proteína.

Na sequência, depois da retirada do plasma, uma porção de cada amostra foi transferida para cartão FTA[®] (Whatman) individual e conservada como mancha de sangue à temperatura ambiente para futuras análises de DNA. A porção restante das amostras foi também conservada, distribuindo-se em microtubos de 1,5 ml e armazenando-se a -20°C para eventual necessidade.

2.4.2 Extração de DNA

Os cartões FTA[®] apresentam algumas vantagens, tais como a pré-extração do DNA, que será mantido no cartão até remoção com o eluente apropriado; a destruição de agentes patogênicos presentes no sangue; o material depositado no cartão, após a completa absorção, não oferece risco biológico; e, principalmente, a possibilidade de armazenamento à temperatura ambiente. Ou seja, esses cartões contêm produtos químicos que inativam microorganismos, limpam a célula, desnaturam proteínas e protegem os ácidos nucleicos de nucleases, oxidação e de danos por radiação ultravioleta (UV).

Apesar de o processo de extração ser iniciado nos próprios cartões FTA e de o restante do processo de extração consistir num conjunto de lavagens com eluente apropriado, outro processo de extração também foi usado. Desse modo, os cartões foram sujeitos à extração do DNA total (nuclear + mitocondrial), segundo o método Fenol:Clorofórmio, como descrito em SAMBROOK *et al.* (1989), uma vez que, após vários testes, concluiu-se que os resultados das amplificações foram melhores com os extratos obtidos por esse método.

Tal método consistiu na digestão de uma porção de amostra (50 µl de sangue fresco ou 3 mm² do cartão FTA com a mancha de sangue) com 500 µl de tampão DLB, 50 µl de SDS 10% e 5 µl de proteinase K (20 mg/ml), seguido de agitação e incubação a 56 °C durante a noite. Após incubação, foram adicionados, ao tubo, 20 µl de NaCl 5M e 575 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), misturando-se por inversão, de modo a proporcionar uma mistura eficaz das duas fases, e, na sequência, foi centrifugado a 14.000 rpm durante 5 min para separação da fase aquosa da orgânica. Depois de retirar o sobrenadante para um novo tubo, realizou-se nova extração, sendo

que agora com 575 μ l de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). A agitação e a centrifugação nos tubos foram efetuadas nas condições descritas anteriormente, obtendo-se uma fase aquosa límpida. Após extração, o DNA foi precipitado com etanol absoluto seguido de centrifugação a 14.000 rpm, durante 5 s, sendo realizado o mesmo protocolo de centrifugação após nova precipitação com etanol 70%. No final, o DNA precipitado foi ressuspenso com 100 μ l de água esterilizada.

A integridade do material genético e a eficiência do método de extração foram averiguadas tanto qualitativa quanto quantitativamente. Para verificar a qualidade, aplicaram-se 1 μ l de DNA estoque e 1 μ l de tampão de carregamento (Tris-HCl 0,1 M e pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%) em um gel de agarose a 1% imerso em Tris-Borato-EDTA 1X (Tris 89 mM, H₃BO₃ 89 mM, EDTA 2,5 mM e pH 6,8), contendo 0,5 mg/ml de brometo de etídio. Procedeu-se a eletroforese a 100 V por 40', e o padrão de tamanho molecular utilizado para comparação foi de 100 pb (Invitrogen®).

Os fragmentos de DNA genômico (Figura 10) foram visualizados sobre transiluminador de luz UV e documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO RAD).

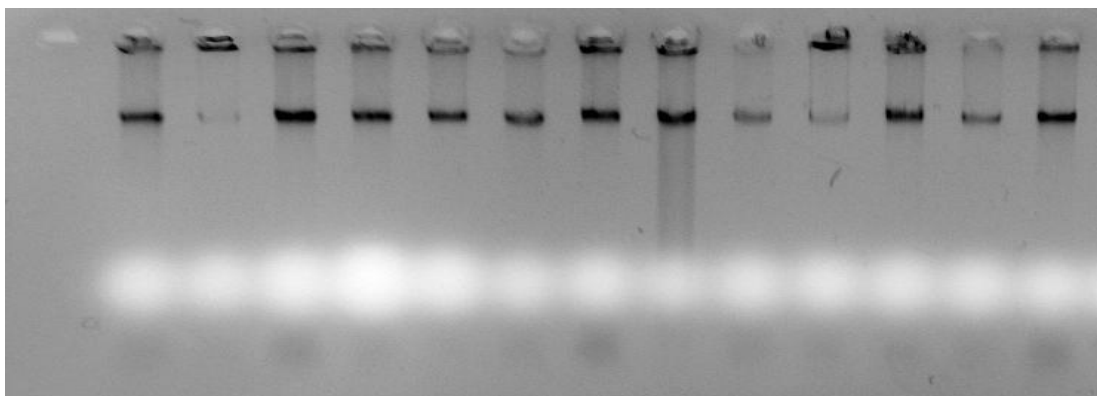


Figura 10. Fragmentos de DNA genômico de suíno em gel de Agarose 1%

A quantidade de DNA foi determinada com a utilização do fluorímetro *Qubit™ Quantification System* (Invitrogen) e do kit de quantificação *Quant-it™ dsDNA BR*

Assays (0,2-1000 ng). Para a realização da leitura, seguiu-se o protocolo do fabricante, usando-se apenas 1 µl de cada amostra.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste capítulo, procurou-se demonstrar a diversidade da espécie *Sus scrofa*, mostrando que esta contém inúmeras subespécies e raças. Com base na revisão da literatura, verificou-se que sobretudo os conceitos de raça e de subespécie diferem quando aplicados à espécie *Sus scrofa*, principalmente devido à sua grande variabilidade geográfica e genética, ocasionando a divisão da espécie em inúmeras subespécies e raças.

Os grupos genéticos aqui estudados estão ou estiveram em risco de extinção. Assim sendo, o efeito fundador deve ser considerado nos resultados das análises genéticas. Como muitas dessas populações ressurgiram a partir de poucos fundadores ou estão atualmente com um restrito número de exemplar, há uma quebra acentuada na variabilidade genética da atual população em relação à originária. Como resultado, a nova população pode ser substancialmente diferente da original, quer no genótipo quer no fenótipo.

Por último, sugere-se a utilização do termo nativo, local, autóctone ou crioulo ao invés de naturalizado e nacional para as raças dos animais domésticos do Brasil, uma vez que a real definição dos termos naturalizado e nacional os torna inadequados quando aplicados às raças (grupos genéticos) formadas no Brasil.

2.6 REFERÊNCIAS

ALBURQUERQUE, M. S. M. *et al.* **Projeto:** identificação e caracterização de grupamentos de suínos nacionais. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1990.

ALMEIDA, M. J. O. **Raças nativas ou naturalizadas?** Disponível em: <<http://www.caprtec.com.br/artigos2.htm>>. Acesso em: 20 mai. 2009.

AMERICAN MULAFOOT HOG ASSOCIATION. **Mulefoot hog**. 2009. Disponível em: <<http://www.mulefootpigs.tripod.com>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

BAMSHAD, M. *et al.* Deconstructing the relationship between genetics and race. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 5, n. 8, p. 598-609, 2004.

BLANCO, J. C. *et al.* **Mamíferos de España. II: cetáceos, artiodáctilos, roedores y lagomorfos de la Península Ibérica, Baleares y Canarias**. Barcelona: Editorial Planeta, 1998. 383 p.

CARAVACA-RODRIGUEZ, F. P. *et al.* **Bases para la producción animal**. Sevilla: Servicios de publicaciones de la Universidad de Córdoba y la Universidad de Sevilla, 2003. 512 p.

CARTER, A. H.; COX, E. H. Sheep breeds in New Zealand. In: WICKHAM, G. A.; MACDONALD, M. F. (Ed.). **Sheep production**. New Zealand: Ray Richards, 1982. v. 1. p. 11-38.

CARRIL, J. Presentación de la raza porcina celta. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 50, n. 189, p. 291-299, 2001.

CASTRO, G. Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, p. 783-788, 2007. Suplemento

CASTRO, S. T. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; GERMANO, J. L. Census of Brazilian naturalized swine breeds. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 51, n. 193, p. 235-239, 2002.

CAVALCANTE NETO, A. *et al.* Censo e caracterização fenotípica de rebanhos de suínos nativos existentes no Estado da Paraíba. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE SUINOCULTURA, 1.; CONGRESSO DE SUINOCULTURA DO MERCUSUL, 3.; CONGRESSO DA ALVEC, 9., 2002, Foz de Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: Pork word, 2002. CD-ROM. p. 1-3.

CAVALCANTE NETO, A. *et al.* Censo e caracterização fenotípica de suínos de grupos genéticos naturalizados brasileiros existentes no Estado da Paraíba. **Biotemas**, Florianópolis, v. 20, n. 4, p. 123-126, 2007.

CHAPMAN, A. D. **Numbers of living species in Australia and the world**. 2006. Canberra: Australian Biological Resources Study. Disponível em: <<http://www.environment.gov.au/biodiversity/abrs/publications/other/species-numbers/2006/index.html>>. Acesso em: 20 mai. 2009.

CHARLIER, C. *et al.* Identity-by-descent mapping of recessive traits in livestock: application to map the bovine syndactyly locus to chromosome 15. **Genome Research**, New York, v. 6, n. 7, p. 580-589, 1996.

CHEN, H.; LEIBENGUTH, F. Restriction patterns of mitochondrial DNA in European wild boar and German Landrace. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 110, n. 4, p. 725-728, 1995.

CLUTTON-BROCK, J. The process of domestication. **Mammal Review**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 79-81, 1992.

COELHO, J. Porco alentejano: qualidade e características. **Suinocultura**, Lisboa, v. 60, p. 30-37, 2003.

COSTA, J. S. P. *et al.* **Projeto: Preservação, recuperação e desenvolvimento do porco bísaro: caracterização e valorização dos produtos suínolas alternativos**. Fonte Boa: PAMAF, 2001. 93 p. Relatório Final.

CUENCA, C. L. **Zootecnia I**. Madrid: Biblioteca de Biología Aplicada, 1950.

CURSON, H. H. Polydactyly in a Springbok and a pig. *Anatomical Stud.* 17 ed. Dir. Vet. Serv. R.S.A., Pretoria, p. 853-856, 1931.

DELGADO, J. V. *et al.* Conservation programme of the Spanish pig genetic resources. **CIHEAM - Options Méditerranéennes**, ICAM-UE, v. 41, p. 53-56, 2000.

DELGADO, J. V. *et al.* Caracterización morfológica de las variedades del tronco Ibérico basada en caracteres cuantitativos. In: SIMPOSIO Internacional do Porco Mediterraneo, 4., 1998, Évora. **Anais...**

DETLEFSEN, J. A.; CARMICHAEL, W. J. Inheritance of syndactylism, black and dilution in swine. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, p. 595-604, 1921.

- DOBZHANSKY, T. H. **Genetics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1941. 353 p.
- DOHNER, J. V. **The encyclopedia of historic and endangered livestock and poultry breeds**. New Haven: Yale University Press, 2001. 560 p.
- DOMINGUES, O. **Introdução à zootecnia**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola do Ministério da Agricultura, 1968. 380 p. (Série Didática, 5).
- DRÖGEMÜLLER, C.; DISTL, O. Genetic analysis of syndactyly in German Holstein cattle. **Veterinary Journal**, Oxford, v. 171, n. 1, p. 120-125, 2006.
- DRÖGEMÜLLER, C. *et al.* Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (*LRP4*). **BMC Genetics**, Camberra, v. 8, n. 1, p. 1471-2156, 2007.
- F.A.O. **FAOSTAT Agriculture**. 2001. Disponível em: <<http://www.apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>>. Data de acesso: 20 mai. 2009.
- FONSECA, C.; CORREIA, F. **O Javali**. Mirandela: João Azevedo Editor. 2008. 168 p. (Coleção Património Natural Transmontano).
- FONSECA C. M. M. S. **Population Dynamics and Management of Wild Boar (*Sus scrofa* L.) in Central Portugal and Southeastern Poland**. 2004. 112 f. Tese (Doutoramento em Biologia) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2004.
- FORERO-VIZCAÍNO, F. J. **Estudio comparativo de cinco estirpes de cerdo Ibérico**. Huelva: Excma. Diputación Provincial de Huelva, 1999. 254 p.
- FOX, C. W.; WOLF, J. B. **Evolutionary genetics: concepts and case studies**. Oxford: Oxford University Press, 2006. 667 p.
- FREITAS, A. A. G. B. **Influência do nível alimentar e regime alimentar em pré-acabamento sobre o crescimento e desenvolvimento do porco alentejano e suas repercussões sobre o acabamento em montanheira e com alimento comercial**. 1998. 305 f. Tese (Doutoramento em Zootecnia) – Universidade de Évora, Évora, 1998.
- GAMA, L. T. *et al.* Recursos genéticos animais em Portugal. **Relatório FAO**, 2004.

GIUFFRA, E. *et al.* The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, Bethesda, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GODINHO, J. F. A formação da linhagem sintética – raça Sorocaba. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 23., 1986, Campo Grande. **Anais...** p. 333.

GONGORA, J. *et al.* Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear *gpi* genotype. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 33, n. 2, p. 339-348, 2004.

GORBACH, D. *et al.* Polydactyl Inheritance in the Pig. **Journal of Heredity**, Oxford, 2010. No prelo. Disponível em: <<http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/esq037>>. Acesso em: 20 Jan. 2010.

GROSSI, S. F. *et al.* Genetic diversity in wild (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 4, p. 564-568, 2006.

HUGHES, E. Polydactyly in swine. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 26, p. 415-418, 1938.

Jl, Q. *et al.* The earliest known eutherian mammal. **Nature**, London, v. 416, n. 6883, p. 816-822, 2002.

JOHNSON E. B; HAMMER, R. E.; HERZ, J. Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in *Megf7*-deficient mice. **Human Molecular Genetics**, Oxford, v. 14, n. 22, p. 3523-3538, 2005.

JORDANO-BAREA, D. Estado actual del concepto de especie, raza y demás grupos subespecíficos. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE VETERINARIA ZOOTÉCNICA, 2., 1951, Madrid. **Anais...** p. 51-85.

KIRK, W. G. Swine production in the southeast. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 1, p. 103-106, 1936.

- KRONACHER, C. **Elementos de zootecnia**: manual para la selección y cría de los animales domésticos para uso de veterinarias y ganaderos. Barcelona: Gustavo Gili, 1937.
- LARRAMBEHERE, W. H. S.; COSTA, C. N. Estrutura genética da raça de suínos Duroc do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 7, p. 811-818, 1983.
- LEIPOLD, H. W. *et al.* Anatomy of hereditary bovine syndactylism. I. Osteology. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, n. 9, p. 1422-1431, 1969.
- LEIPOLD, H. W. *et al.* Hereditary syndactyly in Angus cattle. **Journal of Veterinary diagnostic investigation**, Columbia, v. 10, n. 3, p. 247-254, 1998.
- LEMUS, F. C. *et al.* Morphologic characteristics in mexican native pigs. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 1, p. 105-108, 2003.
- LERNER, I. M.; DONALD, H. P. **La nueva zootecnia**. León: Académia, 1969. 356 p.
- LI, S. J. *et al.* Genetic diversity analyses of 10 indigenous chinese pig populations based on 20 microsatellites. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, n. 2, p. 368-374, 2004.
- LIMA, S. B. Bovídeos e suídeos. Boletim do Ministério da Agricultura: instrução agrícola, Coimbra, v. 1, n. 7, 1919.
- MAYR, E. **Especies animales y evolución**. Santiago de Chile: Ariel, 1969.
- MARIANTE, A. S. *et al.* Pig Biodiversity in Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 198, p. 245-248, 2003.
- MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento**: raças domésticas da história do Brasil. 2. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. 232 p.
- MARTINÉZ, A. M. **Caracterización genética del cerdo ibérico mediante marcadores moleculares**. 2001. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de Córdoba, Córdoba, 2001.
- MIRANDA, L. L.; LUI, J. F. Citogenética do javali em criatórios comerciais das regiões sul e Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1289-1295, 2003.

- MOLLES JR., M. C.. **Ecology**: concepts and applications. 4th ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2006. 604 p.
- NOWAK, R. M. **Walkers mammals of the world**. 5th ed. Maryland: Johns Hopkins University Press, 1991. v. 2. 1629 p.
- OLIVER, W. L. R.; COX, C. R.; GROVES C. P. The Philippine Warty pigs (*S. philippensis* and *S. cebifrons*). In: OLIVER, W. L. R. **Pigs, peccaries, and hippos**. Gland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 1993. p. 145-155.
- OLIVER, W.; LEUS, K. *Sus scrofa*. 2008. In: **IUCN red list of threatened species**. Version 2010.1. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em: 23 out. 2009.
- OROZCO, F. P. **Algunas ideas sobre el concepto de raza en animales domésticos**. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1985. (Série Produccion Animal, 10).
- ORR, R. T. **Biologia dos vertebrados**. 5. ed. São Paulo: Rocca, 1986. 508 p.
- PAZ, A. Etnología del cerdo ibérico. **Revista Porci**, Madrid, n. 29, p. 11-17, 1995.
- PONZONI, R. W. Genetic resources and conservation. In: Piper, L. R.; Ruvinsky, A. **The genetic of sheep**. New York: CAB International, 1997. p. 433-466.
- PÓVOAS-JANEIRO, J. A suinicultura em Portugal. **Boletim Pecuário**. Lisboa, v. 12, n. 2, p. 25-33, 1944.
- PTAK, W. Polydactyly in wild boar. **Acta Theriologica**, Sinica, v. 7, p. 312-314, 1963.
- RAMÍREZ, O. *et al.* Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, n. 9, p. 2061-2072, 2009.
- RIEGER, R.; MICHAELIS, R.; GREEN, M. M. **Glosary of genetics**. 5th ed. Berlin: Springer Verlg, 1991. 553 p.
- REIS, J. **Suíños**: raças autóctones. Lisboa: Direcção Geral de Veterinária, 2000. 40 p.

- REVIDATTI, M. A. S. **Caracterización de cerdo crioulo do Nordeste argentino**. 2009. 241 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2009.
- ROACH, J. Earliest known ancestor of placental mammals discovered. **National Geographic News**. 2002. Disponível em: <http://www.news.nationalgeographic.com/news/2002/04/0423_020425_firstmammal.html>. Acesso em: 27 out. 2009.
- RODERO, E.; HERRERA, M. El concepto de raza. Un enfoque epistemológico. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 49, n. 185/186, p. 5-16, 2000.
- ROSELL, C.; HERRERO, J. *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. In: PALOMO, L. J.; GISBERT, J. **Atlas de los mamíferos terrestres de España**. Madrid: Dirección general de conservación de la naturaleza, 2002. p. 306-309.
- ROTHSCHILD, M. F.; RUVINSKY, A. **The genetics of pig**. Wallingford: Cabi Publishing. Cab International, 1998. 622 p.
- RUNDEL, P. W.; MONTENEGRO, G.; JAKSIC, F. M. Landscape disturbance and biodiversity in Mediterranean-type ecosystems: ecological studies/analysis and synthesis. Berlin, Springer 1998. v. 136. 447 p.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 253 p.
- SÁNCHEZ, A. G. **Zootecnia especial: etnología compendiada**. 4th ed. Córdoba: Imprenta moderna, 1960. 242 p.
- SÁNCHEZ, L.; GONZÁLEZ-CARRIL, J. A.; OTERO, M. Caracterización etnológica del cerdo celta. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 185-186, n. 185, p. 175-177, 2000.
- SERENO, J. R. B.; SERENO, F. T. P. S. Recursos genéticos animales brasileños y sus sistemas tradicionales de explotación. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 49, n. 187, p. 405-414, 2000.
- SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomía de los animales domésticos**. 4^a ed. Barcelona: Salvat Editores, 1979. p. 143-166.
- YOUNG, J. Z. **La vida de los vertebrados**. Barcelona: Omega, 1977. 660 p.

TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Manual de Zootecnia**: raças que interessam ao Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 1975. 301 p.

VIANNA, A. T. **Os suínos**: criação prática e econômica. 14. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 384 p.

VICENTE, A. P. A. **Caracterização do porco malhado de alcobaça**. 2006. 214 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2006.

VINGADA, J. *et al.* Ungulates and their management in Portugal. In: APOLLONIO, M.; ANDERSEN, R.; PUTMAN, R. J. **European Ungulates and their Management in the 21st Century**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. p. 392-418.

Capítulo 3. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE OS SUÍNOS CASCOS-DE-BURRO POR MEIO DA ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL

Resumo - Objetivaram-se caracterizar geneticamente os suínos cascos-de-burro existentes no Brasil e avaliar o nível de variabilidade genética entre suas subpopulações por meio da análise da região *D-loop* e do gene do Citocromo B. Para isso, investigaram-se 110 suínos do Brasil com fenótipo casco-de-burro, oriundos das regiões Nordeste (NE), Centro-Oeste (CO) e Sudeste (SE). Os fragmentos foram amplificados via PCR, purificados e sequenciados. Foram encontrados 13 haplótipos, sendo possível identificar 37 sítios polimórficos (35 transições, 1 transversão e 1 deleção). A diversidade haplotípica foi 0,61, enquanto a nucleotídica, 0,05. Dos 13 haplótipos encontrados, cinco apareceram na subpopulação SE, nove na NE e apenas um na CO. Quatro haplótipos foram exclusivos da subpopulação SE e oito da NE. As diversidades haplotípica e nucleotídica estimadas por subpopulação foram, respectivamente, 0,0 e 0,0 para a CO; 0,79 e 0,006 para a NE; e, para a SE, 0,56 e 0,006. A distância F_{st} entre a NE e a SE não foi significativa, no entanto ambas apresentaram distância significativa da CO. O fato de somente um haplótipo aparecer na subpopulação dessa última região pode ser reflexo não só da pureza ancestral materna desses animais mas também da diminuição drástica das populações de casco-de-burro nas últimas décadas, que pode ter eliminado outros possíveis haplótipos da região.

Palavras-chave: caracterização, marcador uniparental, diversidade genética

GENETIC DIVERSITY AMONG MULEFOOT PIGS, BASED ON MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS

Abstract – Aiming at contributing to the conservation of the native pig germplasm, the objective of this study was to genetically characterize Brazilian Mulefoot pig (*Sus scrofa* L.) populations and to evaluate the level of genetic variability among their subpopulations by mitochondrial analysis of the main noncoding region (D-loop) and of the Cytochrome B gene (MT-CYB). A total of 110 Brazilian pigs with the mulefoot phenotype from the Northeastern (46 animals), Central-Western (29 animals), and Southeastern (35 animals) regions was investigated. The studied mitochondrial DNA (mtDNA) regions were amplified by PCR, and their products were purified using the EXOSAP IT kit (USB). Sequencing was performed using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems), with the same primers used for PCR. After editing, sequences were aligned, compared with each other and with a reference sequence, and several diversity and genetic divergence indexes among the studied subpopulations were estimated. A total of 13 haplotypes was found, and 37 polymorphic sites (35 transitions, 1 transversion, and 1 deletion) were identified. As compared to the reference sequence, all detected haplotypes displayed a deletion at position 15.707. The mean diversity value of this population was 7.83 (\pm 3.67). Out of the 13 haplotypes found, five occurred in the Southeast, nine in the Northeast, and only one in the Central-West. Hence, a single haplotype was common to the three subpopulations, i.e., that present in the animals of the Central-West. Four haplotypes were exclusively found only in the subpopulation of the Southeast, and eight in the pigs of the Northeast. The mean diversities estimated per subpopulation were 0.0 (0.0), 0.004 (\pm 0.002), and 0.006 (\pm 0.003) for the Central-West, Southeast and Northeast, respectively. The F_{st} distance between the northeastern and the southeastern subpopulations was not significant, but the distance of both from the central-western subpopulation was significant. The occurrence of a single haplotype in the subpopulation of the Central-Western region may indicate the ancestral maternal purity of these animals, as well as the dramatic reduction of Mulefoot pig populations during the last decades in that region, which may have eliminated other possible haplotypes.

Keywords: characterization, uniparental marker, genetic diversity

3.1 INTRODUÇÃO

Os primeiros suínos chegados ao Brasil vieram com Martim Afonso de Souza em 1532, estabelecendo-se em São Vicente, no litoral paulista. Pertenciam às raças da Península Ibérica existentes em Portugal. Muitos escaparam pelas matas, formando grupos independentes (CAVALCANTI, 1985). Através de cruzamento, ou seja, mestiçagem, deu-se início à formação das “raças” nativas, como canastra, canastrão, caruncho, nilo, pereira, piau e pirapetinga (CAVALCANTI, 1985; VIANA, 1985).

Há também um grupo de animal no Brasil, conhecido como casco-de-burro, cuja denominação provém do fato de serem sindáctilos, ou seja, com casco fundido. Há quem aponte o Brasil como o centro de origem dos animais com esse fenótipo (SOLLERO, 2006; CASTRO, 2007), uma vez que é inexistente na Península Ibérica – aliás, não há vestígios de suíno com esse fenótipo em toda a Europa. Porém há presença documentada desses animais em vários países da América do Sul (LEMUS-FLORES *et al.*, 2001; LEMUS *et al.*, 2003; OSLINGER *et al.*, 2006; AGÜERO *et al.*, 2008) e do Norte (COBURN, 1909; AMERICAN..., 2009). Segundo DETLEFSEN e CARMICHAEL (1921), a condição de casco fendido nos suínos é produzida pelo genótipo homocigoto recessivo mm , enquanto a de casco-de-burro, pelo genótipo dominante $M_$.

Atualmente, das “raças” de suíno identificadas no Brasil, a maioria encontra-se ameaçada de extinção, e a conhecida como casco-de-burro está, segundo MARIANTE *et al.* (2003), criticamente ameaçada. Existe, entretanto, controvérsia em relação aos cascos-de-burro serem, de fato, raça, ou esse fenótipo (sindactilismo) ser apenas uma característica que pode ocorrer em qualquer raça.

Geneticamente, a espécie *Sus scrofa* já foi amplamente estudada por se tratar de uma espécie com elevado interesse econômico (GROSSI *et al.*, 2006; LUI *et al.*, 2007; SKEWES *et al.*, 2008; CAVALCANTE NETO *et al.*, 2008a; CAVALCANTE NETO *et al.*, 2008b; FERREIRA *et al.*, 2009). Para isso, contribuíram os programas “PigMap” (ARCHIBALD *et al.*, 1995) na Europa e “USDA Pig Genome” (ROTHSCHILD, 2003) nos Estados Unidos da América.

A sequência completa do DNA mitocondrial dessa espécie já se encontra documentada (URSING & ARNASON, 1998). Esse DNA tem sido estudado com o intuito de investigar linhagens muito antigas (GIUFFRA *et al.*, 2000; FANG & ANDERSSON, 2006), nos estudos evolutivos (AVISE *et al.*, 1987; MORITZ *et al.*, 1987; AVISE, 1994), filogenéticos (ALVES *et al.*, 2003; OKUMURA *et al.*, 2001) e populacionais (CLOP *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2009). Isso deve-se, em parte, ao fato de apresentar grande número de cópia por célula e de sua localização extra-nuclear, o que permite obter melhores resultados que o DNA nuclear em amostras degradadas e em amostras de difícil extração, como é o caso dos pelos, unhas e ossos (CARRACEDO *et al.*, 2000; PAKENDORF & STONEKING, 2005).

Existe, contudo, grande lacuna quanto a estudos abordando genética de população em suínos de grupo genético nativo do Brasil, como o casco-de-burro. Em face desse cenário, apontam-se como objetivos principais deste estudo caracterizar geneticamente os suínos cascos-de-burro existentes no Brasil e verificar o nível de variabilidade genética entre suas subpopulações por meio da análise mitocondrial da principal região não codificante (*D-loop*) e do gene do Citocromo B (CYT-B), na tentativa de este trabalho contribuir para a conservação desse germoplasma nativo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostras

Amostras de sangue de 110 suínos com o fenótipo casco-de-burro foram coletadas individualmente em tubos com K₃EDTA e transportadas para o laboratório. Esses animais eram oriundos da região Nordeste (estado da Paraíba, 46 animais), Centro-Oeste (estado do Mato Grosso, 29 animais) e Sudeste (estado de Minas Gerais, 35 animais) do Brasil.

3.2.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir da mancha de sangue armazenada nos cartões FTA, usando-se pequenas áreas do cartão (1-2 mm²), seguindo-se o método de extração pelo Fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

3.2.3 Amplificação dos produtos de PCR e sequenciamento

As regiões escolhidas para a análise do mtDNA foram a controle ou *D-loop* – em razão de sua alta taxa de mutação (TABERLET, 1996), a qual permite encontrar grande quantidade de polimorfismo que, possivelmente, possibilita discriminar a origem evolutiva dos animais cascos-de-burro – e a do CYT-B – pelo fato de teoricamente ser possível encontrar regiões bastante conservadas. Estas foram amplificadas usando-se iniciadores de acordo com ALVES *et al.* (2003).

As condições da reação de amplificação foram realizadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler personal[®]”, usando-se o Qiagen Taq PCR Core Kit[®], num volume total de 25 µl, contendo 0,4 µM de cada iniciador, 1x tampão com MgCl₂ (1,5 mM), 200 µM de dNTPs, Solução Q (1x), 1U de *Taq* DNA Polymerase e 1-2 µl de amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu em desnaturação a 94°C por 2 min; seguida de 30 ciclos de 2 min e 30 seg: desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 1 min; e extensão final de 72°C por 10 min.

Após amplificação, a purificação de cada amostra (5 µl) foi realizada com a enzima Exosap-It[®] (2 µl). O programa de purificação consistiu em 15 min a 57°C e 15 min a 80°C.

Após purificação, as reações de amplificação para sequenciamento foram realizadas com o ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit[®] num volume total de 10 µl, contendo 1 µM de iniciador direto, tampão de sequenciamento (0,5x), 2 µl do Kit de sequenciamento e 2 µl de amostra purificada. O programa de amplificação utilizado consistiu em 1 min a 96°C e, em seguida, 25 ciclos de 10 s a 90°C, 5 s a 55°C e 4 min a 60°C.

O produto obtido foi precipitado com 2 µl de acetato de sódio (3M com pH = 4,6) e 50 µl de etanol 95% e, após incubação à temperatura ambiente durante 20 min e

centrifugação a 14000 rpm durante 20 min, foi ressuspensão com 250 µl de etanol 70% e novamente centrifugado durante 5 min a 14000 rpm. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante e secou-se o precipitado. Em seguida, a amostra foi preparada para ser analisada em um sequenciador automático ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. Em cada aplicação, foram utilizados 25 µl de formamida desionizada. A visualização dos resultados foi efetuada com a aplicação Sequencing Analysis® 3.7 da Applied Biosystems.

3.2.4 Tratamento dos dados

As sequências geradas foram avaliadas inicialmente para qualidade maior ou igual a 20, pelo software Phred (EWING & GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), sendo que $Q = -10 \log_{10}(P_e)$, em que Q é o valor da qualidade e P_e é a probabilidade de a base ter sido nomeada erroneamente. As sequências eram aceitas com, no máximo, uma base não determinada a cada 100 sequenciadas.

Em seguida, as sequências obtidas foram alinhadas usando-se o software BIOEDIT® vs7.0.5.2 (HALL, 1999) – que emprega o algoritmo Clustal W – e comparadas entre si. Como sequência referência, utilizou-se a do mtDNA da espécie *Sus scrofa*, disponível no NCBI, GenBank AJ002189 (URSING & ARNASON, 1998).

Diversos estudos referem-se aos cuidados necessários na análise de mtDNA, de modo a definir protocolos para evitar ou minimizar os efeitos de possíveis contaminações ou erros de análise no resultado final (CARRACEDO *et al.*, 2000; BANDELT *et al.*, 2001; EDSON *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2004; BUDOWLE *et al.*, 2005; MONTEIRO, 2007). Em análise de mtDNA, os erros consequentes da verificação do processo de sequenciamento da amostra, que consistem, na maioria das vezes, em trocas de base, referências ambíguas e mutações fantasmas, são apontados como a maior causa de equívoco (BANDELT *et al.*, 2001).

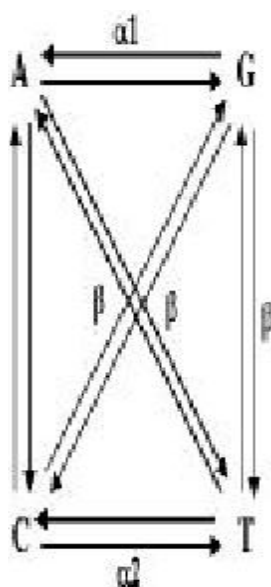
O protocolo utilizado neste trabalho para obtenção das sequências de mtDNA de suíno, de modo a tentar ultrapassar os entraves resultantes dos erros descritos, consistiu – além de as sequências serem avaliadas inicialmente para qualidade – no alinhamento e posterior revisão das sequências das amostras por duas pessoas bem

como na criação de uma lista de polimorfismo pela comparação com uma amostra referência (Acesso GenBank: AJ002189). Quando necessário, amostras foram sequenciadas nos dois sentidos, de forma a obter resultados mais concretos e a eliminar dúvidas.

3.2.5 Análise dos dados

3.2.5.1. Relações entre os haplótipos e entre as subpopulações

Os haplótipos foram obtidos por meio de contagem direta usando-se o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005). A proporção dos nucleotídeos diferentes entre os haplótipos foi estimada a partir da distância de TAMURA & NEI (1993), que é, segundo MENDÉZ (2002), uma das que mais se ajusta à realidade, uma vez que considera uma taxa mutacional diferente entre transição (α) e transversão (β), as mudanças transicionais entre as purinas (α_1) e entre as pirimidinas (α_2), já que apresentam taxas diferentes, como também pondera a frequência de cada uma das bases (Figura 1).



(Fonte: MENDÉZ, 2002)

FIGURA 1. Modelo de substituição nucleotídica de TAMURA & NEI (1993). Transição (α) e transversão (β), mudanças transicionais entre as purinas (α_1) e entre as pirimidinas (α_2)

Foi utilizado o método *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) para reconstruir as relações filogenéticas entre as subpopulações (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste). E, para reconstruir as relações entre os haplótipos encontrados para os cascos-de-burro, utilizou-se, além do método citado, o *Median Joining* (BANDELT *et al.*, 1999).

a) o método de *Neighbour-Joining*

O método de *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) considera as distâncias evolutivas entre um conjunto de sequência para reconstruir a sua história evolutiva. Tem como princípio definir unidades taxonômicas operacionais (OTUs), sendo preferida, em cada passo do algoritmo, a topologia que envolva o menor comprimento total dos ramos. Por esse método, a árvore foi construída usando-se o programa MEGA (TAMURA *et al.*, 2007), com 1.000 réplicas *bootstrap*.

b) o método *Median Joining*

As relações entre os haplótipos foram também inferidas pelo método *Median Joining* (BANDELT *et al.*, 1999). Ao contrário do anterior, as relações obtidas a partir desse método não estão limitadas ao formato árvore, permitindo, assim, que estas formem estruturas gráficas interconectadas entre si, em que cada conexão adicional representa caminhos mutacionais alternativos (igualmente parcimoniosos) de um haplótipo para outro.

Além disso, esse método é indicado para o estudo das relações entre os haplótipos intrapopulacionais, que, normalmente, apresentam distâncias genéticas reduzidas, uma vez que considera a ocorrência de recombinação, a existência de haplótipos ancestrais na população e, ainda, a pequena variação nucleotídica intrapopulacional, que os métodos “tradicionais” não conseguem contemplar (BANDELT *et al.*, 1999; CLEMENT *et al.*, 2000; POSADA & CRANDALL, 2001). Esse método combina o algoritmo de Kruskal, que seleciona árvores em que são favorecidas as conexões mais curtas, com o algoritmo heurístico de máxima parcimônia de Farris, que,

sequencialmente, adiciona-lhes novos vértices, baseados em haplótipos intermédios, de forma a reduzir o comprimento total da árvore (BANDELT *et al.*, 1999).

Foi construída uma rede de haplótipo usando-se o programa NETWORK v.4.2.0.1[®] (BANDELT *et al.*, 1999).

3.2.5.2 Medidas de diversidade genética

Como medidas de diversidade genética, foram estimadas as diversidades nucleotídica (π) e haplotípica (h). Esta resulta de uma função entre o número de haplótipo existente na população e das suas frequências (NEI & TAJIMA, 1981), enquanto aquela pode ser calculada a partir da divisão da proporção média de diferença nucleotídica entre os pares de sequência (K) pelo comprimento total da sequência analisada (NEI, 1987).

Assim, para a população de casco-de-burro e para as suas subpopulações (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste), foram estimadas as diversidades nucleotídica (π) e haplotípica (h) assim como como o número médio de diferença nucleotídica (K), usando-se o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

3.2.5.3 Medidas de divergência genética

Para verificar se, de fato, existem possíveis subpopulações na população casco-de-burro, foram utilizadas, além dos métodos filogenéticos citados, duas medidas de divergência genética, numa tentativa de averiguar a possível existência de estruturação entre as subpopulações. Assim, foi calculado o valor de divergência nucleotídica entre as subpopulações, por meio da estimativa do número de diferença nucleotídica que ocorre entre elas (D_A). Essa medida incorpora informações tanto das frequências haplotípicas quanto das diferenças nucleotídicas entre os haplótipos, fornecendo o nível de distância genética entre as subpopulações, podendo ser estimada por NEI & LI (1979):

$$D_A = \pi_{xy} - \frac{\pi_x + \pi_y}{2}$$

Em que:

π_{xy} = número médio de substituição nucleotídica por local nucleotídico entre as populações x e y;

π_x e π_y = número médio de substituição nucleotídica por local nucleotídico intrapopulação.

Esse cálculo foi realizado considerando-se a distância de TAMURA & NEI (1993), com uma correção gama de 0,05, por meio da utilização do programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Outro método estatístico utilizado neste estudo para avaliar o grau de divergência genética entre as subpopulações definidas foi a estimativa do parâmetro F_{ST} (WRIGHT, 1951), que, através da combinação de várias medidas de heterozigose a diferentes níveis (indivíduos, subpopulações e população total), permite uma descrição detalhada da estrutura populacional (HARTL & CLARK, 2007). Esse parâmetro foi calculado usando-se também o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005), por meio de 1.023 permutações paramétricas dos haplótipos entre as subpopulações.

3.2.5.4 Testes de Neutralidade

Para testar se o polimorfismo observado nas regiões do mtDNA estudadas é consistente com o modelo de evolução neutra, foram estimadas as estatísticas D (TAJIMA, 1989) e F_s (FU, 1997). Esses testes indicam se a seleção e/ou processos demográficos são fatores a se considerar como explicação das frequências haplotípicas observadas por oposição à deriva genética e à seletividade neutra.

A medida D (TAJIMA, 1989) é baseada no modelo de número infinito de sítio (ISM) e, para testar a hipótese nula de seletividade neutra e população em equilíbrio, compara dois parâmetros de Θ (medida de diferenciação genética, baseada nos polimorfismos entre as sequências), através da fórmula:

$$D = \frac{\theta_k - \theta_s}{Var(\theta_k - \theta_s)}$$

Em que:

k = número médio de diferença nucleotídica entre os pares de sequência; e

s = número de polimorfismo nucleotídico observado na amostra.

Por sua vez, o teste Fs (FU, 1997), tal como o teste de D (TAJIMA, 1989), baseia-se na teoria do número infinito de sítio (ISM), para avaliar a probabilidade de existir uma amostra neutra com o número de alelo igual ou inferior ao observado, dado o número de diferença entre duas sequências (S'). Essa estimativa pode ser obtida através da fórmula:

$$F_S = \left(\frac{S'}{1 - S'} \right)$$

Essas estatísticas de seletividade neutra foram calculadas através de 1.000 simulações usando-se o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) de 1.632 pb revelaram 13 haplótipos nos 110 animais cascos-de-burro estudados (Tabela 1). Dos haplótipos encontrados, destaca-se o H1 por aparecer em 63,6% dos animais cascos-de-burro.

Dos treze haplótipos aqui encontrados, 10 já se encontram catalogados no NCBI, e o que apareceu com maior frequência (H₁) na população foi primeiramente registrado como da raça ibérica da Espanha (Acesso AY237514), encontrado por ALVES *et al.* (2003).

Esse resultado corrobora dados históricos que afirmam que muitos dos animais domésticos, como o suíno, foram trazidos para o Brasil pelos portugueses e pelos espanhóis (CAVALCANTI, 1985; VIANA, 1985). Associado a isso, de fato, não há registros paleontólogos que mostrem a presença dessas espécies domésticas, como a

suína, na América do Sul antes da chegada dos colonizadores europeus. Dados históricos afirmam ainda que as raças nativas de suíno do Brasil descendem das da Península Ibérica (CAVALCANTI, 1985; VIANA, 1985), o que foi recentemente confirmado (GROSSI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009). SOUZA *et al.* (2009) também encontraram o mesmo CYT-B desse haplótipo em duas raças brasileiras, na nilo (Acesso EU586524) e na piau (Acesso EU586526).

Encontraram-se 37 diferenças nucleotídicas (SNP) na região do mtDNA estudada entre os haplótipos dos cascos-de-burro (Tabela 1). Dessas posições variáveis, 35 compreenderam mutações pontuais do tipo transição, que é a via mais comum de evolução mitocondrial nos mamíferos (VIGILANT *et al.*, 1991). Somente um sítio apresentou substituição do tipo transversão (posição 15.558), e foi observada uma deleção (posição 15.571) entre os haplótipos dos cascos-de-burro (Tabela 1), o que corrobora diversos estudos, os quais, baseados em análise de DNA mitocondrial humano e animal, concluíram que as transições ocorrem muito mais frequentemente que as transversões (HOELZEL *et al.*, 1991; MEYER *et al.*, 1999).

Em relação à sequência referência (GenBank AJ002189), foi observado apenas um SNP a mais nos haplótipos dos cascos-de-burro, sendo que todos apresentaram uma deleção na posição 15.707, totalizando 38 sítios polimórficos (Tabela 1).

Na Tabela 2, encontra-se a distribuição numérica dos haplótipos do mtDNA entre os animais cascos-de-burro por subpopulação.

Como se observa na Tabela 2, o H₁, haplótipo que apareceu com mais frequência na população, foi o único na subpopulação do Centro-Oeste, sendo também o mais frequente nas demais subpopulações. Em seguida, na do Nordeste, vem o H₉, tendo sido exclusivo dessa subpopulação, assim como os H₆, H₇, H₈, H₁₀, H₁₁, H₁₂ e H₁₃ (Tabela 2). A subpopulação do Sudeste também apresentou haplótipos exclusivos, o H₂, H₃, H₄ e H₅. Somente o H₁ foi comum a todas as subpopulações (Tabela 2).

Tabela 2. Distribuição numérica dos haplótipos do *mtDNA* entre os suínos cascos-de-burro por subpopulação

Haplótipo	Subpopulação			Total* (n= 110)
	Centro-Oeste (n=29)	Sudeste (n=35)	Nordeste (n=46)	
H ₁	29	24	17	70
H ₂	-	02	-	02
H ₃	-	01	-	01
H ₄	-	05	-	05
H ₅	-	03	-	03
H ₆	-	-	02	02
H ₇	-	-	01	01
H ₈	-	-	04	04
H ₉	-	-	12	12
H ₁₀	-	-	05	05
H ₁₁	-	-	03	03
H ₁₂	-	-	01	01
H ₁₃	-	-	01	01
Total de haplótipo ⁺	01	05	09	

n = tamanho da amostra; *frequência total do haplótipo na população; ⁺total de haplótipo por subpopulação.

O H₉ está presente em animais da raça ibérica (ALVES *et al.*, 2003), *landrace* (LIN *et al.*, 1999), *duroc* (Acesso Genbank: FJ236997.1) como também em *Javalis europeus* (Acessos Genbank: FJ237003, FJ237002, FJ237001, FJ237000). Contudo, mesmo sendo o segundo haplótipo mais frequente na população casco-de-burro, sua

frequência nessa população foi relativamente baixa (10,1%) e limitada a uma única subpopulação (Nordeste).

Está bem documentado que os porcos ibéricos contribuíram para o desenvolvimento da raça *duroc* (JONES, 1998). Os resultados do estudo de ALVES *et al.* (2003) são consistentes com aquilo, uma vez que a comparação das sequências mtDNA determinadas nos porcos de raça ibérica e *duroc* mostrou dois haplótipos compartilhados – sendo um deles o H₉, encontrado no presente trabalho –, indicando que há duas matrilineas que contribuíram na formação de ambas as raças.

Como sabido, tanto a raça *duroc* quanto a *landrace* foram introduzidas no Brasil para fins de aumento de produção, e muitos criadores de raça nativa utilizaram-nas em cruzamentos no intuito de melhorar a produção dos seus animais.

A *duroc* foi a primeira raça a ser introduzida no país e, portanto, a que iniciou o melhoramento e a tecnificação da suinocultura brasileira, sendo registrada, no *Pig Book Brasileiro*, a partir do ano de 1958 (LARRAMBEBERE & COSTA, 1983). A rusticidade e a fácil adaptação a todas as regiões do país fizeram com que seu uso em cruzamentos industriais propiciasse uma melhoria na qualidade da carne das raças nativas como também das brancas.

A raça *landrace* vem sendo aperfeiçoada pelos dinamarqueses há mais de um século, visando a excelentes qualidades criatórias, além de uma conformação ideal para a produção de carne magra (TORRES & JARDIM, 1975). Como nenhum país, até então, havia conseguido resultados semelhantes com suas raças, passaram a introduzi-la, quer para a formação de novas raças quer para melhorar as raças locais para carne magra.

A existência de haplótipo de origem asiática na população casco-de-burro (H₃, H₅, H₆, H₈ e H₁₁) parece ser, devido às baixas frequências observadas (0,9%, 2,72%, 1,81%, 3,63% e 2,72% respectivamente), residual, possivelmente oriunda das atuais fêmeas de produção industrial, que possuem raças chinesas na sua composição genética. Entretanto a existência de importantes rotas comerciais dos portugueses (a partir de Macau para o Brasil) e dos espanhóis (entre as Filipinas e o México), ligando a Europa, a Ásia e a América, pode fornecer um quadro histórico para uma antiga

herança asiática nos cascos-de-burro desde, possivelmente, o início de sua formação. Nesse sentido, no Brasil, no período colonial, foi introduzida uma raça asiática chamada macau, que se acredita que possa ter influência na formação dos grupos genéticos nativos.

Esse resultado sugere, contudo, uma pequena participação materna das raças de origem asiática na população casco-de-burro do Brasil, sendo esses resultados consistentes com os de SOUZA *et al.* (2009), que também a encontraram em outras populações de suíno de raça nativa do Brasil.

Como já dito, os indivíduos analisados agruparam-se em 13 haplótipos. Como consequência, a diversidade haplotípica foi $0,61 \pm 0,003$, enquanto a nucleotídica, $0,05 \pm 0,002$ (Tabela 3).

Tabela 3. Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π) assim como o número médio de diferença nucleotídica (K) estimados a partir de 1.663 pb do mtDNA por subpopulação de suíno casco-de-burro

Subpopulação	N	Nº de haplótipo	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica	K
Centro-Oeste	29	01	0,0	0,0	0,0
Nordeste	46	09	$0,79 \pm 0,001$	$0,006 \pm 0,003$	10,9
Sudeste	35	05	$0,56 \pm 0,09$	$0,004 \pm 0,002$	7,29
Total	110	13	$0,61 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,002$	7,7

N= quantidade de animal utilizada

Apesar de ser apresentada a estimativa de diversidade haplotípica, é sugerida a utilização da diversidade nucleotídica como estimativa da variação entre população (subpopulação) (MONTEIRO, 2007), uma vez que alguns estudos referem que, quando a diversidade genética é estimada entre população, a medida de diversidade nucleotídica é mais informativa que a haplotípica, uma vez que fornece informação sobre as diferenças nucleotídicas entre sequência de DNA, enquanto a diversidade haplotípica apenas indica se duas sequências são ou não idênticas (NEI & LI, 1979; TAJIMA, 1983). Mas, para ambas as diversidades estimadas, a subpopulação de

casco-de-burro do Centro-Oeste apresentou valor 0,0 (Tabela 3), visto só ter sido encontrado um único haplótipo nessa região. Isso pode ser reflexo da pureza ancestral materna desses animais como também reflexo da diminuição drástica das populações de casco-de-burro nas últimas décadas, indicando que essa pode ter possivelmente eliminado outros haplótipos daquela região.

É possível verificar que a subpopulação de casco-de-burro da região Nordeste apresentou maior diversidade haplotípica (Tabela 3), resultado do maior número de haplótipo encontrado nessa população.

A distância F_{st} entre as subpopulações da região Nordeste e da Sudeste não foi significativa, no entanto ambas apresentaram distância significativa da Centro-Oeste (Tabela 4). Esse índice de diferenciação genética mostra que as subpopulações Sudeste e Nordeste não podem ser consideradas distintas, pois são homogêneas.

Tabela 4. Distâncias genéticas entre as subpopulações de suíno casco-de-burro. Valores de distância F_{st} estão abaixo da diagonal, e os valores de divergência nucleotídica (DA) acima

Subpopulação	Nordeste	Sudeste	Centro-Oeste
Nordeste	-	0,41	1,84
Sudeste	0,02 ^{ns}	-	0,49
Centro-Oeste	0,18 ^{**}	0,10 [*]	-

As estimativas de divergência nucleotídica entre os cascos-de-burro (Tabela 4) e a árvore *Neighbour-Joining* derivada destas (Figura 2) mostram que as subpopulações Nordeste e Sudeste estão mais próximas. Todavia, em relação à Centro-Oeste, a Sudeste está mais próxima que a Nordeste, resultado semelhante ao obtido pela estatística F_{st} (Tabela 4).

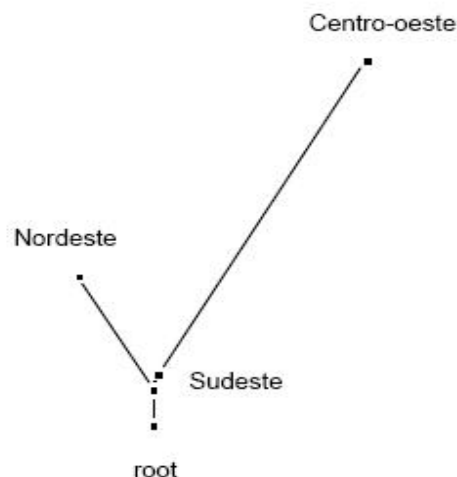


Figura 2. Dendrograma *Neighbour-Joining* para as três subpopulações de suíno casco-de-burro, baseado nos valores de divergência nucleotídica (DA)

Na Figura 3, apresenta-se o dendrograma construído pelo método *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) para os 13 haplótipos encontrados nos cascos-de-burro.

As relações entre os 13 haplótipos (Figura 3) mostram dois grandes grupos: um formado pelos haplótipos H₃, H₆, H₈, H₁₁ e H₁₅, e o outro formado pelos demais. Como foi observado, apenas o H₁ apareceu em todas as subpopulações (Tabela 2) e os demais foram exclusivos da Nordeste e da Sudeste. Entretanto, de acordo com a Figura 4, os haplótipos exclusivos de cada subpopulação não se agruparam, necessariamente, em clusters distintos, ou seja, no grupo 1 (H₃, H₆, H₈, H₁₁ e H₅), há haplótipos tanto da subpopulação Centro-Oeste (H₆, H₈, H₁₁) quanto da Sudeste (H₃, H₅).

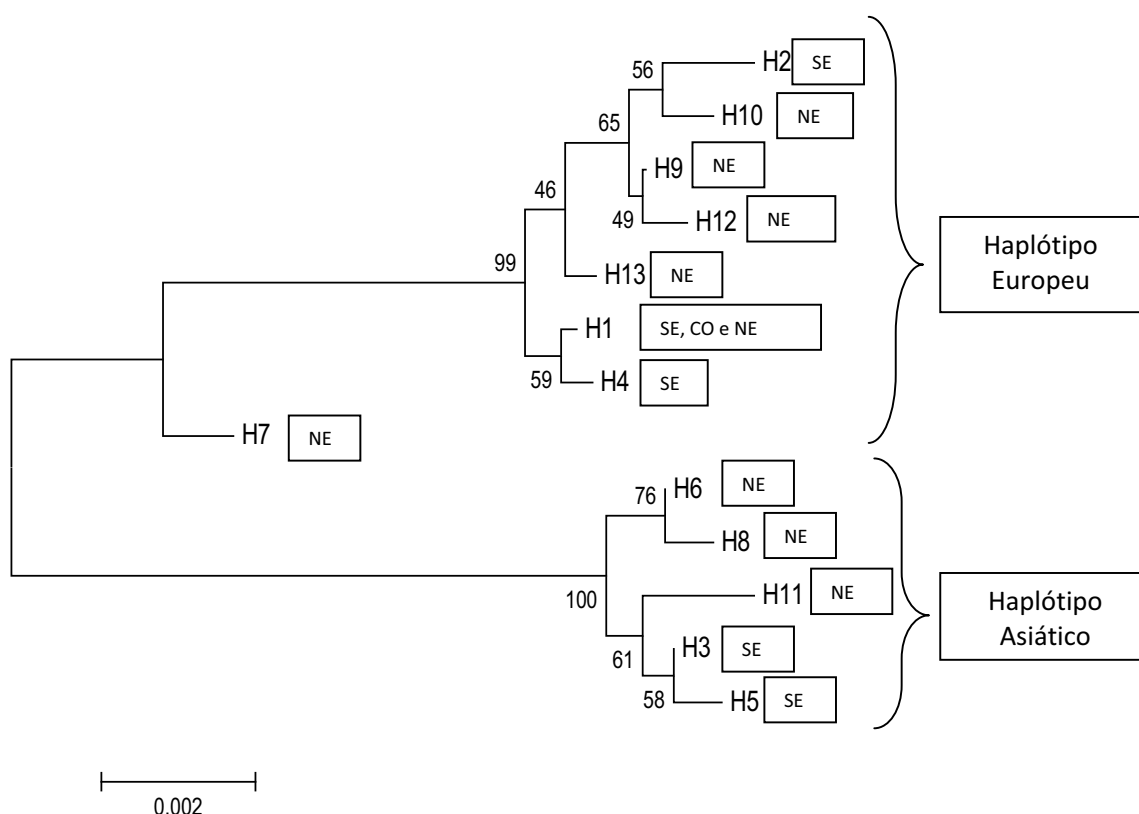


Figura 3. Dendrograma para os 13 haplótipos dos cascos-de-burro. Os números nas bifurcações correspondem às porcentagens sobre 1000 replicações *bootstrap*. A população a qual o haplótipo pertence está denominada de SE (Sudeste), NE (Nordeste) e CO (Centro-Oeste).

Os dois agrupamentos formados mostram, claramente, a diferenciação entre haplótipos europeus e asiáticos, ou seja, na população de casco-de-burro estudada, aparecem tanto haplótipos de origem europeia (H₁, H₂, H₄, H₇, H₉, H₁₀, H₁₂ e H₁₃) quanto asiática (H₃, H₅, H₆, H₈ e H₁₁). SOUZA *et al.* (2009), trabalhando com diversas raças de suíno nativo, encontraram 15 haplótipos diferentes, dos quais onze eram de origem europeia e quatro, asiática.

Como se pode observar ainda, os haplótipos europeus subdividiram-se em dois clados, em que sozinho compo o primeiro ficou o H7. O segundo se subdividiu ainda em outros dois, H₁ e H₄, sozinhos em um, e os demais no outro. Essas subdivisões podem demonstrar possivelmente eventos diferentes de domesticação,

mostrando que, embora não tenha havido domesticação de suíno no Brasil, os cascos-de-burro possivelmente descendem de matrilineas de diferentes eventos de domesticação de suíno na Europa.

A classificação dos haplótipos em europeu ou em asiático pode ser feita com base em quatro SNP, localizados nas posições 15.036, 15.038, 15.041 e 15.045 pb do mtDNA, que estão localizados no CYT-B (Tabela 1). Os haplótipos E1 (TGCG) e E2 (TGTG) são europeus, enquanto o A1 (CATA) e A2 (CATG) têm origem asiática (GIUFFRA *et al.*, 2000; JONES, 1998; CLOP *et al.*, 2004). Assim, de acordo com a Tabela 1, verifica-se que a população casco-de-burro apresentou oito haplótipos europeus e cinco asiáticos, o que aparece bem definido na Figura 3. Ressalta-se que, nessa população, só foram observados um dos tipos dos haplótipos europeus (TGCG) e um dos asiáticos (CATA).

Estudos realizados confirmam a existência de três grandes grupos de porco selvagem e doméstico: um grupo asiático (A), constituído por inúmeras raças domésticas e javalis asiáticos, e dois grupos europeus, EI e EII (GIUFFRA *et al.*, 2000; KIJAS & ANDERSSON, 2001). O grupo EI engloba as raças domésticas e os javalis europeus, com exceção dos italianos, que formam o segundo grupo europeu, EII. Esses resultados apontam para um cenário de domesticação independente no Oriente Próximo e na Ásia. De acordo com ALVES *et al.* (2003), as raças domésticas e os javalis espanhóis fazem parte do principal grupo europeu, EI (TGCG), igualmente ao encontrado neste trabalho para os cascos-de-burro.

A prevalência de CYT-B e D-loop europeu e asiático foi estudada previamente nas principais raças comerciais utilizadas na Europa, como *large white*, *landrace* e *duroc* (GIUFFRA *et al.*, 2000; OKUMURA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002). Esses estudos demonstraram que muitos desses padrões raciais apresentaram introgressão de haplótipo asiático, o que comprova as evidências históricas de que muitas raças chinesas foram importadas para a Inglaterra entre 1770 e 1860 e introduzidas nas populações inglesas de suíno, influenciando o desenvolvimento das raças *landrace*, *berkshire*, *small white* e *middle white* (JONES, 1998).

Associado a isso, EPSTEIN & BICHARD (1984) sugeriram que os porcos asiáticos que contribuíram para o desenvolvimento das raças dos porcos ingleses tenham sido importados não da China nem da Indo-China diretamente, mas através de Nápoles e de Portugal em 1770-80. Por isso, provavelmente, haplótipos de origem asiática foram também observados em raças da península ibérica (ALVES *et al.*, 2003; FANG & ANDERSON, 2006), evidenciando a introgressão de alelo das raças asiáticas nessa península.

Um importante marco na história das raças suínas europeias foi justamente a introgressão de alelo asiático nas populações suínas britânicas durante os séculos XVIII e XIX. Essa influência confirma a expansão das matrilineas asiáticas, certamente em virtude principalmente da raça *meishan*. As raças chinesas sempre foram mundialmente conhecidas pela alta prolificidade, sendo utilizadas para cruzamentos, e, recentemente, seu mapeamento genético para identificação dos alelos ligados à prolificidade e a possibilidade de transferi-los para outras raças tornam de grande importância essa raça.

Na Figura 4, apresenta-se a Rede *Median Joining* entre os haplótipos da população casco-de-burro. Nota-se que o haplótipo H₄ apresenta apenas uma mutação em relação ao H₁, que foi o que apresentou a maior frequência. Isso sugere que esse haplótipo (H₄) pode ter se diferenciado do H₁ recentemente, sendo, possivelmente, oriundo de uma mesma matrilinea. Do lado direito do H₄, vêm os outros haplótipos europeus, por isso uma menor diferença nucleotídica entre eles, ao passo que, do lado esquerdo, após o H₇, estão os de origem asiática. O H₇, mesmo sendo europeu, tem nove SNP em relação ao H₄ e 10 em relação ao H₁.

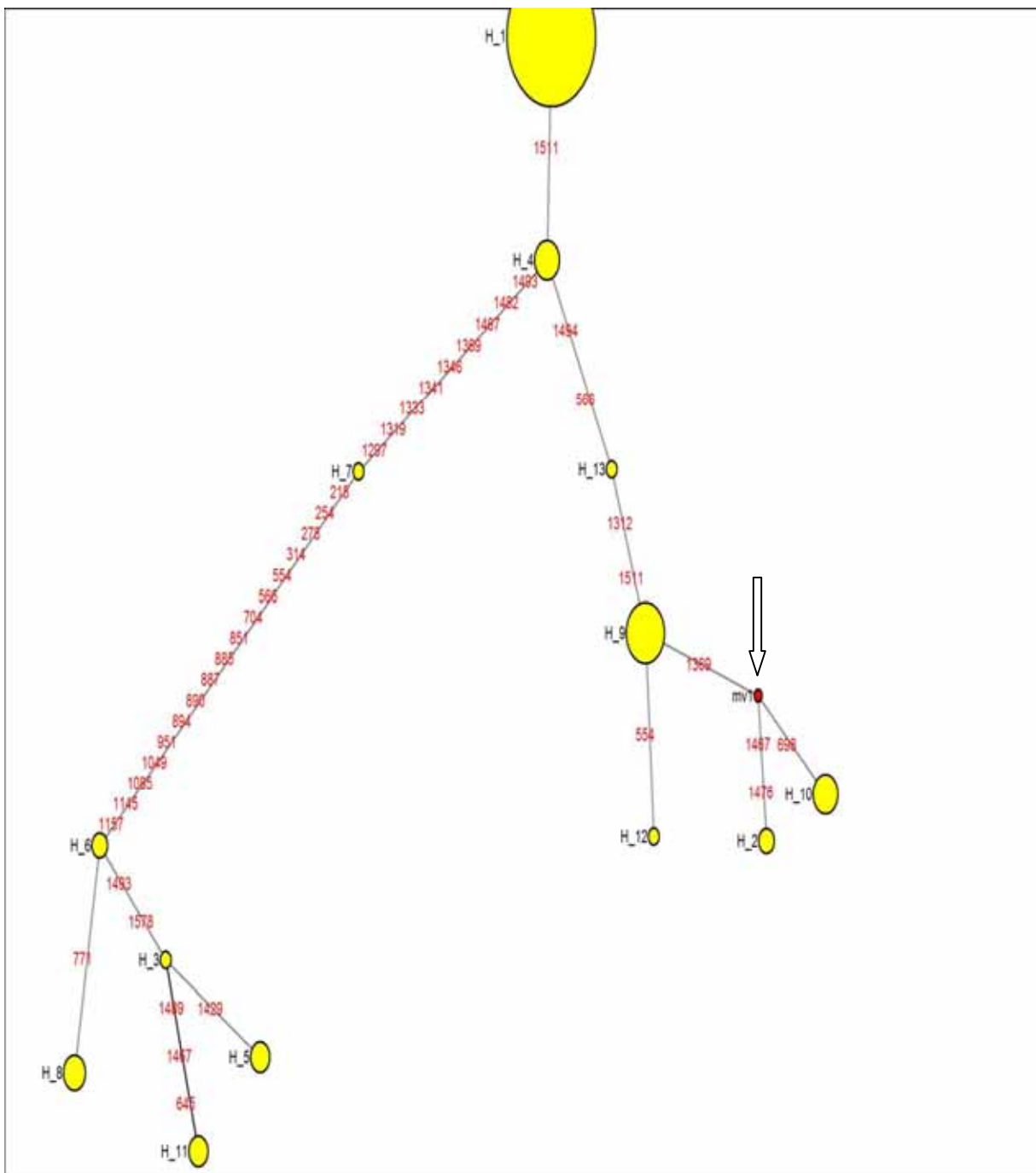


Figura 4. Rede *Median Joining* entre os haplótipos da população casco-de-burro. O tamanho do círculo é proporcional ao número de indivíduo que apresenta o respectivo haplótipo. Os números entre um haplótipo e outro representa o número de mutação entre haplótipo (ex.: entre o haplótipo H₁ e H₄, há uma mutação na posição 1.511 da sequência de 1.632 pb estudada). A seta aponta um nó teórico intermediário (mv1), introduzido pelo algoritmo executado

Na Figura 5, apresenta-se o dendrograma *Neighbour-joining*, baseado em índice de substituição nucleotídica por sítio, estimada por meio da distância de TAMURA & NEI (1993), entre os haplótipos dos cascos-de-burro e os de outros grupos genéticos nativos do Brasil, publicados por SOUZA *et al.* (2009).

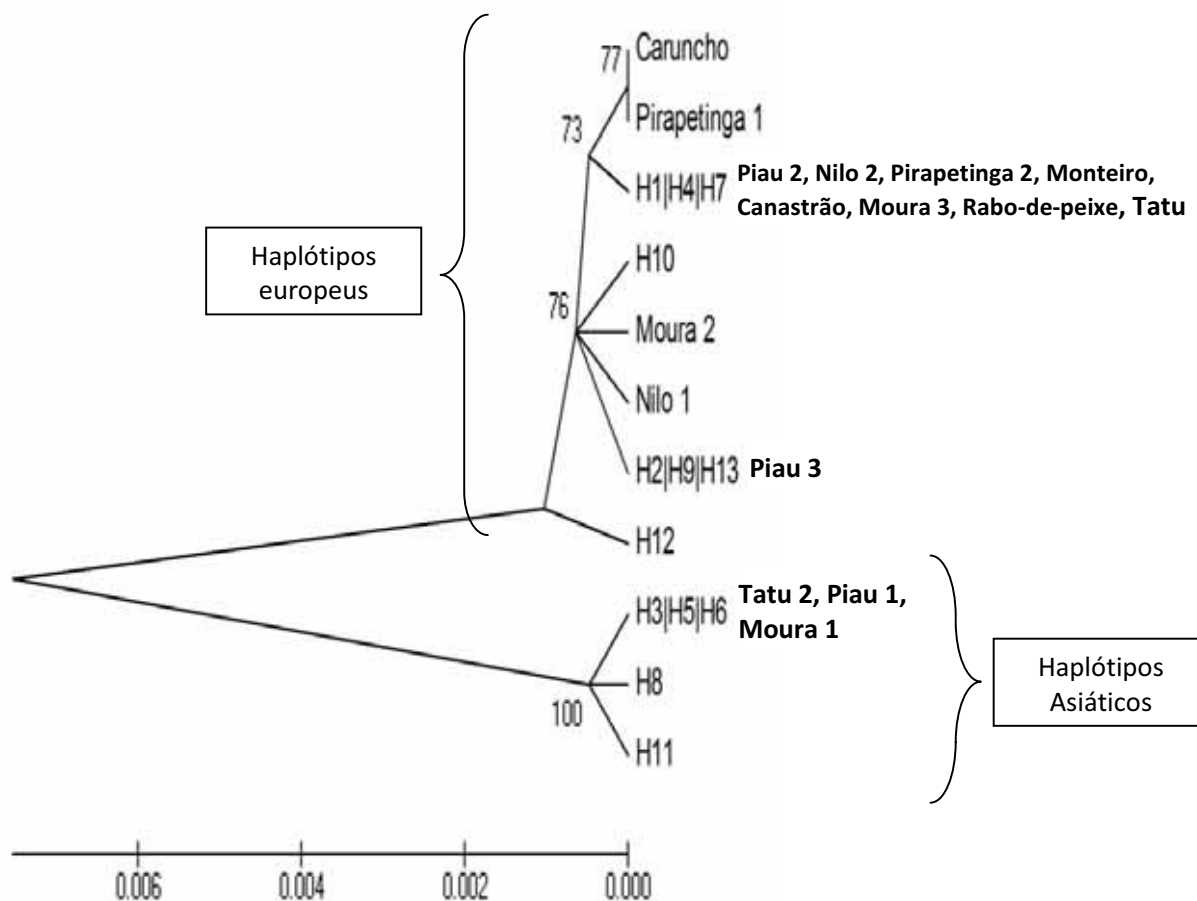


Figura 5. Dendrograma *Neighbour-joining*, baseado em índice de substituição nucleotídica por sítio, estimado por meio da distância de TAMURA & NEI (1993), entre os haplótipos do CYT-B dos cascos-de-burro (H₁, H₂, H₃,..., H₁₃) e os de outros grupos genéticos nativos do Brasil, publicados por SOUZA *et al.* (2009).

As sequências publicadas por SOUZA *et al.* (2009) referem-se à região do CYT-B, por isso utilizou-se, nesse dendrograma (Figura 5), somente a região do CYT-B dos

haplótipos dos cascos-de-burro (Tabela 1), de modo a ser possível apresentar essa relação. Como se observa, considerando-se somente o CYT-B, os cascos-de-burro apresentaram apenas sete haplótipos, devido ao fato de os outros haplótipos se diferenciarem apenas na região *D-loop*, como o H₁, H₄ e H₇, que, agora, são iguais (Figura 5). O mesmo ocorreu com H₂, H₉ e H₁₃ e com H₃, H₅ e H₆.

Como foi referido, o H₁ foi o mais frequente na população casco-de-burro (Tabela 2). Quando se considerou apenas a região do CYT-B, aquele haplótipo foi igual ao H₄ e H₇, mostrando duas conclusões. A primeira é que esses haplótipos podem vir de uma mesma matrilinea, visto que as diferenças nucleotídicas, além de poucas, ocorrem na região *D-loop*, que apresenta alta taxa de mutação. A segunda é que sua frequência aumenta, visto que agora são 76 animais que apresentam o mesmo haplótipo, mostrando que possivelmente poucas matrilineas contribuíram de forma direta na formação dos cascos-de-burro.

Esse haplótipo, no entanto, não é exclusivo dos cascos-de-burro, outros grupos genéticos nativos do Brasil também o apresentam, como pode ser observado na Figura 5. Isso mostra que essa matrilinea foi a que, possivelmente, mais contribuiu com a formação dos grupos genéticos nativos do Brasil.

O DNA mitocondrial tem sido vastamente utilizado em estudos de genética populacional, filogeografia e filogenia, assumindo-se que as frequências haplotípicas devem-se, principalmente, à migração, e que a maioria da variação intraespecífica é seletivamente neutra, sendo o DNA mitocondrial considerado um marcador neutro (BALLARD & RAND, 2005). Nesse sentido, alguns trabalhos, mesmo com animais domésticos (FANG & ANDERSSON, 2006; EGITO, 2007), aplicaram o teste de neutralidade. Com esse teste, objetiva-se verificar se a seleção e/ou processos demográficos são fatores a se considerar como explicação das frequências haplotípicas observadas por oposição à deriva genética e à seletividade neutra.

Assim, na Tabela 5, apresentam-se os resultados obtidos para o teste D (TAJIMA, 1989) e Fs (FU, 1997).

Tabela 5. Testes de neutralidade D e F_s nas subpopulações de suíno casco-de-burro

Subpopulação	D	F_s
Nordeste	1,40 ^{ns}	8,59 ^{ns}
Sudeste	-0.21 ^{ns}	8,74 ^{ns}
Centro-Oeste*	—	—
Total	0,3 ^{ns}	5,13 ^{ns}

*Não é possível aplicar o teste em população que não apresente polimorfismo

A subpopulação de casco-de-burro do Centro-Oeste apresentou um único haplótipo, por isso não foi possível aplicar esses testes. A subpopulação do Sudeste do Brasil apresentou, para o Teste D, valor negativo, mas não significativo, enquanto a do Nordeste também apresentou não significativo, mas positivo (Tabela 5). Quando uma população está evoluindo com base na teoria da evolução neutra, ou seja, em equilíbrio, segundo TAJIMA (1989), o valor de D é igual ou muito próximo de zero. Segundo HARTL & CLARK (2007), valores significativos negativos de D podem evidenciar uma população em crescimento, uma vez que o aumento da variação ocorre primeiro em alelo raro, o que mais rapidamente afetará o valor de S' ($F_s = S'/1-S'$). A população também pode, no entanto, divergir do esperado com valores positivos significativamente, mostrando que passou por períodos de perda de diversidade.

Valores negativos estatisticamente significativos também podem ser obtidos se houve seleção desfavorável sobre haplótipo raro; enquanto os valores positivos estatisticamente significativos também podem ser obtidos se houve seleção favorável de alguns haplótipos mais frequentes (MONTEIRO, 2007). Atualmente, não é possível distinguir entre o efeito demográfico e o de seleção quando em presença de valores estatisticamente significativos.

A estatística F_s tende a apresentar valor negativo, o que não ocorreu nas subpopulações do Nordeste e do Sudeste (Tabela 5), quando existe excesso de mutação recente e, conseqüentemente, de alelo (haplótipo) raro, sendo considerado contra a neutralidade das mutações se o valor negativo for muito elevado (FU, 1997).

Valor significativo de F_s pode indicar que diversos processos, como crescimento efetivo populacional ou “carona” genética, ocorreram no passado (FU, 1997).

3.4 CONCLUSÕES

As relações filogenéticas entre os haplótipos encontrados definem um padrão claro de relação devido aos altos valores de suporte dos nós (*bootstrap*). O haplótipo H₁ parece ser, claramente, o mais ancestral devido, primeiro, ao fato de ser de origem ibérica e, segundo, por ser o mais frequente em todas as subpopulações estudadas e o único comum a todas.

Os resultados de diversidade haplotípica e nucleotídica, a distância genética e a árvore gênica tornaram evidente a diversidade genética da população de suíno casco-de-burro, salientando a presença de dois cladogramas (europeu e asiático) de linhagens maternas distintas, convivendo no mesmo local.

Os cascos-de-burro apresentaram vários haplótipos que foram comuns a outros grupos genéticos nativos do Brasil, demonstrando descenderem de mesma matrilinea.

Baseado nos resultados observados neste estudo, é possível verificar a existência de um *pool* genético altamente diverso no que se refere à diversidade do DNA de origem materna, consistente com a história da suinocultura brasileira. As diversas introduções de animais de diferentes origens favoreceram proliferação e expansão dos diferentes haplótipos encontrados. Portanto os cascos-de-burro do Brasil possuem um reservatório importante e vasto para o futuro da suinocultura mundial.

3.5 REFERÊNCIAS

AGÜERO, L. M. *et al.* La presencia de pata de mula y mamellas en cerdos criollo cubano del centro genético “San Pedro”. **Revista Computadorizada de Producción Porcina**, Havana, v. 15, n. 1, p. 57-59, 2008.

ALVES, E. *et al.* Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 319-324, 2003.

AMERICAN MULAFOOT HOG ASSOCIATION. **Mulefoot hog**. 2009. Disponível em: <<http://www.mulefootpigs.tripod.com>>. Acesso em: 20 jan. 2009.

ARCHIBALD A. L. *et al.* The PiGMAP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). **Mammalian Genome**, New York, v. 6, n. 3, p. 157-175, 1995.

AVISE, J. C. *et al.* Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 541 p.

BALLARD, J. W. O.; RAND, D. M. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 621-42, 2005.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BANDELT, H. J.; LAHERMO, P.; RICHARDS, M. Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 115, n. 2, p. 64-69, 2001.

BUDOWLE, B. *et al.* Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 119, n. 5, p. 295-302, 2005.

CARRACEDO, A. *et al.* DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 79-85, 2000.

CASTRO, G. Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, supl. 1, p. 783-788, 2007.

CAVALCANTI, S. S. **Produção de suínos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 453 p.

CAVALCANTE NETO, A. *et al.* Efeitos genéticos e ambientais sobre a idade à primeira concepção de fêmeas suínas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 499-502, 2008a.

CAVALCANTE NETO, A. *et al.* Efeitos genéticos e ambientais sobre o intervalo de parto de fêmeas suínas no Sudeste do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n.1, p. 280-285, 2008b.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.

CLOP, A. *et al.* Estimating the frequency of Asian cytochrome B haplotypes in standard European and local Spanish pig breeds. **Genetics Selection and Evolution**, London, v. 36, n. 1, p. 97-104, 2004.

COBURN, F. D. **Swine in America**: A textbook for the breeder, feeder and student. New York: Orange Judd Company, 1909. 676 p.

DETLEFSEN, J. A.; CARMICHAEL, W. J. Inheritance of syndactylism, black and dilution in swine. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, p. 595-604, 1921.

EDSON, S. *et al.* Naming the dead - Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. **Forensic Science Review**, Birmingham, v. 16, n. 1, p. 63-90, 2004.

EGITO, A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial**: subsídios para a conservação. 2007. 230 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

EPSTEIN, H.; BICHARD, M. Pig. In: MASON, I. L. **Evolution of domesticated animals**, London: Longman, 1984. p. 145-162.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 186-94, 1998.

EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Anckland, v. 1, p. 47-50, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

FANG, M.; ANDERSSON, L. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 273, n. 1525, p. 1803-1810, 2006.

FERREIRA, E. *et al.* Genetic structure of the wild boar population in Portugal: evidence of a recent bottleneck. **Mammalian Biology**, Jena, v. 74, n. 4, p. 274-285, 2009.

FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, Bethesda, v. 147, n. 2, p. 915-925, 1997.

GIUFFRÀ, E. *et al.* The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, Bethesda, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GROSSI, S. F. *et al.* Genetic diversity in wild (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 4, p. 564-568, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Principles of population genetics. 4rd. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2007. 565 p.

HOELZEL, A. R.; HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Evolution of the cetacean mitochondrial D-Loop region. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 8, n. 4, p. 475-493, 1991.

JONES, G. F. Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin. In: ROTHSCHILD M. F.; RUVINSKY, A. (Ed.). **The Genetics of the Pig**. New York: Wellingford, CAB International, 1998. p. 17-50.

KIJAS, J. M. H.; ANDERSSON, L. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 52, n. 3, p. 302-308, 2001.

KIM, K. I. *et al.* Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. **Animal Genetics**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 19-25, 2002.

LARRAMBEBERE, W. H. S.; COSTA, C. N. Estrutura genética da raça de suínos Duroc do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 7, p. 811-818, 1983.

LEMUS-FLORES, C. *et al.* Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 79, n. 12, p. 3021-3026, 2001.

LEMUS, C.; ALONSO, M. R.; ALONSO, M. Morphological characteristics in Mexican native pigs. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 197, p. 105-108, 2003.

LIN, C. S. *et al.* Complete nucleotide sequence of pig (*Sus scrofa*) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. **Gene**, Amsterdam, v. 236, n. 1, p. 107-114, 1999.

LUI, J. F. *et al.* Lipídeo, proteína e colesterol na carne de javalis (*Sus scrofa scrofa*) de diferentes grupos genéticos. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, n. 216, p. 951-954, 2007.

MARIANTE A. S. *et al.* Pig biodiversity in Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 198, p. 245-248, 2003.

MEYER, S.; WEISS, G.; HAESELER, A. V. Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. **Genetics**, Bethesda, v. 152, n. 3, p. 1103-1110, 1999.

MENDÉZ, J. A. A. **Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas em risco de extinción**. 2002. 212 f. Tese (Doutorado em Produção animal) – Universidade de Barcelona, Barcelona, 2002.

MONTEIRO, S. R. S. **Estudo genético de golfinho comum, *Delphinus delphis*, na Costa Centro/Norte de Portugal**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

MORITZ, C.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. Evolution of animal mitochondrial DNA. Relevance for population biology and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo alto, v. 18, p. 269-292, 1987.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v.97, n. 1, p. 145-163, 1981.

OKUMURA, N. *et al.* Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. **Animal Genetics**, Oxford, v. 32, n. 3, p.139-147, 2001.

OSLINGER, A.; MUÑOZ, J. E.; ÁLVAREZ, L. A. Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 55, n. 4, p. 45-50, 2006.

PAKENDORF, B.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and human evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 6, p.165-183, 2005.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 16, n. 1, p. 37-45, 2001.

ROTHSCHILD, M. F. Advances in pig genomics and functional gene discovery. **Comparative and Functional Genomics**, New York, v. 4, p. 266-270, 2003.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 253 p.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SOLLERO, B. P. **Diversidade genética das raças naturalizadas de suínos no Brasil por meio de marcadores moleculares microssatélites**. 2006. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SKEWES, O. R. *et al.* Carcass and meat quality traits of wild boar (*Sus scrofa s. L.*) with $2n = 36$ karyotype compared to those of phenotypically similar crossbreeds ($2n = 37$ and $2n = 38$) raised under farming conditions. 1, Carcass quantity and meat dressing. **Meat Science**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 1200-1204, 2008.

SOUZA, C. A. *et al.* Iberian Origin of Brazilian Local Pig Breeds Based on Cytochrome b (MT-CYB) Sequence. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 759-762, 2009.

TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Ed.). **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford Press University, 1996. 483 p.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, Bethesda, v. 105, n. 2, p. 437-460, 1983.

TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, Bethesda, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1989.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K. *et al.* MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Manual de Zootecnia**: raças que interessam ao Brasil. São Paulo: Agronômica Ceres, 1975. 301 p.

URSING, B. M.; ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 47, n. 3, p. 302-306, 1998.

VIANA, A. T. **Os suínos**: criação prática e econômica. 12. ed. São Paulo: Nobel, 1985. 384 p.

VIGILANT, L. *et al.* African population and evolution of human mitochondrial DNA. **Science**, Washington, v. 253, n. 5027, p. 1503-1507, 1991.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-354, 1951.

YAO, Y. G.; BRAVI, C. M.; BANDEL, H. J. A call for mtDNA data quality control in forensic science. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. 1-6, 2004.

Capítulo 4. RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS SUÍNOS CASCOS-DE-BURRO E POPULAÇÕES IBÉRICAS E NORTE-AMERICANAS POR MEIO DA REGIÃO *D-LOOP*

Resumo - Sequências nucleotídicas do DNA mitocondrial foram utilizadas com o objetivo de determinar a relação filogenética entre duas populações de casco-de-burro e 12 de suídeo, oriundas de Portugal (malhado-de-alcobaça, bísara, alentejana e javali), Espanha (*lampiño*, *retinto*, *entrepelado*, *dorado gaditano*, *celta gallega* e javali) e dos Estados Unidos (*mulefoot*, *guinea* e *red wattle*), na tentativa de este trabalho elucidar a origem materna dos animais cascos-de-burro do Brasil. Um fragmento da região *D-loop* de 511 pb foi amplificado, e os produtos de PCR foram purificados e, na sequência, inseridos em um sequenciador ABI PRISM[®] 310. Foram encontrados 33 haplótipos no total, sendo possível identificar 35 sítios polimórficos. A maioria dos haplótipos encontrados nos cascos-de-burro foi comum às populações da Península Ibérica estudadas neste trabalho, no entanto o mais frequente em ambas as populações de casco-de-burro foi comum apenas à população *dorado gaditano*. A população de casco-de-burro 1 diferiu estatisticamente de todas as outras, inclusive da casco-de-burro 2. Esta, todavia, não diferiu da bísara. Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os cascos-de-burro possuem ancestralidade materna ibérica, com pequena introgressão de haplótipo de origem asiática.

Palavras-chave: diversidade genética, *Sus scrofa*, Matrilinha

PHYLOGENETIC RELATIONS BETWEEN BRAZILIAN MULEFOOT PIGS AND IBERIAN AND NORTH-AMERICAN PIG POPULATIONS BASED ON MITOCHONDRIAL DNA D-LOOP REGION ANALYSIS

Abstract – Mitochondrial DNA nucleotide sequences were used to determine the phylogenetic relation between two Brazilian Mulefoot pig populations and 12 pig populations from Portugal (*Malhado-de-Alcobaça*, *Bísara*, *Alentejana*, and wild boars), Spain (*Lampiño*, *Retinto*, *Entrepelado*, *Dorado Gaditano*, *Celta Gallega*, and wild boars), and United States (US Mulefoot, Guinea, and Red Wattle) to try to elucidate the maternal origin of Mulefoot pigs in Brazil. A fragment of 511 pb of the *D-loop* region was amplified, and purified PCR products were analyzed using an ABI PRISM[®] 310 sequencer. A total of 33 haplotypes was found, and 35 polymorphic sites were identified. Most haplotypes found in Brazilian Mulefoot pigs were common to the Iberian pig populations included in the present study. However, the most frequent haplotype in both Brazilian Mulefoot populations was common only to the population of *Dorado Gaditano* pigs. Brazilian Mulefoot population 1 was statistically different from all other populations, including Mulefoot population 2, which did not differ from the *Bísara* population. Based on these findings, it was concluded that Brazilian Mulefoot pigs have Iberian maternal ancestors, with some introgression of haplotypes of Asian origin.

Keywords: genetic diversity, *Sus scrofa*, matrilineal history

4.1 INTRODUÇÃO

Sendo essencialmente transmitido via materna, o DNA mitocondrial (mtDNA) abriu uma nova perspectiva no estudo da genética de população e é o marcador molecular mais utilizado em estudos de domesticação (GIUFFRÀ *et al.*, 2000). O mtDNA é utilizado para identificar os prováveis ancestrais selvagens (HUANG *et al.*, 1999; OKUMURA *et al.*, 2001; FANG & ANDERSON, 2006), o número de linhagem materna na população em estudo (EGITO, 2007) e sua origem geográfica (LARSON *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007). Com os dados obtidos, pode-se traçar um padrão geográfico da diversidade e evolução de uma espécie, a dispersão e o fluxo gênico, verificar as

expansões demográficas assim como a miscigenação (BRUFORD *et al.*, 2003; EGITO, 2007).

A maior variação no DNA mitocondrial entre indivíduo não relacionado maternamente ocorre na região não codificante (região-controle ou *D-loop*), que possui “pontos quentes”, mutacionais, que evoluem a uma taxa 4 a 5 vezes superior à média, como as duas zonas hipervariáveis, HVI e HVII (CARRACEDO *et al.*, 2000; STONEKING, 2000; PAKENDORF & STONEKING, 2005). Nessas zonas, a substituição das bases não é uniforme, uma vez que as transições ocorrem mais frequentemente que as transversões, o número de transição de pirimidina é superior ao de purina, e as taxas de substituição são variáveis de acordo com os locais do DNA (HOELZEL *et al.*, 1991; TAMURA & NEI, 1993; MEYER *et al.*, 1999), permitindo que os múltiplos polimorfismos dessa região possam ser utilizados na distinção de indivíduo, baseada em haplótipo, já que permitem distinguir indivíduos relacionados ou não por via materna.

Trabalhos recentes confirmam o que, de fato, consta na história da espécie *Sus scrofa* no Brasil, que as raças nativas são derivadas das introduzidas na época da colonização, mostrando, por meio do mtDNA, que possuem uma ancestralidade materna europeia (GROSSI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009). Entretanto há um grupo de animal no Brasil, conhecido como casco-de-burro – que tem essa denominação pelo fato de os animais serem sindáctilos –, cuja origem ainda é incerta, uma vez que não há evidência desse fenótipo em suíno na Península Ibérica.

Contudo, segundo alguns autores (MARIANTE *et al.*, 2003; MARIANTE & CAVALCANTE, 2006; CASTRO, 2007), os animais que, no Brasil, chamam-se casco-de-burro têm origem provavelmente na raça *mulefoot*, encontrada nos Estados Unidos. Porém a origem do *mulefoot* americano também não é clara. COBURN (1909), no seu livro clássico, intitulado *Swine in America*, fez notar que o porco *mulefoot* foi encontrado em Arkansas, Missouri, Iowa, Indiana, em todo o sudoeste e em algumas partes do México. Na atualidade, há animais com esse fenótipo praticamente em todo o continente americano (LEMUS-FLORES *et al.*, 2001; LEMUS-FLORES *et al.*, 2003; OSLINGER *et al.*, 2006; AGÜERO *et al.*, 2008).

Existe grande lacuna quanto a estudos abordando relação genética de população de casco-de-burro com os seus possíveis ancestrais. Assim, aponta-se como objetivo principal deste capítulo verificar a relação genética entre os animais cascos-de-burro, raças norte-americanas e da Península Ibérica por meio de sequência direta da principal região não codificante do mtDNA (*D-loop*), na tentativa de este trabalho elucidar a origem materna dos animais cascos-de-burro do Brasil.

4. 2 MATERIAL E MÉTODOS

4. 2.1 Amostras

Amostras de sangue de 110 suínos com o fenótipo casco-de-burro foram coletadas individualmente em tubos com K₃EDTA e transportadas para o laboratório. Esses animais são oriundos da região Nordeste (estado da Paraíba, 46 animais), Centro-Oeste (estado do Mato Grosso, 29 animais) e Sudeste (estado de Minas Gerais, 35 animais) do Brasil.

Com base nos resultados obtidos no capítulo anterior, observou-se que as populações das regiões Sudeste e Nordeste não diferiram entre si pelo parâmetro F_{st} , por isso, neste capítulo, ambas serão consideradas única população, denominada de “casco-de-burro 2”, ao passo que a população “casco-de-burro 1” foi formada pelos animais da região Centro-Oeste.

Foram também estudados os três grupos genéticos autóctones de Portugal (malhado-de-alcobaça, bísaro e alentejano), cinco da Espanha (*lampiño*, *retinto*, *entrepelado*, *dorado gaditano* e *celta gallega*) e três dos Estados Unidos (*mulefoot*, *red wattle* e *guinea*).

Utilizaram-se amostras de Javali provenientes das mesmas regiões geográficas das raças autóctones da Península Ibérica (Portugal e Espanha), uma vez que essas amostras permitem avaliar a contribuição dos javalis para o *pool* das raças suínas autóctones e, eventualmente, desenvolver marcadores que distingam a forma doméstica da selvagem.

4.2.2 Extração de DNA

O DNA total (nuclear + mitocondrial) foi extraído, segundo SAMBROOK *et al.* (1989), a partir da mancha de sangue armazenada em cartão *FTA Classic*, usando-se pequenas áreas do cartão (1-2 mm²), conforme descrito no capítulo 2.

4.2.3 Amplificação dos produtos de PCR e sequenciamento

A região utilizada do mtDNA para traçar as relações filogenéticas entre os cascos-de-burro e os grupos genéticos estudados foi a *D-loop*, escolhida não só pela sua alta taxa de mutação (TABERLET, 1996) como também por ter sido amplamente utilizada em diferentes trabalhos envolvendo raças de suíno, o que permite a imediata comparação das sequências geradas neste trabalho com as disponíveis na literatura (GIUFFRA *et al.*, 2000; OKUMURA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2003a). Um fragmento de 511 pb entre os sítios 15.390 e 15.900 foi amplificado usando-se iniciadores de acordo com ALVES *et al.* (2003a).

As condições da reação de amplificação foram realizadas em um termociclador “Eppendorf Mastercycler personal[®]”, usando-se o Qiagen Taq PCR Core Kit[®], num volume total de 25 µl, contendo 0,4 µM de cada iniciador, 1x tampão com MgCl₂ (1,5 mM), 200 µM de dNTPs, Solução Q (1x), 1 unidade de *Taq* DNA Polymerase e 1-2 µl de amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu em desnaturação a 94°C por 2 min; seguida de 30 ciclos de 2 min e 30 s: desnaturação a 94°C por 45 s, anelamento a 55°C por 45 s e extensão a 72°C por 1 min; e extensão final de 72°C por 10 min.

Após amplificação, a purificação de cada amostra (5 µl) foi realizada com a enzima Exosap-It[®] (2 µl). O programa de purificação consistiu em 15 min a 57°C e 15 min a 80°C.

Após purificação, as reações de amplificação para sequenciamento foram realizadas com o ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit[®] num volume total de 10 µl, contendo 1 µM de iniciador direto, tampão de sequenciamento (0,5x), 2 µl de Kit de sequenciamento e 2 µl de amostra purificada. O programa de

amplificação utilizado consistiu em 1 min a 96°C e, em seguida, 25 ciclos de 10 s a 90°C, 5 s a 55°C e 4 min a 60°C.

O produto obtido foi precipitado com 2 µl de acetato de sódio (3M com pH = 4,6) e 50 µl de etanol 95% e, após incubação à temperatura ambiente durante 20 min e centrifugação a 14000 rpm durante 20 min, foi ressuspenso com 250 µl de etanol 70% e novamente centrifugado durante 5 min a 14000 rpm. Após centrifugação, foi retirado o sobrenadante e secou-se o precipitado. Em seguida, a amostra foi preparada para ser analisada num sequenciador automático ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. Em cada aplicação, foram utilizados 25 µl de formamida desionizada. A visualização dos resultados foi efetuada com a aplicação Sequencing Analysis® 3.7 da Applied Biosystems.

4.2.4 Tratamento dos dados

As sequências geradas foram avaliadas inicialmente para qualidade maior ou igual a 20 pelo software Phred (EWING & GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), sendo $Q = -10 \log_{10}(P_e)$, em que Q é o valor da qualidade e P_e é a probabilidade de a base ter sido nomeada erroneamente. As sequências eram aceitas com, no máximo, 1 base não determinada a cada 100 bases sequenciadas.

Em seguida, usando-se o software Bioedit® vs7.0.5.2 (HALL, 1999), que utiliza o algoritmo Clustal W, as sequências obtidas foram alinhadas – consideraram-se 460 pb das 511 sequenciadas, localizadas entre as posições 15.420 e 15.880 – e comparadas entre si. Como sequência referência, utilizou-se a do mtDNA da espécie *Sus scrofa*, disponível no NCBI, GenBank AJ002189 (URSING & ARNASON, 1998).

Diversos estudos referem-se aos cuidados necessários na análise do mtDNA, de modo a definir protocolos para evitar ou minimizar os efeitos de possíveis contaminações ou erros de análise no resultado final (CARRACEDO *et al.*, 2000; BANDELT *et al.*, 2001; EDSON *et al.*, 2004; YAO *et al.*, 2004; BUDOWLE *et al.*, 2005). Em análise do mtDNA, os erros consequentes da verificação do processo de sequenciamento da amostra, que consistem, na maioria das vezes, em trocas de base,

referências ambíguas e mutações fantasmas são apontados como a maior causa de equívoco (BANDELT *et al.*, 2001; MONTEIRO, 2007).

O protocolo utilizado neste estudo para obtenção das sequências de mtDNA de suíno, de modo a tentar ultrapassar os entraves resultantes dos erros descritos, consistiu – além de as sequências serem inicialmente avaliadas para qualidade – no alinhamento e posterior revisão das sequências das amostras por duas pessoas bem como na criação de uma lista de polimorfismo através da comparação com a amostra referência (Acesso *GenBank*: AJ002189). Quando necessário, amostras foram sequenciadas nos dois sentidos, de forma a obter resultados mais concretos e a eliminar dúvidas.

4.2.5 Análise dos dados

Os haplótipos foram obtidos por meio de contagem direta, usando-se o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Várias das sequências aqui obtidas, por serem relatadas pela primeira vez, serão depositadas no *Genbank*.

Uma vez obtidos os haplótipos, procedeu-se a avaliar o grau de diversidade em cada uma das populações estudadas assim como a relação genética entre elas.

Analisou-se, então, a diversidade haplotípica [(*h*) NEI & TAJIMA, 1981], que é uma medida análoga à diversidade genética de Nei no DNA nuclear:

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right),$$

em que *k* é o número de haplótipo, *p_i* representa as frequências de cada *i* haplótipo e *n* é o tamanho da amostra.

Uma segunda medida de variabilidade é denominada diversidade nucleotídica [(*π*) NEI, 1987], definida como o número médio das diferenças nucleotídicas por *locus* entre as diferentes sequências, calculando-se a partir de:

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum_{ij} p_i p_j \delta_{ij},$$

em que δ_{ij} é a proporção dos nucleotídeos diferentes entre os haplótipos i e j ; p representa as frequências de cada i e j haplótipo; e n é o tamanho da amostra.

A proporção dos nucleotídeos diferentes entre haplótipo (δ_{ij}) foi estimada a partir da distância de TAMURA & NEI (1993), usando-se o programa ALERQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Em seguida, o número médio de substituição nucleotídica por posição entre dois grupos de sequência (dxy), que dá uma estimativa da distância genética entre esses grupos (NEI & LI, 1979), foi calculada a partir da fórmula:

$$dxy = \pi_{12} = \sum_i \sum_j p_{1i} p_{2j} \delta_{ij}$$

em que δ_{ij} é a proporção dos nucleotídeos diferentes entre os haplótipos i e j , sendo p_i a frequência do haplótipo i . E, a partir desta, com as correções para as divergências, dado um grupo de sequência, pode-se calcular a DA a partir de:

$$DA = \pi_{12} - \frac{\pi_1 + \pi_2}{2}$$

A árvore filogenética foi construída entre as populações, baseada nas distâncias DA, usando-se o algoritmo *Neighbour-Joining* e os programas MEGA (TAMURA *et al.*, 2007) e ALERQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

Outro método estatístico utilizado neste estudo para avaliar o grau de divergência genética entre as populações estudadas foi a estimativa do parâmetro F_{ST} (WRIGHT, 1951), que, através da combinação de várias medidas de heterozigose a diferentes níveis (indivíduos, subpopulações e população total), permite uma descrição detalhada da estrutura populacional (HARTL & CLARK, 2007). Esse parâmetro foi calculado usando-se também o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005), por meio de 1.023 permutações paramétricas dos haplótipos entre as subpopulações.

E, finalmente, as relações entre os haplótipos foram também inferidas usando-se tanto o método *Neighbour-Joining* – em que a confiança estatística de cada nó foi estimada sobre 1.000 réplicas *bootstrap* por meio do programa MEGA (TAMURA *et al.*, 2007) –, quanto o *Median Joining* (BANDELT *et al.*, 1999), que combina o algoritmo de Kruskal, o qual seleciona árvores em que são favorecidas as conexões mais curtas, com o algoritmo heurístico de máxima parcimônia de Farris, que, sequencialmente, adiciona-lhes novos vértices, baseados em haplótipos intermédios, de forma a reduzir o comprimento total da árvore (BANDELT *et al.*, 1999); foi construída uma rede de haplótipo usando-se o programa NETWORK v.4.2.0.1[®] (BANDELT *et al.*, 1999).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 359 sequências de 460 pb da região *D-loop* obtidas neste trabalho revelaram 33 haplótipos, sendo possível observar 35 sítios polimórficos. Destes, 29 compreenderam mutações do tipo transição, enquanto três, do tipo transversão. Foram detectadas cinco deleções/inserções entre os haplótipos encontrados, em que duas ocorreram em sítio que também foi observado substituição. Quando comparados com a sequência referência (Acesso *GenBank*: AJ002189), todos os haplótipos apresentaram uma deleção na posição 15.707.

Na Tabela 1, está a frequência numérica dos haplótipos do mtDNA encontrado por população.

Tabela 1. Frequência numérica dos haplótipos do DNA mitocondrial nos grupos genéticos estudados

Haplótipo	GRUPO GENÉTICO														
	Brasil		Espanha				Portugal				Estados Unidos				
	CB1 (29)	CB2 (81)	CG (14)	DG (07)	EN (15)	LA (14)	RE (25)	JE (25)	JP (27)	BI (23)	MA (21)	AL (21)	MF (35)	GI (15)	RW (5)
H1					03	01	01		01						
H2					02	02	02								
H3			02	03	04	08	16	08	03		07	19			
H4		05			02	04			01		06	01			
H5					01										
H6		01			02	02	02	05	03		01		12		
H7						03					07				
H8			06												
H9			03												
H10		13	03	03	01		01	02		07			01	08	
H11										06					
H12								03							
H13								01	03						
H14								05	03						
H15		07						01							
H16													19	02	05
H17															
H18														01	
H19														04	
H20														01	
H21														01	
H22								06							
H23								05							
H24								01							
H25								01							
H26		01								05					
H27										05					
H28												01			
H29	29	41					01								
H30		02													
H31		05													
H32		03													
H33		03													
Total*	01	10	04	03	07	03	06	07	10	04	04	03	04	05	01

CB1 = casco-de-burro 1; CB2 = casco-de-burro 2; CG = *celta gallega*; DG = *dorado gaditano*; EN = *entrepelado*; LA = *lampiño*; RE = *retinto*; JE = javali da Espanha; JP = javali de Portugal; BI = bisaro; MA = malhado-de-alcobaça; AL = alentejano; MF = *mulefoot*; GI = *guinea*; RW = *red wattle*. *Total de haplótipo encontrado por grupo genético. Entre parêntese encontra-se o número de animal utilizado.

As populações selvagens apresentaram, de modo geral, maior número de haplótipo que as domésticas (Tabela 1). Porém a população de suíno casco-de-burro 2 apresentou maior quantidade de haplótipo que a dos Javalis da Espanha. Algumas populações (casco-de-burro 1 e *red wattle*) apresentaram apenas um haplótipo, demonstrando, possivelmente, que descendem de única matrilinea (Tabela 1). Ressalta-se, no entanto, que, além do reduzido número de animal na *red wattle*, todos os grupos genéticos aqui estudados estão ou estiveram em perigo de extinção, o que, devido à redução populacional, pode ter eliminado possíveis haplótipos dessas populações. Mas, em princípio, espera-se que, de fato, a domesticação e o melhoramento reduzam a diversidade genética, porque envolvem a ocorrência de efeitos de fundação, a utilização de um reduzido número de reprodutor com elevado valor reprodutivo e a fixação progressiva de alelo benéfico através da seleção artificial (INNAN & KIM, 2004; CRUZ *et al.*, 2008).

Observaram-se, ainda, na Tabela 1, que quatro haplótipos (H₃, H₆, H₁₃ e H₁₄) foram comuns entre as populações selvagens e que vários dos haplótipos presentes nos selvagens (H₁, H₃, H₄, H₆, H₁₀ e H₁₅) apareceram em grupos genéticos domésticos (Tabela 1), o que contraria KIJAS & ANDERSSON (2001), que sugeriram que uma subespécie selvagem distinta poderia ter evoluído na Península Ibérica devido ao isolamento reprodutivo durante a última glaciação.

A única região da Europa, porém, que possui evidências de que tenha sido refúgio para o javali durante a última glaciação é a Itália, uma vez que KIJAS & ANDERSSON (2001) demonstraram, com base na sequência completa do DNA mitocondrial, que existe grande divergência genética entre os javalis italianos e os da Europa Central, que se teriam diferenciado nessa região há cerca de 66 9000 anos, devido ao isolamento criado pelos Alpes. Durante as glaciações do quaternário, a Península Ibérica constituiu-se em um importante refúgio para inúmeros mamíferos, como o coelho selvagem (BRANCO *et al.*, 2002) e o urso pardo (TABERLET *et al.*, 1994), mas, ao que indica, o mesmo não aconteceu com os javalis ibéricos (ALVES *et al.*, 2003a; PINHEIRO, 2005).

A existência comum de três haplótipos (H₃, H₄ e H₆) entre alguns grupos domésticos portugueses (malhado-de-alcobaça e alentejano) e a população selvagem de Portugal (Tabela 1), da mesma forma entre raças espanholas e a população de javali espanhol, é concordante com origem materna comum, tendo essas raças contribuição de matrilineas provenientes de único evento e local de domesticação, corroborando achados (LARSON *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2007), que revelaram que os porcos foram domesticados em várias localizações da Eurásia, a partir das populações selvagens locais, mas não unicamente na China, como ficou creditado por muitos anos. No trabalho de LARSON *et al.* (2005), a ausência de haplótipo mitocondrial do Oriente Próximo nas raças europeias modernas foi tomada como prova de que as últimas descendem de javali domesticado localmente.

No que se referem aos cascos-de-burro, percebe-se que o H₂₉, o mais frequente em ambas as populações (casco-de-burro 1 e 2), só apareceu na população *dorado gaditano* da Espanha, embora, neste trabalho, tenham-se utilizado quatro variedades da raça Ibérica (*retinto*, *lampiño*, *entrepelado* e *dorado gaditano*) como também a raça alentejana de Portugal, que igualmente faz parte do agrupamento racial denominado ibérico na Espanha. Mas o H₂₉ parece ser mesmo da raça ibérica, uma vez que ALVES *et al.* (2003a) também o encontraram na população *lampiño*. O H₁₀, segundo haplótipo mais frequente na casco-de-burro 2, foi também observado na *dorado gaditano* e em várias outras populações estudadas (Tabela 1).

Ressalta-se que também existia em Portugal a variedade dourado alentejano, que é a mesma variedade colorada (*rúbia*) da Espanha. Portanto o H₂₉ pode ter chegado ao Brasil por meio de animais da variedade dourado alentejano de Portugal, e não necessariamente por meio de animais importados diretamente da Espanha. A raça alentejana passou por drástica redução numérica e populacional, que eliminou variedade dessa raça em Portugal, como a dourada, não se sabendo quantos animais contribuíram como fundadores das atuais populações existente em Portugal, podendo isso ser também uma das razões para não se ter encontrado o H₂₉ na população alentejana.

Em relação aos suínos *mulefoot*, observa-se que apenas dois (H₆ e H₁₀) haplótipos foram comuns entre estes e a população casco-de-burro 2 (Tabela 1). O

único haplótipo que apareceu na casco-de-burro 1 não apareceu na *mulefoot*. Embora o H₆ tenha sido o segundo haplótipo mais frequente na população casco-de-burro 2, sua frequência na *mulefoot* foi limitada a um único animal, sendo esse haplótipo comum a várias outras populações da Península Ibérica estudadas. O mesmo ocorreu com o H₁₀, que, embora muito frequente na população de suíno *mulefoot*, apareceu somente em um único animal casco-de-burro. Isso sugere que esses haplótipos tenham chegado ao Brasil por meio dos animais da Península Ibérica, e não por meio dos suínos *mulefoot*, não sustentando, portanto, a hipótese aventada de que os suínos cascos-de-burro do Brasil seriam derivados dos porcos *mulefoot*, dos Estados Unidos.

A diversidade haplotípica oscilou entre 0,00 e 0,87 (Tabela 2). Apesar da suposição de uma drástica redução populacional das populações de javali na Península Ibérica, da fragmentação da população e da atual estruturação (SCANDURA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009), os maiores valores foram observados nas populações selvagens, embora a população *entrepelado* tenha apresentado o mesmo valor dos javalis de Portugal. Durante os anos 60, as populações dessa subespécie encontravam-se extremamente reduzidas na Península Ibérica, devido à caça excessiva e a um surto de peste suína africana. Com o intuito de evitar a erradicação total dessa subespécie naquela região, foi proibida a caça ao javali, principalmente em Portugal (MORAIS, 1979).

A população de suíno casco-de-burro 2, apesar de ter maior número de haplótipo que a de Javali da Espanha (Tabela 1), apresentou menor diversidade haplotípica (Tabela 2) pelo fato de as frequências haplotípicas serem maiores na primeira população.

Tabela 2. Diversidades haplotípica (h) e nucleotídica (π), estimadas a partir da região D-loop do mtDNA dos suínos de diferentes grupos genéticos do Brasil, da Península Ibérica e dos Estados Unidos

GRUPO GENÉTICO	N	Nh	NTS	NTV	h	π
<i>Entrelado</i>	15	07	08	01	0,87 ± 0,05	0,007 ± 0,004
<i>Dorado Gaditano</i>	07	03	02	01	0,71 ± 0,12	0,004 ± 0,003
<i>Celta Gallega</i>	14	04	04	01	0,75 ± 0,07	0,006 ± 0,003
<i>Lampiño</i>	14	03	02	01	0,61 ± 0,10	0,004 ± 0,003
<i>Retinto</i>	25	06	08	01	0,58 ± 0,10	0,004 ± 0,002
<i>Javali Espanha</i>	25	07	15	01	0,78 ± 0,05	0,005 ± 0,003
<i>Mulefoot</i>	34	04	04	01	0,57 ± 0,05	0,005 ± 0,003
<i>Guinea</i>	15	05	16	02	0,67 ± 0,10	0,01 ± 0,005
<i>Red Watle</i>	05	01	0	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<i>Javali Portugal</i>	27	10	10	01	0,87 ± 0,02	0,006 ± 0,003
<i>Bísaro</i>	23	04	14	01	0,77 ± 0,03	0,01 ± 0,008
<i>Malhado-de-Alcobaça</i>	21	04	02	02	0,72 ± 0,04	0,005 ± 0,003
<i>Alentejano</i>	21	03	02	01	0,18 ± 0,11	0,001 ± 0,001
<i>Casco-de-burro 2</i>	76	10	16	01	0,73 ± 0,04	0,01 ± 0,006
<i>Casco-de-burro 1</i>	29	01	0	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

N = número de animal utilizado; Nh = número de haplótipo na população; NTS = número de transição; NTV = número de reversão.

Há vários fatores que poderiam explicar a baixa variabilidade de haplótipo entre os domésticos e os selvagens da Península Ibérica.

Primeiro, a domesticação dos suínos, que, em vez de ser um acontecimento único, na China, teve lugar em vários locais em toda a Eurásia, o que permitiu a participação das populações locais de *Sus scrofa* com diferentes patrimônios genéticos (GIUFFRA *et al.*, 2000; LARSON *et al.*, 2005). De acordo com GIUFFRA *et al.* (2000), o tempo de divergência das formas ancestrais das populações selvagens de *Sus scrofa* foi estimado em 500.000 anos, muito antes do período apontado para a sua domesticação, que terá ocorrido há cerca de 9.000 anos. Posteriormente, ter-se-á dado a introgressão de raças domésticas asiáticas nas raças euro-americanas (OKUMURA *et al.*, 2001). Nesse sentido, vários estudos apontam para uma maior proximidade entre as formas domésticas e selvagens do mesmo continente que entre as populações selvagens do continente Europeu e do Asiático (WATANOBE *et al.*, 1999; OKUMURA *et al.*, 2001).

Em segundo lugar, o javali é uma espécie polígama, que sofreu redução na população em consequência da caça excessiva (SCANDURA *et al.*, 2008), o que pode ter eliminado haplótipos raros que, possivelmente, o distanciaria geneticamente dos domésticos. E, finalmente, pode ter havido, ainda, um fluxo genético bidirecional sustentado entre as populações selvagens e domésticas de *Sus scrofa* na Península Ibérica.

Os grupos domésticos, de modo geral, apresentaram maiores valores que os selvagens de diversidade nucleotídica, que oscilou entre 0,00 e 0,01 ($\pm 0,005$), sendo as populações *guinea*, *bísara* e *casco-de-burro 2* as que apresentaram maior variação nucleotídica (Tabela 2). Isso pode ser explicado pelo fato de essas populações terem apresentado haplótipo asiático e europeu, em que há grande divergência nucleotídica entre estes. Nesse sentido, as populações *dorado gaditano* e javali da Espanha apresentaram alta diversidade haplotípica, mas baixa nucleotídica. Isso se deve à similaridade entre os haplótipos das respectivas populações, visto que um haplótipo pode se diferenciar de outro apenas em um sítio.

As distâncias F_{ST} (Tabela 3) mostraram que a população de casco-de-burro 1 diferiu de todas as outras, inclusive da casco-de-burro 2, embora essa última tenha apresentado frequência alta do H_{29} , único presente na casco-de-burro 1.

A população de suíno casco-de-burro 2, todavia, não diferiu da bísara, mostrando estar mais próxima desta. A alentejana, de Portugal, não diferiu da *retinto*, da Espanha, que, segundo autores (ALVES *et al.*, 2003a; ALVES *et al.*, 2003b), pertencem a mesma variedade da raça ibérica da Espanha. Ressalta-se que a alentejana, como visto na Figura 5 do Capítulo 2, representa duas variedades no agrupamento racial da Espanha denominado ibérico, em que uma pertence à variedade *retinto* e a outra à *rubia (dorada)*, sendo que a alentejana diferiu estatisticamente da *dorado gaditano*. Esta, chamada de dourado alentejano em Portugal, está praticamente extinta em Portugal, da mesma forma os animais *dorado gaditano* também estão quase extintos na Espanha, encontrando-se apenas em algumas pequenas criações. A alentejana esteve, em relação às demais populações de Portugal, mais próxima da bísara que da malhado-de-alcobaça, embora distante das duas significativamente pelo parâmetro F_{st} .

Tabela 3. Distâncias *Pairwise F_{st}* entre os grupos genéticos estudados. Valores de distância *F_{st}* estão abaixo da diagonal e os respectivos p-valores acima

	EN	DG	RE	LA	CG	JE	MF	GI	RW	JP	BI	MA	AL	CB2	CB1
EN	0	0,18 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,01	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
DG	0,04	0	0,07 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,00	0,05	0,00	0,00	0,18 ^{ns}	0,21 ^{ns}	0,00	0,04	0,00
RE	0,04	0,08	0	0,18 ^{ns}	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09 ^{ns}	0,00	0,00
LA	0,02	0,09	0,02	0	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,07 ^{ns}	0,03	0,00	0,00
CG	0,12	0,12	0,24	0,15	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00
JE	0,04	0,07	0,04	0,07	0,19	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
MF	0,28	0,30	0,37	0,34	0,26	0,32	0	0,00	0,12 ^{ns}	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
GI	0,22	0,09	0,33	0,26	0,15	0,30	0,22	0	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
RW	0,52	0,67	0,63	0,63	0,54	0,56	0,14	0,30	0	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00
JP	0,17	0,22	0,26	0,27	0,30	0,13	0,36	0,35	0,56	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BI	0,12	0,05	0,19	0,15	0,10	0,17	0,27	0,11	0,31	0,24	0	0,00	0,00	0,08 ^{ns}	0,00
MA	0,15	0,20	0,21	0,10	0,12	0,25	0,36	0,25	0,55	0,37	0,18	0	0,00	0,00	0,00
AL	0,23	0,32	0,04	0,14	0,46	0,15	0,51	0,46	0,86	0,40	0,28	0,39	0	0,00	0,00
CB2	0,14	0,12	0,21	0,18	0,16	0,17	0,28	0,21	0,39	0,23	0,03	0,22	0,29	0	0,00
CB1	0,54	0,76	0,59	0,68	0,68	0,47	0,62	0,60	1	0,54	0,29	0,65	0,86	0,12	0

EN = *entrepelado*; DG = *dorado gaditano*; RE = *retinto*; LA = *lampião*; CG = *celta gallega*; JE = *javali da Espanha*; MF = *mulefoot*; GI = *guinea*; RW = *red wattle*; JP = *javali de Portugal*; BI = *bisaro*; MA = *malhado-de-alcobaça*; AL = *alentejano*; CB2 = *casco-de burro 2*; CB1 = *casco-de-burro 1*. ns = não significativo.

A população *mulefoot* apresentou valores altos de F_{ST} em relação às duas populações de casco-de-burro (Tabela 3), não sustentando a teoria de que estes seriam derivados daqueles (MARIANTE *et al.*, 2003; MARIANTE & CAVALCANTE, 2006; CASTRO, 2007).

A *red wattle* – certamente por compartilhar seu único haplótipo (H_{16}) com a população *mulefoot*, que foi, inclusive, o mais frequente nesta – não diferiu estatisticamente dela.

Observando-se a rede *Median Joining* entre os haplótipos (Figura 1), nota-se que o H_3 – que apareceu não só em todas as populações da Espanha mas também na população de javali de Portugal bem como na alentejana e na malhado-de-alcobaça – apresentou relação de um único sítio polimórfico com vários outros haplótipos, demonstrando ser a raiz da rede; o H_9 , exclusivo da população *celta gallega*, e o H_{29} , mais frequente nos cascos-de-burro, só apresentam um sítio polimórfico (SNP) em relação ao H_3 , podendo-se supor que ambos sejam oriundos de mesma matrilinea e que se diferenciaram recentemente.

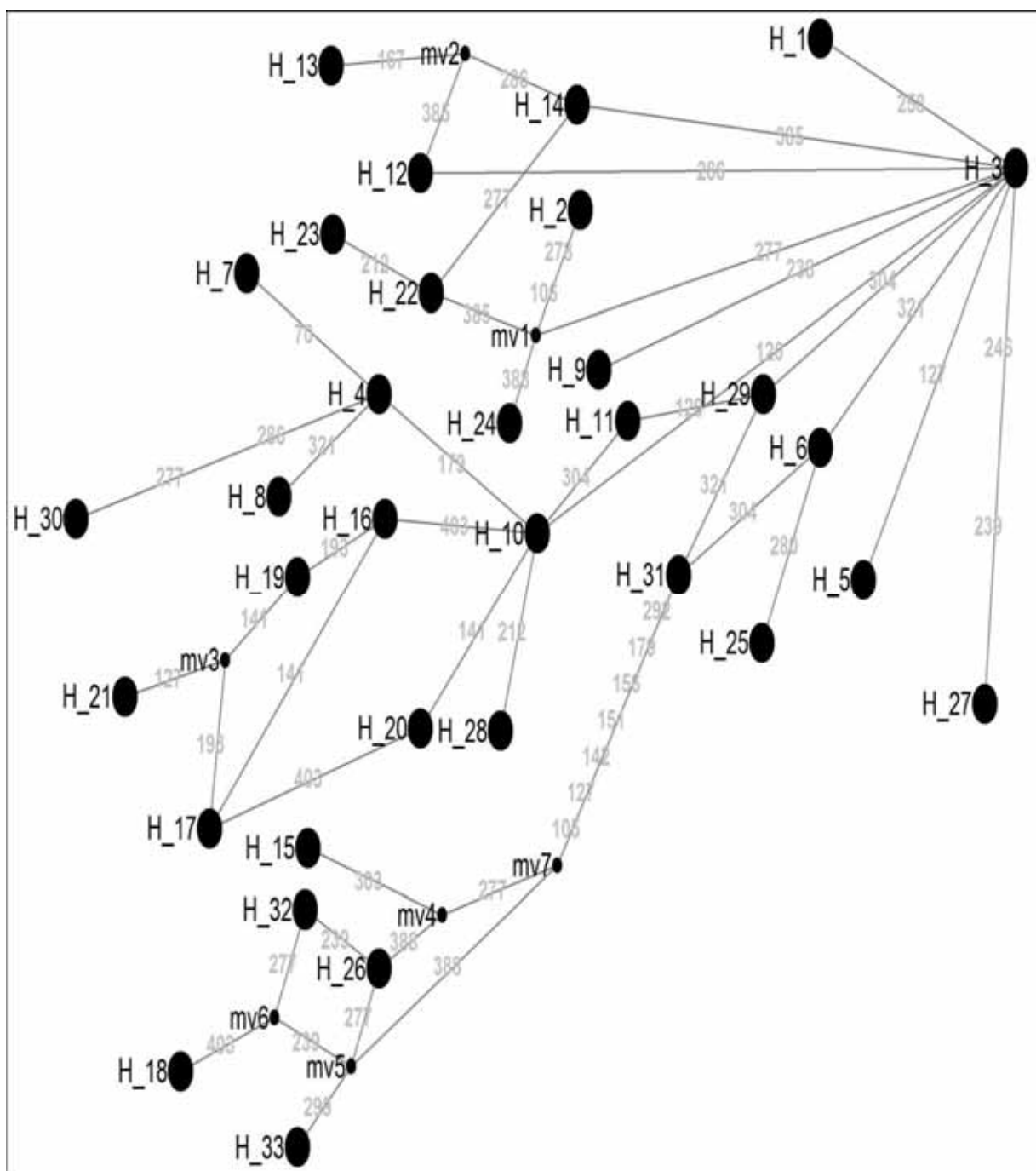


Figura 1. Rede *Median Joining* entre os haplótipos encontrados nas populações de suídeo do Brasil, da Espanha, de Portugal e dos Estados Unidos. Em cinza, está o número de mutação entre haplótipo (ex.: entre o haplótipo H₁ e H₃, há uma mutação na posição 258 da sequência de 1.632 pb estudada). Os pontos mv1, mv2 etc. indicam nó teórico intermediário, introduzido pelo algoritmo executado

Há alguns SNP na região *D-loop* que permitem classificar o haplótipo em europeu ou em asiático (GONGORA *et al.*, 2004). Os encontrados neste trabalho dividiram-se em europeu e asiático (H₁, H₁₂, H₁₆, H₃₃ e H₃₄). O europeu, por sua vez, subdividiu-se em dois clados, em que, fora do conjunto de todos os outros, ficou o H₃₁ (Figura 2).

A participação de matrilineas asiáticas é, de modo geral, pequena, tanto na população de casco-de-burro 2, nas da Península Ibérica (bísara), quanto nas americanas (*guinea*) (Tabela 1; Figura 2). Evidentemente, eram vários os aspectos suficientemente não esclarecidos pelos estudos mais clássicos, em que muitas dúvidas ainda se perpetuavam, como se a introgressão de alelo de raça asiática alcançou exclusivamente as raças britânicas ou também outras europeias e americanas (ALVES *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2003b). Recentemente, vários trabalhos mostraram a presença de haplótipo asiático em raças sul-americanas (GROSSI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2009; RAMÍREZ *et al.*, 2009), e os resultados obtidos neste trabalho mostram que essa introgressão alcançou inclusive as norte-americanas.

Os resultados aqui encontrados mostram, entretanto, uma participação, embora mínima, de haplótipo asiático (H₁₂) somente na população americana *guinea* entre as norte-americanas (Tabela 1; Figura 2). A bísara, de Portugal, também apresentou haplótipo asiático, sendo este o primeiro relato de introgressão de alelo asiático nessa raça. Nenhuma população da Espanha estudada neste trabalho apresentou haplótipo asiático, no entanto trabalhos mostram influência das raças asiáticas nas populações de suíno nativo da Espanha, inclusive na raça ibérica (ALVES *et al.*, 2003a; FANG & ANDERSSON, 2006).

Como visto na Tabela 1, a maioria dos haplótipos dos cascos-de-burro (H₄, H₆, H₁₀, H₁₅, H₂₆ e H₂₉) foi comum aos grupos genéticos da Península Ibérica estudados neste trabalho. O H₂₆, embora comum à população bísara, é de origem asiática, sendo observado em inúmeras raças e em vários grupos genéticos asiáticos, como em animais da China, do Japão, da Indonésia etc. (LARSON *et al.*, 2010).

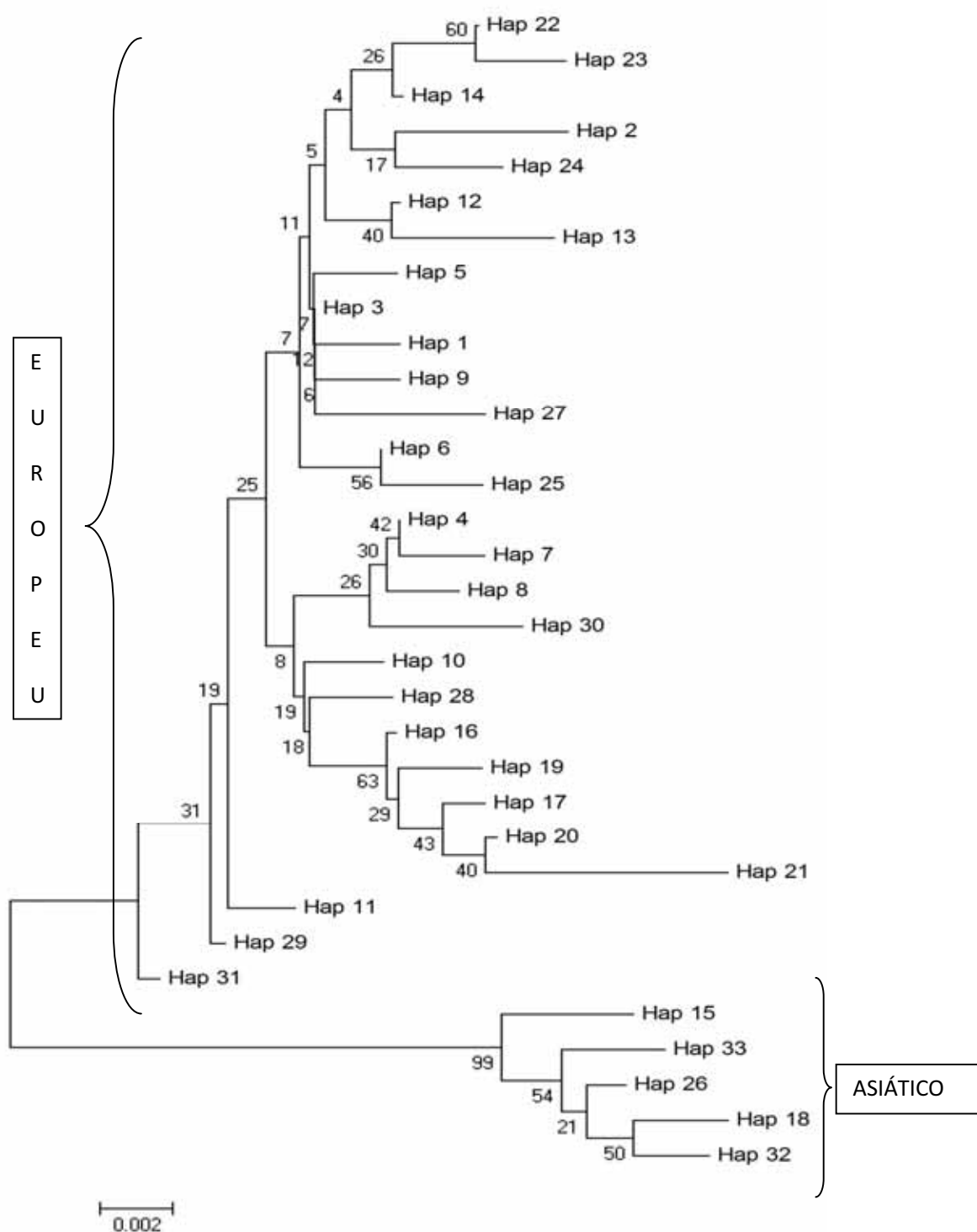


Figura 2. Dendrograma *Neighbour-Joining* para os 33 haplótipos encontrados nos animais casco-de-burro, norte-americanos e da Península Ibérica. Os números nas bifurcações correspondem às porcentagens sobre 1.000 replicações *bootstrap*

Da mesma forma, o H₁₅, embora comum à população de javali da Espanha, é de origem asiática (Figura 2), trazendo à tona teorias antigas que afirmam que, primitivamente, essa espécie surgiu no norte da África e sudoeste da Ásia e, em tempos remotos, migrou para a Europa, onde se disseminou pelas diversas regiões desse continente, sempre se adaptando aos diferentes climas e topografias que foi encontrando. Curiosamente, a análise mitocondrial dos ossos e dos dentes antigos de suídeo tem provas de que os suínos do Oriente Próximo entraram na Europa no neolítico, mas não deixaram qualquer assinatura genética nas raças modernas (LARSON *et al.*, 2007). A presença de haplótipo asiático moderno em um indivíduo selvagem da Espanha pode, no entanto, demonstrar miscigenação entre animal selvagem e doméstico, visto que foi relatado por vários trabalhos presença de haplótipo asiático em suínos domésticos da Espanha (ALVES *et al.*, 2003a; FANG & ANDERSON, 2006). Contudo seria mais fácil haver cruzamento entre um macho selvagem e uma fêmea doméstica que o contrário, proporcionando, aos machos da prole, cromossomo Y selvagem. Mas os resultado aqui obtido mostram que não se deve excluir a possibilidade de que animais (fêmeas, inclusive) cruzados com raças asiáticas e nascidos no meio doméstico tenham escapado do contato do homem e retornado ao ambiente selvagem, produzindo proles asselvajadas com DNA mitocondrial asiático. No trabalho de VARGAS (2008), é demonstrado contato direto de javalis com suínos domésticos na Espanha.

Esse haplótipo (H₁₅) foi encontrado não só em suínos nativos da Myanmar, país do Sudeste Asiático, por TANAKA *et al.* (2008), como também em animais da Indonésia (Acesso *Genbank*: AJ854379).

Os demais haplótipos encontrados na população de casco-de-burro 2 (H₃₀, H₃₁, H₃₂ e H₃₃) não foram comuns às outras populações estudadas neste trabalho (Tabela 1). O H₃₀ é comum à raça *Landrace* (Acesso *Genbank*: AB041498), à *Duroc* (ALVES *et al.*, 2003a) e à subespécie *Sus scrofa riukiuanus* (Acesso *Genbank*: AB505854), do Japão (Figura 2). O H₃₁ não foi observado, até então, em nenhuma outra raça ou grupo animal, podendo ser exclusivo dos cascos-de-burro. O H₃₂, de origem asiática, além de ter sido encontrado em várias raças e em inúmeros grupos genéticos desse continente (LARSON *et al.*, 2010), foi observado também em animais da raça *berkshire* (Acesso

Genbank: GQ169778.1). Finalmente, o H₃₃, também de origem asiática, ocorre em várias raças e em muitos grupos genéticos asiáticos (LARSON *et al.*, 2010), sendo que foi observado ainda em animais da raça europeia *yorkshire* (Acesso *Genbank*: GQ169777) (Figura 2).

A prevalência de mtDNA europeu e asiático foi estudada previamente nas principais raças comerciais utilizadas na Europa, como *large white* e *landrace* (GIUFFRA *et al.*, 2000; OKUMURA *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2002). Esses estudos demonstraram que muitos desses padrões raciais apresentaram introgressão de haplótipo asiático, o que comprova as evidências históricas de que muitas raças chinesas foram importadas para a Inglaterra entre 1770 e 1860 e introduzidas nas populações inglesas de suíno, influenciando o desenvolvimento das raças *landrace*, *berkshire*, *small white* e *middle white* (JONES, 1998).

Associado a isso, EPSTEIN & BICHARD (1984) sugeriram que os porcos asiáticos que contribuíram para o desenvolvimento das raças dos porcos ingleses tenham sido importados não da China nem da Indo-China diretamente, mas através de Nápoles e de Portugal em 1770-80. Por isso, provavelmente, haplótipos de origem asiática foram observados em raças da Península Ibérica estudadas neste trabalho como também por outros autores (ALVES *et al.*, 2003a; FANG & ANDERSON, 2006), evidenciando a introgressão de alelo das raças asiáticas nessa península.

Os estimadores de divergência nucleotídica (D_A) entre as populações de casco-de-burro (Tabela 5) e a árvore *Neighbour-Joining* derivada destes (Figura 3) mostram que, de fato, as populações 1 e 2 de casco-de-burro estão mais próximas da bísara, de Portugal, encontrando-se separadas da *mulefoot*, que está agrupada com a *guinea* e a *red wattle*, ambas norte-americanas. A alentejana e a *retinto* estão muito próximas, confirmando pertencerem a mesma variedade da raça ibérica da Espanha.

Tabela 5. Distâncias genéticas entre os grupos genéticos estudados. Valores de número médio de diferença par-a-par entre grupo genético (dxy) estão acima da diagonal e de divergência nucleotídica (DA) estão abaixo

	EN	DG	RE	LA	CG	JE	MF	GI	RW	JP	BI	MA	AL	CB2	CB1
EN		2,35	2,14	1,99	3,26	2,90	3,11	6,11	3,38	3,71	8,14	2,86	1,54	7,16	2,68
DG	0,20		1,92	1,68	2,72	2,63	2,52	4,79	2,51	3,29	7,61	2,43	1,23	6,75	2,02
RE	0,00	0,23		1,54	2,85	2,44	2,66	5,58	2,90	3,29	7,56	2,31	1,09	6,53	2,04
LA	0,01	0,23	0,01		2,23	2,22	2,28	4,98	2,47	3,21	7,04	1,82	0,91	6,08	2,01
CG	0,48	0,45	0,51	0,13		3,48	3,11	5,70	3,36	4,69	8,09	2,55	2,30	7,34	3,74
JE	0,09	0,34	0,08	0,09	0,54		3,34	6,38	3,88	3,56	8,20	3,27	1,77	6,99	2,58
MF	0,81	0,74	0,80	0,66	0,68	0,88		4,72	1,41	4,50	8,74	2,98	2,00	7,90	3,30
GI	1,16	0,37	1,08	0,72	0,63	1,28	0,13		3,96	7,97	11,07	5,33	4,87	10,4	5,85
RW	2,05	1,70	2,02	1,83	1,90	2,40	0,43	0,35		5,00	9,40	2,81	2,23	8,73	3,61
JP	0,84	0,94	0,86	1,03	1,69	0,54	1,99	2,81	3,45		9,54	4,45	2,54	8,70	3,77
BI	0,90	0,89	0,77	0,48	0,72	0,81	1,85	1,54	3,49	2,08		7,56	7,09	9,91	6,42
MA	0,66	0,74	0,56	0,31	0,21	0,91	1,13	0,84	1,94	2,03	0,77		1,83	6,82	3,14
AL	0,01	0,22	0,00	0,06	0,64	0,08	0,82	1,05	2,02	0,79	0,97	0,75		6,00	1,34
CB2	1,64	1,74	1,45	1,24	1,68	1,31	2,73	2,66	4,54	2,97	0,00	1,75	1,60		4,83
CB1	1,35	1,21	1,16	1,37	2,28	1,10	2,33	2,23	3,61	2,23	0,51	2,27	1,14	0,63	

EN = *entrepelado*; DG = *dorado gacitano*; RE = *retinto*; LA = *lampiño*; CG = *celta gallega*; JE = javali da Espanha; MF = *mulefoot*; GI = *guinea*; RW = *red waffle*; JP = javali de Portugal; BI = bisaro; MA = malhado-de-alcobaça; AL = alentejano; CB2 = casco-de burro 2; CB1 = casco-de-burro 1.

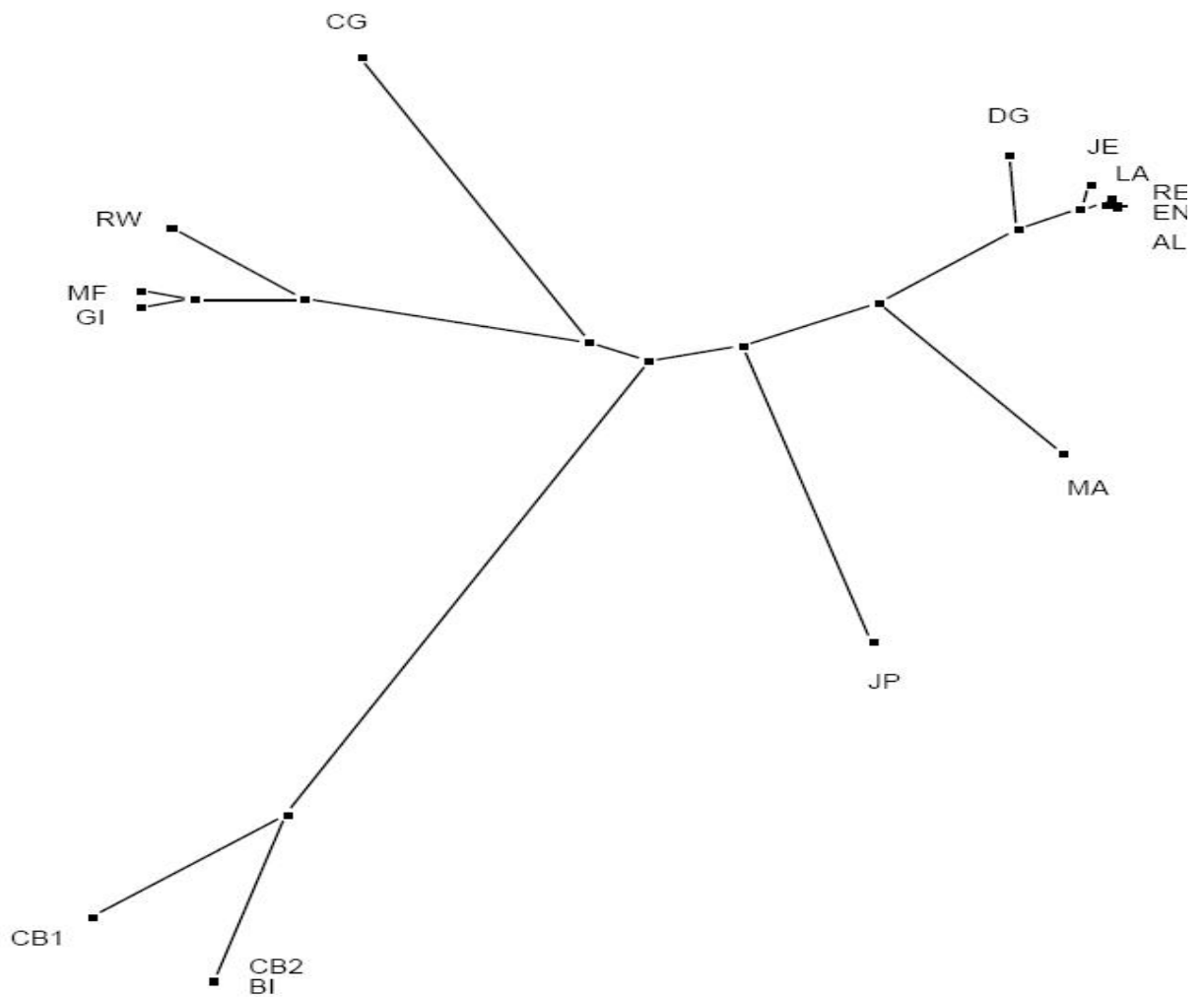


Figura 3. Árvore filogenética, baseada nos valores de divergência nucleotídica, com as populações de suíno oriundas do Brasil [casco-de-burro (CB1 e CB2)], de Portugal [malhado-de-alcobaça (MA), bísara (BI), alentejana (AL) e javali (JP)], Espanha [*lampiño* (LA), *retinto* (RE), *entrepelado* (EN), *dorado gaditano* (DG), *celta gallega* (CG) e javali (JE)] e dos Estados Unidos [*mulefoot* (MF), *guinea* (GI) e *red wattle* (RW)].

4.4 CONCLUSÕES

A análise da região-controle do DNA mitocondrial mostra que a ancestralidade materna dos suínos cascós-de-burro é ibérica, com pequena introgressão de haplótipo de origem asiática.

A hipótese de que os cascós-de-burro do Brasil são oriundos dos suínos *mulefoot* dos Estados Unidos não é sustentada pelas análises do mtDNA, uma vez que os haplótipos encontrados em ambas as populações apresentaram-se distintos, sendo, inclusive, encontrado apenas dois comuns às duas populações, que também foram comuns a outras populações estudadas. O haplótipo mais frequente na população casco-de-burro não foi encontrado nos suínos *mulefoot*, da mesma forma, o mais frequente nestes não foi observado naqueles. Portanto os cascós-de-burro do Brasil formaram-se a partir das raças ibéricas introduzidas no período colonial, tendo origem no Brasil, constituindo-se em um agrupamento nativo, e não naturalizado.

Verificou-se maior relação dos cascós-de-burro com os animais da raça bísara, de Portugal, enquanto os suínos *mulefoot* apresentaram maior relação com os outros animais de raça norte-americana. O haplótipo mais frequente nos cascós-de-burro só foi encontrado na população *dorado gaditano*, da Espanha.

Os níveis de diversidade haplotípica encontrados nas populações selvagens e nas raças domésticas foram, de modo geral, elevados, existindo também diferença genética significativa entre algumas populações estudadas.

4.5 REFERÊNCIAS

AGÜERO, L. M. *et al.* La presencia de pata de mula y mamellas en cerdos criollo cubano del centro genético "San Pedro". **Revista Computadorizada de Producción Porcina**, Havana, v. 15, n. 1, p. 57-59, 2008.

ALVES, E. *et al.* Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among iberian pigs and other domestic and wild pig populations. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 5, p. 319-324, 2003a.

ALVES, E. *et al.* El origen del cerdo ibérico a la luz del análisis del ADN mitocondrial. **Solo Cerdo Ibérico**, Zafra, out., p. 27-32, 2003b.

ALVES, E. *et al.* Tres pesquisas sobre el origen del Manchado de Jabugo. **Información Técnica Económica Agraria**: revista de la Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA), Zaragoza, v. 4, n. 2, p. 308-313, 2008.

BANDELT, H. J. *et al.* Detecting errors in mtDNA data by phylogenetic analysis. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 115, n. 2, p. 64-69, 2001.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BRANCO, M. *et al.* Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed from nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. **Evolution**: international journal of organic evolution, Lancaster, v. 56, n. 4, p. 792-803, 2002.

BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 4, n. 11, p. 900-910, 2003.

BUDOWLE, B. *et al.* Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. **International Journal of Legal Medicine**, Heidelberg, v. 119, n. 5, p. 295-302, 2005.

CARRACEDO, A. *et al.* DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 110, n. 2, p. 79-85, 2000.

CASTRO, G. Situación de los recursos genéticos porcinos locales en Uruguay. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, supl., p. 783-788, 2007.

COBURN, F. D. **Swine in America**: a textbook for the breeder, feeder and student. New York: Orange Judd Company, 1909. 676 p.

CRUZ, F. *et al.* The legacy of domestication: accumulation of deleterious mutations in the dog genome. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 11, p. 2331-2336, 2008.

EDSON, S. *et al.* Naming the dead - Confronting the realities of rapid identification of degraded skeletal remains. **Forensic Science Review**, Birmingham, v. 16, n. 1, p. 63-90, 2004.

EGITO, A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial**: subsídios para a conservação. 2007. 230 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

EPSTEIN, H.; BICHARD, M. Pig. In: MASON, I. L. **Evolution of domesticated animals**, London: Longman, 1984. p. 145-162.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 186-94, 1998.

EWING, B. *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, n. 3, p. 175-85, 1998.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Anckland, v. 1, p. 47-50, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

FANG, M.; ANDERSSON, L. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 273, n. 1525, p. 1803-1810, 2006.

FERREIRA, E. *et al.* Genetic structure of the wild boar population in Portugal: evidence of a recent bottleneck. **Mammalian Biology**, Jena, v. 74, n. 4, p. 274-285, 2009.

GIUFFRÀ, E. *et al.* The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, Bethesda, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GONGORA, J. *et al.* Phylogenetic relationships of Australian and New Zealand feral pigs assessed by mitochondrial control region sequence and nuclear *gpi* genotype. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 33, n. 2, p. 339-348, 2004.

GROSSI, S. F. *et al.* Genetic diversity in wild (*Sus scrofa scrofa*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) pigs and their hybrids based on polymorphism of a fragment of the D-loop region in the mitochondrial DNA. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 5, n. 4, p. 564-568, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARTL D. L.; CLARK A. G. **Principles of population genetics**. 4th ed. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA, 2007. 565 p.

HUANG, Y.; SHI, X.; ZHANG, Y. Mitochondrial genetic variation in Chinese pigs and wild boars. **Biochemical Genetics**, New York, v. 37, n. 11/12, p. 335-343, 1999.

HOELZEL, A. R.; HANCOCK, J. M.; DOVER, G. A. Evolution of the cetacean Mitochondrial D-Loop region. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 8, n. 4, p. 475-493, 1991.

INNAN, H.; KIM, Y. Pattern of polymorphism after strong artificial selection in a domestication event. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, n. 29, p. 10667-10672, 2004.

JONES, G. F. Genetic aspects of domestication, common breeds and their origin. In: ROTHSCHILD M. F.; RUVINSKY, A. (Ed.). **The genetics of the pig**. New York: Wellingford, CAB International, 1998. p. 17-50.

KIJAS, J. M. H.; ANDERSSON, L. A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 52, n. 3, p. 302-308, 2001.

KIM, K. I. *et al.* Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. **Animal Genetics**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 19-25, 2002.

LARSON, G. *et al.* Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 104, n. 39, p. 15276-15281, 2007.

LARSON, G. *et al.* Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centres of pig domestication. **Science**, Washington, v. 307, n. 5715, p. 1618-1621, 2005.

LARSON, G. *et al.* Patterns of East Asian pig domestication, migration, and turnover revealed by modern and ancient DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 17, p. 7686-7691, 2010.

LEMUS-FLORES, C. *et al.* Genetic analysis of Mexican hairless pig populations. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 79, n. 12, p. 3021-3026, 2001.

LEMUS-FLORES, C.; ALONSO, M. R.; ALONSO, M. Morphological characteristics in Mexican native pigs. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 197, p. 105-108, 2003.

MARIANTE, A. S. *et al.* Pig biodiversity in Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 52, n. 198, p. 245-248, 2003.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. 2. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. 232 p.

MEYER, S.; WEISS, G.; HAESELER, A. V. Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. **Genetics**, Bethesda, v. 152, n. 3, p. 1103-1110, 1999.

MONTEIRO, S. R. S. **Estudo genético de golfinho comum, *Delphinus delphis*, na Costa Centro/Norte de Portugal**. 2007. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

MORAIS, J. L. P. **Introdução ao estudo da Biologia do Javali (*Sus scrofa* L. 1758) em Portugal**: relatório de estágio. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 1979, 121 p.

NEI, M.; TAJIMA, F. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v. 97, p. 145-163, 1981.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press. 1987. 512 p.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

OKUMURA, N. *et al.* Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. **Animal Genetics**, Oxford, v. 32, n. 3, p. 139-147, 2001.

OSLINGER, A.; MUÑOZ, J. E.; ÁLVAREZ, L. A. Caracterización de cerdos criollos colombianos mediante la técnica molecular RAMs. **Acta Agronómica**, Palmira, v. 55, p. 45-50, 2006.

PAKENDORF, B.; STONEKING, M. Mitochondrial DNA and human evolution. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 6, p. 165-183, 2005.

PINHEIRO, I. **Caracterização genetic do javali na Península Ibérica e das raças suínas portuguesas, bísara e alentejana**. 2005. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade) – Universidade do Porto, Porto, 2005.

RAMÍREZ, O. *et al.* Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, n. 9, p. 2061-2072, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 253 p.

SCANDURA M. *et al.* Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 1745-1762, 2008.

SOUZA, C. A. *et al.* Iberian origin of Brazilian local pig breeds based on cytochrome b (MT-CYB) Sequence. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 759-762, 2009.

STONEKING, M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 67, n. 4, p. 1029-1032, 2000.

TABERLET, P.; BOUVET, J. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, London, v. 255, n. 1344, p. 195-200, 1994.

TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: SMITH, T. B.; WAYNE, R. K. (Ed.). **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford Press University, 1996. 483 p.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

TAMURA, K. *et al.* MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TANAKA, K. *et al.* Mitochondrial diversity of native pigs in the mainland South and South-east Asian countries and its relationships between local wild boars. **Animal Science Journal**, Tokyo, v. 7, n. 4, p. 417-434, 2008.

URSING, B. M.; ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 47, n. 3, p. 302-306, 1998.

YAO, Y. G.; BRAVI, C. M.; BANDEL, H. J. A call for mtDNA data quality control in forensic science. **Forensic Science International**, Amsterdam, v. 141, n. 1, p. 1-6, 2004.

VARGAS, J. D. El cerdo ibérico: una agrupación racial caracterizada por su elevada diversidad genética. **Solo Cerdo Ibérico**, Zafra, n. abr., p. 68, 2008.

WATANOBE, T. *et al.* Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 9, p. 1509-1512, 1999.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-354, 1951.

WU, G. S. *et al.* Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. **Genome Biology**, London, v. 8, n. 11, p. R245, 2007.

CAPÍTULO 5. DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE OS SUÍNOS CASCOS-DE-BURRO E RELAÇÃO FILOGENÉTICA COM POPULAÇÕES IBÉRICAS E NORTE-AMERICANAS POR MEIO DE MARCADOR NUCLEAR DO TIPO MICROSSATÉLITE

Resumo – Objetivaram-se caracterizar geneticamente o grupo de suíno casco-de-burro por meio de 25 microssatélites e verificar sua relação filogenética com populações ibéricas e norte-americanas. Utilizaram-se 110 amostras de casco-de-burro das regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Após genotipagem, calcularam-se o número de alelo por marcador (NA), as frequências alélicas, a heterozigose observada (H_o) e a esperada (H_e), o conteúdo de informação polimórfica (PIC), o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) bem como o F_{is} na população total. Os valores de probabilidade do teste de HWE mostram que apenas 6 dos 25 marcadores apresentaram-se em equilíbrio. Os valores médios observados na população total foram: NA = 9,8; PiC = 0,73; H_e = 0,69; H_o = 0,58; e F_{is} = 0,16. Considerando-se a subdivisão da população nas subpopulações (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste), os valores observados para os índices de fixação foram: 0,10 para F_{is} , 0,09 para F_{st} e 0,18 para F_{it} . As árvores genéticas e a análise de correspondência mostraram, de modo geral, que as populações de casco-de-burro ficaram mais próximas da bísara, de Portugal, e da *duroc*.

Palavras-chave: variabilidade genética, sindactilia, raça nativa.

GENETIC DIVERSITY AMONG MULEFOOT PIGS AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS WITH IBERIAN AND NORTH-AMERICAN POPULATIONS ASSESSED BY NUCLEAR MICROSATELLITE MARKERS

Abstract – This study aimed at genetically characterizing Mulefoot pigs and assessing their phylogenetic relationships with Iberian and North-American populations using nuclear microsatellite markers. A total of 25 microsatellites was used to investigate 110 Mulefoot pig samples from Northeast, Center-West and Southeast Brazil. After genotyping, we calculated the allele number per marker (NA), allelic frequencies, observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, polymorphic information of content (PIC), deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), and F_{is} for the total population. Probability values of the Hardy-Weinberg equilibrium test showed that only 6 out of the 25 markers were in equilibrium. The mean values of the genetic variability parameters observed for the 25 microsatellites in the total population were: NA = 9.8, PIC = 0.73, H_e = 0.69, H_o = 0.58, and F_{is} = 0.16. Considering the three studied subpopulations (northeastern, center-western, and southeastern), the values observed for the fixation indices were: 0.09 for F_{is} , 0.10 for F_{st} , and 0.18 for F_{it} . The genetic trees and correspondence analysis showed that the Brazilian Mulefoot subpopulations are closer to the Bísara (from Portugal) and Duroc pigs.

Key words: genetic variability, syndactyly, native breed.

5.1 INTRODUÇÃO

Os marcadores nucleares do tipo microssatélites são importantes nos estudos de genética de população e das relações de paternidade e parentesco genético devido à codominância, à abundância nos genomas e ao alto nível de polimorfismo. Eles têm sido amplamente utilizados na caracterização de várias raças suínas, incluindo as europeias (LAVAL *et al.*, 2000; MARTINÉZ *et al.*, 2000; SANCRISTÓBAL *et al.*, 2006), chinesas (LI *et al.*, 2000; FAN *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005), africanas (SWART *et al.*, 2010) e americanas (CANUL *et al.*, 2005; CASTRO *et al.*, 2007; SOLLERO *et al.*, 2009).

No estudo de genética de população, aquele marcador permite a identificação de cada alelo por *locus*, a obtenção de dado populacional e o cálculo das frequências alélicas, a partir das quais pode-se estimar distância genética entre população e até mesmo entre indivíduo (BOWCOCK *et al.*, 1994; REVIDATTI, 2009) assim como realizar análises filogenéticas (OLIVEIRA, 2007; MARTÍNEZ *et al.*, 2007; VALIENTE, 2007; QI *et al.*, 2009). Pelas razões apresentadas, os microssatélites vêm sendo utilizados em diversos estudos genéticos, principalmente nos de diversidade de raça ameaçada com vistas à sua conservação (BAUMUNG *et al.*, 2004; FRANKHAM *et al.*, 2008; SOLLERO *et al.*, 2009), nos de construção de mapa genético (MARENCO, 2009), nos de detecção de QTL (PIRES *et al.*, 2008) como também nos estudos de análise de paternidade (PANZARDI, 2006).

O uso dos microssatélites se deu devido à reação da polimerase em cadeia (SAIKI *et al.*, 1985; MULLIS & FALOONA, 1987), que abriu caminho para BECKMANN & SOLLER (1990) desenvolverem a técnica que envolve esses marcadores. BAUMUNG *et al.* (2004) relataram que eles têm sido preferidos em 90% das pesquisas de diversidade de espécie de interesse zootécnico. Além disso, a abordagem estatística associada aos microssatélites desenvolveu-se rapidamente, e sua aplicação tem permitido conquistas revolucionárias na área da genética de população e de conservação de raça.

Com boa quantidade de *locus* analisado, os microssatélites podem dar boa aproximação da filogenia (FARID *et al.*, 2000; MAUDET *et al.*, 2002a; ROCHA, 2009). Assim, este capítulo tem como objetivos caracterizar geneticamente o grupo de suíno casco-de-burro por meio de marcador nuclear do tipo microssatélite e verificar sua relação genética com populações ibéricas e norte-americanas.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostras

Utilizaram-se 110 suínos com o fenótipo casco-de-burro neste estudo. Esses animais eram oriundos da região Nordeste (estado da Paraíba, 46 animais), Centro-

Oeste (estado do Mato Grosso, 29 animais) e Sudeste (estado de Minas Gerais, 35 animais) do Brasil.

5.2.2 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir da mancha de sangue armazenada nos cartões FTA, usando-se pequenas áreas do cartão (1-2 mm²) e seguindo-se o método de extração fenol-clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989).

5.2.3 Microssatélites utilizados

Utilizou-se um painel de 27 microssatélites (Tabela 1), selecionados e recomendados pelo comitê de especialista da FAO/ISAG (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/International Society of Animal Genetics*) para estudo de diversidade genética em suíno (FAO, 1998).

Tabela 1. Microssatélites recomendados pela FAO (1998) para estudo de biodiversidade em suíno

Micro.	Cro.	Flu.	iniciadores (3'-5'): Direto*	Reverso
CGA	1p	HEX	GAACTTTCACATCCCTAAGGTCGT	ATAGACATTATGTCCGTTGCTGAT
IGF1	5	6FAM	GCTTGGATGGACCATGTTG	CATATTTTTCTGCATAACTTGAACCT
S0002	3q	HEX	GAAGCCCAAAGAGACAAGTGC	GTTCTTTACCCACTGAGCCA
S0005	5	TET	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA	GCACTTCCTGATTCTGGGTA
S0026	16	HEX	AACCTTCCCTTCCCAATCAC	CACAGACTGCTTTTTACTCC
S0068	13	TET	CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	AGTGGTCTCTCCTCCTTGGCT
S0090	12	6FAM	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA	GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG
S0101	7	HEX	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG	GTCTCCCTCACACTTACCGCAG
S0155	1q	6FAM	TGTTCTCTGTTTCTCCTCTGTTT	AAAGTGAAAGAGTCAATGGCTAT
S0178	8	TET	TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG	GGCACCAGGAATCTGCAATCCAGT
S0215	13	HEX	TAGGCTCAGACCCTGCTGCAT	TGGGAGGCTGAAGGATTGGGT
S0218	X	TET	GTGTAGGCTGGCGGTTGT	CCCTGAAACCTAAAGCAAAG
S0225	8	HEX	GCTAATGCCAGAGAAATGCAGA	CAGGTGGAAGAATGGAATGAA
S0226	2q	6FAM	GCACTTTTAACTTTTATGATACTCC	GGTTAAACTTTTNCCTCAATACA
S0227	4	HEX	GATCCATTTATAATTTTAGCACAAG	GCATGGTGTGATGCTATGTCAAGC
S0228	6	TET	GGCATAGGCTGGCAGCAACA	AGCCACCTCATCTTATCTACTACT
S0355	15	6FAM	TCTGGCTCCTACTCCTTCTTGATG	TTGGGTGGGTGCTGAAAAATAGGA
S0386	11	TET	TCCTGGGTCTTATTTTCTA	TTTTTATCTCCAACAGTAT
SW122	6	HEX	TTGTCTTTTTATTTTGGCTTTTGG	CAAAAAAGGCCAAAAGATTGACA
SW24	17	TET	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC	ATCCAAATGCTGCAAGCG
SW240	2p	6FAM	AGAAATTAAGTGCCTCAAATTGG	AAACCATTAAGTCCCTAGCAAA
SW632	7	TET	TGGGTTGAAAGATTTCCCAA	GGAGTCAGTACTTTGGCTTGA
SW72	3p	TET	ATCAGAACAGTGCGCCGT	TTTGAAAATGGGGTGTTC
SW857	14	HEX	TGAGAGGTCAGTTACAGAAGACC	GATCCTCCTCCAAATCCCAT
SW911	9	6FAM	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC	CATCTGTGGAAAAAAAAGCC
SW936	15	6FAM	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC	GTGCAAGTACACATGCAGGG
SW951	10	6FAM	TTTCACAACTCTGGCACCAG	GATCGTGCCCAAATGGAC

Micro: Microssatélite; cro: Cromossomo; e flu: Fluorocromo. *Os iniciadores diretos são marcados com os fluorocromos.

5.2.4 Amplificação das sequências dos microssatélites

Os microssatélites foram amplificados por PCR. Realizaram-se várias reações *multiplex* (Tabela 2), no intuito de reduzir o número de reação e o custo do experimento. As reações da PCR foram preparadas em placas de 96 poços, estando as condições de amplificação na Tabela 2, enquanto a quantidade dos reagentes utilizados, na Tabela 3.

Tabela 2. Condições das ampliações dos microssatélites

Micro.	Gel (*)	MgCl ₂ (mM)	Tamanho	T.A. (°C)	Multiplex
CGA	I	2,5	250-320	55	M1
S0068	I	2,5	211-260	55	M1
S0101	I	2,5	197-216	55	M2
S0215	I	2,5	135-169	55	M2
SW911	I	2,5	153-177	55	M2
SW936	I	2,5	80-117	55	M2
SW632	I	2,5	159-180	55	M3
SW24	I	2,5	96-121	55	M3
S0355	I	3	243-277	55	<i>Singleplex</i>
S0227	II	4	231-256	55	M4
S0225	II	4	170-196	55	M4
S0226	II	4	181-205	55	M4
S0228	II	4	222-249	55	M4
SW122	II	2,5	110-122	55	M5
S0090	II	2,5	244-251	55	M5
SW591	II	2,5	125-133	55	M5
S0178	II	2,5	110-124	55	M5
S0218	II	2	164-184	55	<i>Singleplex</i>
S0005	III	2,5	205-248	55	M6
S0002	III	2,5	190-216	55	M6
IGF1	III	2,5	197-209	55	M6
SW72	III	2,5	100-116	55	M7
SW857	III	2,5	144-160	55	M7
S0026	III	2,5	92-106	55	M7
S0155	III	2,5	150-166	55	M7
SW240	III	2,5	96-115	55	M7
S0386	III	3	156-174	48	<i>Singleplex</i>

Micro: Microssatélite. T.A: Temperatura de pareamento. M1 = múltiplex 1; M2 = múltiplex 2; etc. (*) A FOA/ISAG propõe três lotes de nove microssatélites cada para correr juntos no mesmo gel, no caso de utilizar um sequenciador automático com tecnologia de quatro cores.

Tabela 3. Componentes da reação da PCR e suas respectivas quantidades

Reagentes	Quantidade
DNA	5 μ l
PCR buffer 10X	1,2 μ l
MgCl ₂	2 a 4 μ l (Tabela 2)
dNTP	0,25 μ l (200 μ M de cada)
Taq	0,2 μ l (0,5 U)
Iniciador	1 μ l de cada (0,25 μ mol de cada)
H ₂ O ultrapura	Completar até o volume final
Volume final	25 μ l

5.2.5 Detecção de polimorfismo por gel de policrilamida

5.2.5.1 Elaboração do gel

Para o preparo do gel, utilizaram-se TBE e o kit comercial ReproGel®377 da GE Healthcare, que contém solução A (12% acrilamida/bisacrilamida) e B, com agente desnaturante (ureia) e com indicador para luz ultravioleta. Preparou-se uma mistura composta por 10 ml da solução A e 10 ml da B, que era aplicada, para a polimerização, em placa de cristal devidamente limpa para não haver interferência na hora da leitura das fluorescências, com um pente de 50 poços. Quando pronta, essa placa de cristal era submetida à luz ultravioleta até a polimerização do gel, que ocorria em torno de 35 min. Em seguida, preparava-se o tampão de corrida, TBE.

Na sequência, as amostras eram preparadas misturando-se as resultantes das diferentes PCR de acordo com a Tabela 2, de forma que fosse possível analisar, em cada gel, nove microssatélites (Figura 1). Dessa maneira, para analisar os 27 microssatélites em cada amostra, eram realizadas apenas três eletroforeses. Utilizavam-se 1,5 μ l da amostra misturada (*Mix*) e 2 μ l de tampão de corrida (1000 μ l de formamida deionizada, 200 μ l de azul dextrano e 100 μ l do padrão Genescan 400HD-ROX). Em seguida, a amostra era desnaturada a 95 °C durante cinco minutos, sendo, logo em seguida, aplicada na placa de cristal com o gel polimerizado.

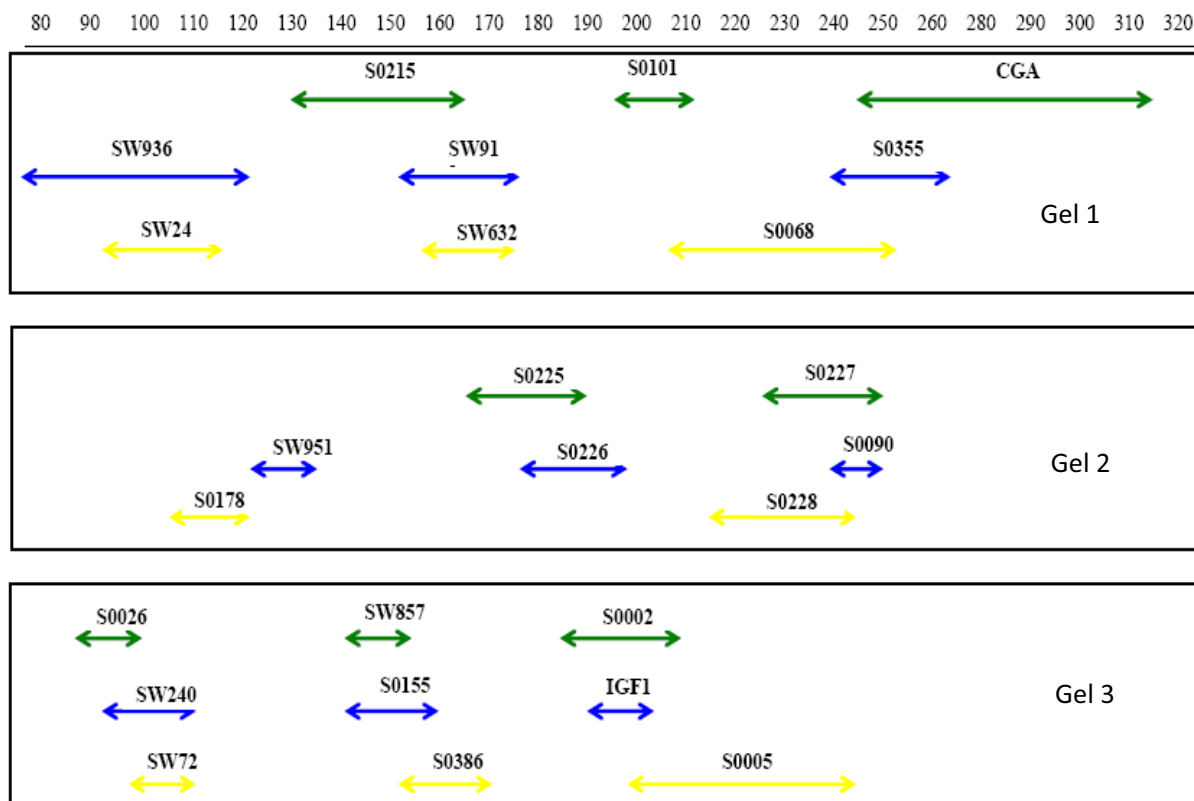


Figura 1. Esquema dos três géis com as posições relativas dos microssatélites (Tabela1) em cada um deles

5.2.5.2 Eletroforese e genotipagem das amostras

Uma vez polimerizado e carregado o gel, este era colocado no sequenciador automático ABI Prism®377 (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), enchendo-se, com tampão TBE 1X, as cubas eletroforéticas superior e inferior (Tabela 4) e ajustando-se as condições elétricas recomendadas pelo fabricante, para se realizar, por tamanho, a separação dos fragmentos amplificados na PCR.

Na sequência, analisaram-se os dados do sequenciador com o programa *Genescan Analysis (Genescan 672 v.2.0.2)*, que fornece informações do tamanho dos fragmentos estudados.

O emprego do sequenciador automático e das aplicações informáticas citadas oferecem possibilidade de marcar os iniciadores com fluorocromos de três cores diferentes (azul, verde e amarelo), usando-se, ainda, outro fluorocromo, de cor vermelha, para marcar um padrão de tamanho (Tabela 4, Figura 2).

Tabela 4. Fluorocromos (Fluor.) utilizados para marcar os iniciadores e suas respectivas cores de emissão com o jogo de filtro B no sequenciador ABI 373 Stretch

Fluor.	Nome químico	Cor de emissão
TET	4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína	Verde
6-FAM	6-carboxifluoresceína	Azul
HEX	4,7,2',4',5'7'-hexacloro-6-carboxifluoresceína	Amarelo
TAMRA	N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxiroadamina	Vermelho

Os fluorocromos são substâncias que, excitadas por um raio laser de comprimento de onda apropriada, emitem fluorescência. Cada fluorocromo tem um máximo de emissão em um leque de comprimento de onda. Usando-se o sistema de filtro adequado (Filtro B no caso do presente trabalho), o aparato detecta cada fluorocromo em seu leque de comprimento de onda ótima e mostra um sinal fluorescente na cor correspondente. Dessa forma, otimiza-se o rendimento do gel, pois se podem correr, no mesmo poço, vários microssatélites de mesmo tamanho e marcados com três fluorocromos diferentes.

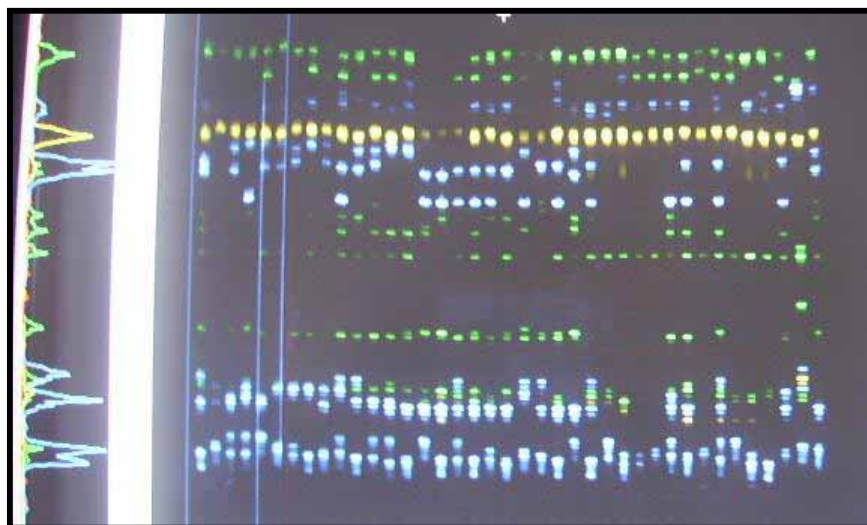


Figura 2. Visualização dos produtos de amplificação do gel

O padrão utilizado é uma coleção de fragmento de DNA de tamanho conhecido e marcado com um fluorocromo diferente dos usados para marcar os iniciadores dos microssatélites. O programa *Genescan Analysis* constrói curvas de regressão em função dos tamanhos do padrão, atribuindo, a cada banda-problema, o tamanho em função dessas curvas.

O padrão de tamanho utilizado foi o *Genescan 350-TAMRA*, que é útil para calcular fragmentos entre 35 e 350 nucleotídeos. Este era preparado comercialmente, mediante a digestão com *Pst* 1 de um plasmídeo de DNA, seguido de reação de ligamento com oligo-desoxi-nucleotídeo marcado com *TAMRA* e posterior digestão com *BstU* 1, produzindo fragmentos de vários tamanhos, 35, 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340 e 350, marcados com *TAMRA*.

Uma vez que se tem o tamanho de cada banda, procede-se a selecionar as que representem uma variante ou alelo e a descartar as secundárias e inespecíficas. Esse trabalho implica certa dificuldade em alguns marcadores, porque o efeito de banda-sombra ou “gaga” (Figura 3) é característico de microssatélite de variação baseada em repetição de grupo de duas bases, como é o caso dos que foram utilizados neste trabalho. Nesse caso, o critério seguido foi observar os gráficos de cada grupo de banda e selecionar o pico correspondente ao fragmento de maior comprimento do

grupo de fragmento que compõe o alelo e que deverá coincidir com o de maior intensidade de sinal.

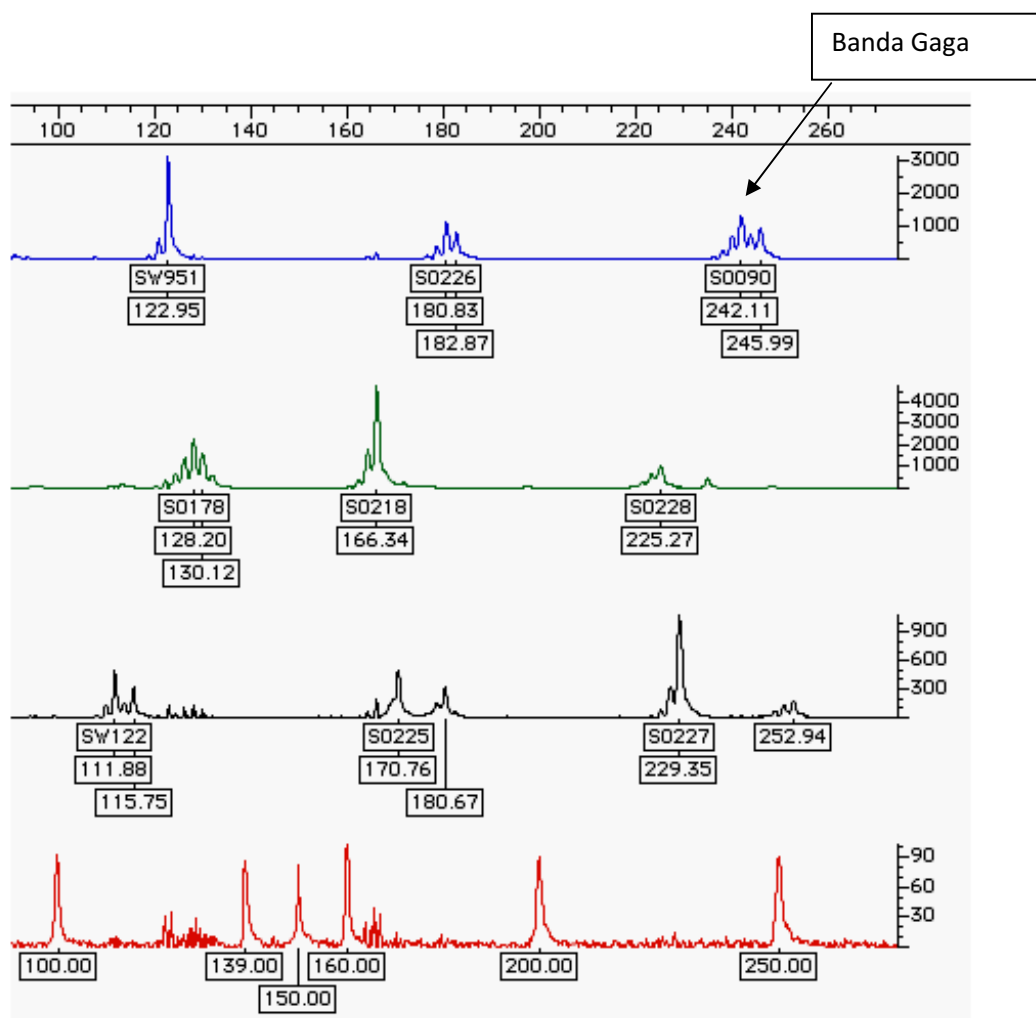


Figura 3. Genotipagem dos diferentes alelos presentes em cada um dos microssatélites, com destaque para a banda “gaga”. Em vermelho, o padrão de tamanho Genescan 350-TAMRA

Os indivíduos heterozigotos com dois alelos separados por um par de base apresentam-se com uma imagem de sobreposição de seu grupo de pico; nesse caso, é muito importante comparar a forma da curva de intensidade do sinal dos primeiros picos em relação à curva característica de um indivíduo homozigoto.

Usando-se o programa *Genotyper*, analisaram-se os gráficos das bandas obtidas com o programa *Genescan* e identificaram-se os diferentes alelos presentes em cada microssatélite.

Há, contudo, duas fontes de erro em que é aconselhado empregar uma denominação alélica, e não o tamanho do fragmento calculado pelo programa (MARTINÉZ, 2001). Para a primeira, o protocolo que se seguiu para atribuir o tamanho foi construir duas curvas de regressão ao redor de cada pico detectado. Uma delas inclui as duas bandas do padrão de tamanho, a imediatamente superior e a imediata inferior; a outra se calcula tomando-se como referência as duas inferiores e a primeira superior. Na sequência, atribuiu-se o tamanho médio dos alelos obtidos em cada caso. Na prática, observa-se que o cálculo do escalonamento dos alelos de um marcador não é exatamente duas bases, mas, frequentemente, 2,2. Assim, se o alelo menor fosse 130,00 pares de base, o seguinte seria 132,20, enquanto o quinto não seria 140,00, e sim 141,00. Para não se trabalhar com decimal, sabendo-se que o número de nucleotídeo é absoluto, a solução é atribuir, a cada alelo, uma denominação numérica ou alfanumérica, que, além disso, facilitará o trabalho posterior de tratamento estatístico dos dados obtidos.

Por isso procedeu-se a classificar cada alelo identificado com uma letra. O critério seguido – pois não há uma denominação internacional padrão – foi a observação de várias análises, atribuindo-se a letra M ao alelo de tamanho intermédio dos obtidos para cada marcador nas amostras analisadas. Ao resto dos alelos, presentes ou não, reservou-se uma letra sucessiva em tamanho de duas em duas bases.

A outra fonte de erro produz-se ao se compararem os resultados das diferentes eletroforeses, pois sempre há pequenas variações que podem originar, posteriormente, erro nos cálculos, que, quando se aproxima de um único par de base, traz grande dúvida na identificação alélica. Então, seguindo o exemplo anterior, se o primeiro alelo tem um pico de 131,00 no lugar de 130,00, é muito difícil saber se é o alelo 130 ou o 132 das outras tantas eletroforeses.

Corrigiu-se esse erro, no entanto, com o uso, em todos os géis, de duas amostras-controle. Dessa forma, se o menor alelo era o 130, mas o cálculo nesse gel apontava 131, a amostra-controle era também 131, com a qual se pôde corrigir facilmente a denominação dos demais alelos. As amostras-controle não só eram usadas para padronizar a eletroforese mas também para se ter controle da amplificação em cada gel, por isso eram utilizadas em cada grupo de 46 amostras. A vantagem de utilizar duas amostras-controle em vez de uma é que se obtêm mais alelos de um mesmo microssatélite, diminuindo a probabilidade de que um desacerto na amplificação ou na corrida do gel recaia sobre as duas amostras-controle, com o que não se poderia genotipar o grupo.

Finalmente, selecionaram-se 25 marcadores do painel de 27 proposto pela FAO (1998), desprezando-se dois marcadores, devido a problemas com a amplificação de um deles e por dificuldade de interpretação do padrão de banda do outro.

5.2.6 Tratamento estatístico dos dados

Os parâmetros mais comuns derivados dos dados de genótipo são os cálculos de frequência alélica, heterozigose e distância genética, sendo a adaptação das tabelas de resultado ou genótipo às exigências de cada uma das aplicações informáticas empregadas para o tratamento estatístico um dos trabalhos mais tediosos.

5.2.6.1 Cálculo das frequências alélicas

O cálculo das frequência alélicas foi realizado por contagem direta dos alelos presentes no total da amostra como também por subpopulação, assumindo-se que a observação de um só alelo corresponde à condição de homozigose, portanto assumindo que não há alelo nulo, tampouco não amplificado.

Fala-se de alelo nulo quando este não pode ser amplificado por PCR, devido, principalmente, a uma mutação no sítio de pareamento do iniciador, por isso um dos alelos não se amplifica, sendo o indivíduo classificado como homozigoto (DAWSON *et al.*, 1997).

A presença desse tipo de alelo é difícil de ser detectada quando sua frequência na população é baixa e quando não se dispõe de informação genealógica confiável. Sua determinação é possível se se apresentar, de fato, em homozigose, uma vez que não se obteria produto amplificado de tal indivíduo para esse *locus* (MÉNDEZ, 2002).

Para solucionar o problema dos alelos nulos, pode-se, entretanto, desenhar iniciadores alternativos fora do sítio de mutação, voltando a analisar todos os indivíduos que tinham sido classificados como homozigotos. Deve-se, contudo, evitar marcadores relatados como portadores de alelo nulo em certa população, uma vez que podem dar problemas desse tipo (NEUMANN & WETTON, 1996; DAWSON *et al.*, 1997).

Assim, as frequências alélicas dos 25 *loci* foram determinadas usando-se o programa GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

5.2.6.2 Análises de heterozigose

O cálculo da heterozigose foi obtido tanto para o conjunto de marcador quanto para cada um deles individualmente, no total das amostras de casco-de-burro e para cada subpopulação, usando-se o programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2003).

Obtiveram-se os resultados para a heterozigose esperada (H_e) como também por contagem direta de heterozigoto, ou seja, observada (H_o). No primeiro caso, calculou-se a partir das frequências alélicas, supondo-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo a heterozigose esperada (H_e) para um *locus* expressa pela seguinte fórmula:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k x_i^2$$

em que x_i é a frequência do alelo i ; e k é o número de alelo.

Essa estimativa diferirá da heterozigose observada (H_o) no caso de população que não se encontre em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

5.2.6.3 Conteúdo de informação polimórfica (PIC)

Esse parâmetro, descrito por BOTSTEIN *et al.* (1980), é um indicador da utilidade do marcador em estudo genético (segregação, identificação de população e controle de paternidade). Usando-se o programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2003), calculou-se o PIC, que pode ser obtido por meio da fórmula proposta por BOTSTEIN *et al.* (1980):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

em que k é o número de alelo; enquanto x_i e x_j são as frequências dos alelos i e j respectivamente.

Consideram-se os valores de PIC acima de 0,5 muito informativos; razoavelmente informativos os compreendidos entre 0,25 e 0,50; e pouco informativos os inferiores a 0,25 (BOTSTEIN *et al.*, 1980).

5.2.6.4 Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE)

Uma avaliação de grande importância é a verificação da existência da condição de equilíbrio numa determinada população. Caso isso ocorra, é indicativo de que a mesma não está sujeita à pressão de seleção nem ao fluxo de migração, sendo as mutações desprezíveis. Tendo informações sobre as frequências genotípicas, pode-se verificar a condição de equilíbrio.

A forma clássica de comprovar o equilíbrio das populações baseia-se na comparação dos genótipos observados com os esperados dentro de cada *locus*. Porém, no caso dos microssatélites, que possuem grande número de alelo por *locus*, o número de genótipo possível é tão elevado que algumas frequências genotípicas são zero, principalmente quando as frequências alélicas são muito baixas. Esse fenômeno é uma das limitações do teste de qui-quadrado para testar o equilíbrio.

Mesmo que cada subpopulação se apresente em HWE, as frequências genóticas da população inteira podem desviar-se das proporções esperadas. Essa propriedade foi notada inicialmente por WAHLUND (1928), sendo denominada Efeito ou Princípio de Wahlund.

Nos estudos de variação genética, deve-se determinar se há desvios significativos de HWE nos *loci* estudados. Se a proporção de genótipo para um *locus* não está em HWE em algumas populações, pode-se suspeitar de que houve uma seleção que afetou o tal *locus* ou a existência de alelo nulo. Ao contrário, se uma população desvia-se significativamente do HWE para um número independente de *locus*, deve-se isso, possivelmente, ao fato de, entre outras coisas, poder existir subdivisão intrapopulacional.

Se a população estiver em HWE, um método muito exato é comparar a distribuição dos genótipos observados com a distribuição esperada, uma vez que qualquer desvio significativo indicará que a população está subdividida, que existe uma consanguinidade significativa, que o acasalamento não é aleatório ou que existe um fluxo de gene de outra população.

No caso dos microssatélites, essas circunstâncias podem, no entanto, ser estudadas usando-se testes exatos ou procedimentos de proporção de verossimilhança, devido ao grande número de alelo por *locus* e, portanto, ao elevado número de genótipo possível. Com essa finalidade, podem-se usar aplicações informáticas que realizem a enorme quantidade de cálculo que as probabilidades exatas requerem. Na atualidade, existem três métodos mais comuns para realizar um cálculo não viesado da probabilidade de que os dados estejam compatíveis com o HWE.

a) Teste qui-quadrado (χ^2)

Usa-se o teste estatístico χ^2 para detectar a divergência das frequências genóticas para cada combinação *locus*/população. Com esse procedimento, obtêm-se resultados aceitáveis somente quando o tamanho da amostra é grande e o número de alelo por *locus* é pequeno.

Esse inconveniente, contudo, pode ser evitado usando-se potentes programas de bioestatística que gerem uma distribuição simulada da população a partir dos genótipos observados, como a simulação de Monte Carlo, que gera genótipos hipotéticos, combinando aleatoriamente alelos presentes na amostra, realizando essa operação muitas vezes (1.000 geralmente), produzindo, assim, uma série de população nova, que é testada para o HWE por meio do cálculo de χ^2 . Toda vez que a proporção do valor de χ^2 excede a do observado, é verificada a probabilidade de se errar ao rejeitar a hipótese nula (não há desvio de HWE). Também é possível usar algoritmos em cadeia de Markov para o cálculo não viesado da probabilidade exata (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

b) Probabilidade de verossimilhança

Baseia-se no uso de um teste de proporção de verossimilhança (SOKAL & ROHLF, 1981), aplicado segundo o método de WEIR (1990), calculando-se com o mesmo método de permutação de fluxo de alelo descrito no item “a”.

c) Teste exato ou de probabilidade de Fisher

O teste descrito por LOUIS & DEMPSTER (1987) consiste em observar os possíveis lotes de frequência genotípica para um determinado lote de frequência alélica, rejeitando-se a hipótese de HWE se as frequências genotípicas forem significativamente diferentes das esperadas por mero acaso. Se houver mais de quatro alelos por *locus*, realiza-se o cálculo não viesado da probabilidade de HWE usando-se o método em cadeia de Markov, com 1.000 iterações (GUO & THOMPSON, 1992).

Esse cálculo foi realizado neste trabalho tanto na população total quanto nas subpopulações, usando-se o programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2003). Para tal, realizou-se o teste exato de Fisher (GUO & THOMPSON, 1992) conforme descrito no item “c”.

5.2.6.5 Diferenciação genética entre as subpopulações de casco-de-burro

a) Cálculo de índice de fixação (estatística F)

WRIGHT (1965) propõe medir os desvios das frequências genóticas em população subdividida por meio de três parâmetros (F_{IS} , F_{IT} e F_{ST}), que apresentam a seguinte relação: $1 - F_{IT} = (1 - F_{IS})(1 - F_{ST})$.

O cálculo das estatísticas F de Wright foi realizado neste trabalho usando-se o programa de genética de população GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2003), que o calcula a partir das frequências alélicas e genóticas segundo método de WEIR & COCKERMAN (1984).

b) Cálculo de coeficiente de diferenciação genética G_{ST}

A magnitude relativa da diferenciação genética entre as subpopulações pode também ser medida pelo coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}), que é análogo ao F_{ST} :

$$G_{ST} = 1 - \frac{He_S}{He_T}$$

em que:

He_S : diversidade genética ou heterozigose esperada nas subpopulações;

He_T : diversidade genética ou heterozigose na população total (NEI, 1973).

Esse parâmetro (G_{ST}) foi calculado também por meio do programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2003).

c) Cálculo de diferenciação genética entre duas populações (*Pairwise* F_{ST})

Outro método estatístico utilizado neste estudo para avaliar o grau de diferenciação genética entre as populações estudadas foi a estimativa do parâmetro F_{ST} (WRIGHT, 1951), que, através da combinação de várias medidas de heterozigose a diferentes níveis, permite uma descrição detalhada da estrutura populacional (HARTL & CLARK, 2007). Esse parâmetro foi calculado por meio de 1.023 permutações

paramétricas entre as populações usando-se o programa ARLEQUIN (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

d) Estrutura genética

A estrutura das subpopulações de casco-de-burro bem como de todas as populações amostradas foi avaliada utilizando-se de duas abordagens: (i) análise fatorial de correspondência, usando-se o programa GENETIX (BELKHIR *et al.*, 2003) e seguindo-se as configurações padrões; e (ii) algoritmos bayesianos por meio do programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000).

A aplicação STRUCTURE utiliza uma aproximação *Bayesiana* – para determinar o arranjo dos dados com probabilidade posterior (probabilidade condicionada aos valores dos parâmetros e à distribuição dos dados) em um universo de arranjos simulados por permutação dos dados – e um algoritmo baseado numa MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*). Esse algoritmo reúne os indivíduos em agrupamentos ao mesmo tempo que estima a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada um dos agrupamentos inferidos. No caso do modelo incluindo miscigenação (FALUSH *et al.*, 2003), em vez de probabilidade de pertença, são estimadas as proporções Q , do genótipo do indivíduo, provenientes de cada agrupamento. Essa abordagem assume a existência de k agrupamentos, em que k pode ser desconhecido, caracterizados por diferentes distribuições de frequências alélicas e que são definidas com base na otimização das condições de HWE e de equilíbrio de ligação intrapopulacional (PRITCHARD *et al.*, 2000). O modelo permite a introdução de informação *a priori* sobre alguns dos parâmetros e a variação de condições como existência ou não de correlação entre as distribuições de frequências alélicas, miscigenação entre as populações, sendo possível simular diferentes graus de miscigenação para as várias populações.

Os testes foram realizados com base no modelo de miscigenação (*admixture model*). Para escolher o número apropriado de população inferida (K), foram realizadas várias análises variando de 2 a 6 e 500.000 interações (período *burn-in* de 50.000), com 5 repetições independentes para cada uma das análises. Os valores reais de K foram obtidos a partir da magnitude de ΔK , seguindo-se o proposto por EVANNO *et al.* (2005).

5.2.6.6 Análises filogenéticas entre as populações

Iniciou-se o estudo da distância genética entre as populações estudadas, mas só foram utilizadas neste capítulo as populações que possuíam 30 indivíduos no mínimo (Tabela 1 do Capítulo 2). Então utilizaram-se, além das três subpopulações de casco-de-burro, três variedades da raça ibérica da Espanha (*retinto*, *lampiño* e *entrepelado*) e a *celta gallega* também da Espanha, assim como a alentejana e a bísara, de Portugal. Dos Estados Unidos, a *mulefoot*, bem como as internacionais *large white*, *landrace* e *duroc*.

Na literatura, encontram-se diferentes medidas de distâncias genéticas, tais como as de BALAKRISHNAN & SANGHVI (1968), de JUKES & CANTOR (1969), de NEI (1972), de NEI *et al.* (1983), de ROGERS (1972), de Kimura, com dois parâmetros (KIMURA, 1980), de REYNOLDS *et al.* (1983), de TAMURA & NEI (1993), entre outras. Essas distâncias genéticas podem ser calculadas com base em diferentes algoritmos e indicam o grau de proximidades entre as populações, além de permitirem a reconstrução das relações históricas e filogenéticas.

Contudo elegeram-se duas distâncias para este estudo. A D_A (NEI *et al.*, 1983), que é recomendada por TAKEZAKI & NEI (1996) para distâncias genéticas baseadas em microssatélites, e a de REYNOLDS *et al.* (1983), que é, segundo EDING & LAVAL (1998), adequada para tempos curtos de divergência.

5.2.6.7 Construção de árvore de distância genética

Com as matrizes de distância calculadas, foram construídas árvores de distância que demonstram as relações genéticas entre as populações suínas usando-se o pacote estatístico Populations v.1.2.28 (Olivier Langella, <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/>). Essas árvores foram visualizadas com a utilização do programa Treeview (PAGE, 1996).

Para a construção das árvores, utilizaram-se tanto o algoritmo UPGMA (SNEATH & SOKAL, 1973) – que se baseia na matriz de distância genética e realiza uma média aritmética das medidas, reduzindo o erro no comprimento dos ramos (NEI, 1987) – quanto o algoritmo *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987) – que apresenta uma

eficiência confiável, seja em relação à topologia construída seja na sua performance, para dados baseados em distância –, sendo a confiança das árvores obtidas determinada por meio de um teste de replicação (*bootstrapping*), com 1.000 reamostragens, com substituição dos *loci* (FELSENSTEIN, 1985).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 5, apresentam-se o número de alelo observado (NA), a heterozigose esperada (He) e a observada (Ho) bem como o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e o desvio às condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg para os 25 *loci* de microssatélite utilizados.

A média e o desvio-padrão do número de alelo observado para a população de casco-de-burro (N = 110) foram $9,8 \pm 4,4$. Todos os *loci* foram polimórficos, e o número de alelo por *locus* variou de 5 (microssatélites S0026) a 22 (S0005). Nesse sentido, BARKER (1994) sugeriu que os *loci* de microssatélite usados em estudos de distância genética não devem ter menos de quatro alelos. Portanto os utilizados neste estudo, a princípio, são apropriados para as análises de diversidade genética dessa população, visto que todos apresentaram mais de quatro alelos.

O valor médio de alelo por *locus* foi superior aos reportados em raça espanhola, como nas variedades da raça ibérica, que oscilou entre 3,4 para a variedade *dorado gaditano* e 5,84 para a *entrepelado* (MARTINÉZ, 2001). Foram superiores aos valores médios reportados para outras raças europeias, que oscilaram entre 4,5 e 5,3 (SANCRISTÓBAL *et al.*, 2006; VICENTE, 2006). São superiores ainda às raças crioulas do Uruguai (KELLY *et al.*, 2004; CASTRO *et al.*, 2007), a outros porcos nativos americanos, como o *pelón* mexicano (7,07) e o cubano (8,2) (CANUL *et al.*, 2005; PINEDA, 2005). Todavia são inferiores à amplitude de valores médios encontrados nas raças chinesas, que vai desde 2,9 até 24,8 alelos (LI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2003).

Tabela 5. Diversidade genética da população de casco-de-burro por meio dos 25 microssatélites utilizados. Número de alelo observado (NA), heterozigose esperada (He), heterozigose observada (Ho), conteúdo de informação polimórfica (PIC), número efetivo de alelo (Ne), riqueza alélica (RA), consanguinidade na população total (F_{is}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EWH)

<i>Loci</i>	NA	He	Ho	PIC	Ne	RA	F_{is}	EWH
CGA	18	0,87	0,64	0,86	7,56	16,2	0,16	*
S0101	7	0,70	0,63	0,66	3,22	6,93	0,10	*
S0215	8	0,30	0,34	0,29	1,51	7,06	0,02	-
S355	8	0,26	0,17	0,26	1,35	7,01	0,33	*
SW911	7	0,76	0,75	0,72	4,16	6,92	0,21	-
SW936	9	0,81	0,81	0,78	5,0	8,80	0,02	*
S0068	21	0,89	0,78	0,87	8,33	18,4	0,11	*
SW632	11	0,82	0,74	0,79	5,26	9,61	0,09	*
SW24	12	0,83	0,57	0,80	5,55	11,4	0,39	*
S0227	6	0,30	0,33	0,28	1,43	5,50	-0,09	-
S0225	7	0,48	0,42	0,45	1,92	6,43	0,11	*
S0090	6	0,66	0,73	0,61	3,70	5,99	-0,10	-
S0226	13	0,76	0,67	0,73	4,16	11,7	0,12	*
SW951	6	0,56	0,45	0,52	2,27	5,82	0,19	*
S0228	8	0,52	0,47	0,49	2,04	7,49	0,09	*
S0178	9	0,86	0,71	0,84	6,66	8,97	0,16	*
S0005	22	0,88	0,72	0,87	8,33	21,6	0,18	*
S0386	12	0,86	0,53	0,84	6,66	12,0	0,37	*
SW72	17	0,75	0,42	0,73	3,84	16,1	0,44	*
S0002	08	0,79	0,62	0,76	4,76	7,56	0,21	*
SW857	8	0,78	0,66	0,75	4,54	7,85	0,16	*
S0026	5	0,70	0,40	0,65	3,33	5,00	0,43	*
IGF1	9	0,74	0,58	0,70	3,84	8,85	0,21	*
S0155	8	0,79	0,76	0,76	4,76	7,94	0,04	-
SW240	9	0,79	0,76	0,76	4,54	8,55	0,03	-
Média	9,8	0,69	0,58	0,73	4,94	9,58	0,16 (0,13-0,18) ⁺	

* $p < 0,01$; “ - ” em equilíbrio de Hardy-Weinberg ; ()⁺ = IC 95%.

Os valores de PIC foram de razoavelmente a muito informativo, sendo os microssatélites S355, S0227 e S0215 os que apresentaram menores valores, enquanto o mais informativo de todos na população foi o S0005, sendo aquele que apresentou maior número de alelo (Tabela 5). O valor médio de PIC (Tabela 5) foi superior ao reportado por VICENTE (2006), que foi 0,68, e ao reportado para porcos mamelados do Uruguai (0,50) (CASTRO *et al.*, 2007), mas semelhantes aos reportados para os porcos chineses (LI *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2003). A relação entre PIC e número de alelo encontrado (Tabela 5) comportou-se de maneira semelhante aos

reportados por outros autores (MARTINÉZ, 2001; VICENTE, 2006; REVIDATTI, 2009), que observaram que, à medida que aumentava o número de alelo, aumentava o PIC.

A He média foi $0,69 \pm 0,03$, variando entre 0,26 e 0,88 nos marcadores S355 e S0005 respectivamente, o que coincide com os valores máximo e mínimo de PIC. Já a Ho apresentou média $0,58 \pm 0,01$, inferior à esperada, tendo o SW936 apresentado maior valor (0,81), enquanto o menor (0,17) foi observado no S355.

Vários fatores podem contribuir para a ocorrência de um valor de heterozigose inferior ao esperado em uma população, como consanguinidade, subdivisão da população, presença de alelo nulo e, ainda, presença de seleção, que pode estar ocorrendo a favor de homozigotos (MAUDET *et al.*, 2002b). Entretanto, devido às características da população de casco-de-burro, em que não se aplicam planos dirigidos de seleção, esse efeito pode ser descartado, embora ausência de seleção artificial não implique em ausência de seleção natural.

Todavia a consanguinidade pode contribuir para o déficit de heterozigoto que foi observado, uma vez que, nas pequenas explorações, típicas de suíno nativo no Brasil, frequentemente ocorre acasalamento entre indivíduo aparentado.

Os resultados do teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EWH) mostram que 6 dos 25 marcadores apresentaram-se em equilíbrio, enquanto o restante não (Tabela 5). Um forte indicador de não-estruturação da população é o desvio às condições de equilíbrio, quer na proporção entre heterozigoto e homozigoto segundo o modelo de Hardy-Weinberg quer no equilíbrio de ligação entre os pares de *locus*. Segundo HARTL & CLARK (2007), a redução no número de heterozigoto – relativamente ao esperado em condições de HWE – poderá ser consequência de não estruturação da população.

MARTINÉZ (2001), trabalhando com esse mesmo painel de microssatélite, encontrou, na população total de suíno da raça ibérica, desvio significativo de HWE para 19 dos 25 *loci* utilizados, igualmente ao aqui obtido para a população de casco-de-burro (Tabela 5). No entanto REVIDATTI (2009), trabalhando com suínos do Nordeste argentino, encontrou apenas 13 desses 25 *loci* em desequilíbrio.

O desvio do EWH é devido ao fato de a heterozigose observada ser menor do que a esperada, o que foi evidenciado pelo parâmetro F_{IS} , que mostra, de fato, haver

um déficit de heterozigoto na maioria dos *loci* analisados, cuja média desse parâmetro para a população global (N = 110) foi 0,16 (Tabela 5). Esse déficit reforça o indício de que, possivelmente, haja subdivisão da população em subpopulação devido, provavelmente, à deriva genética, conjuntamente com a seleção empírica (não dirigida), com acasalamentos sem critério, conduzidos pelos criadores, o que tem isolado as subpopulações, ocasionando a subdivisão da população.

O parâmetro F_{IS} reflete os desvios de panmixia na população. Quando negativo significativamente, esse parâmetro indica que há excesso de heterozigoto. Segundo MURRAY (1996), quando há esse excesso, conseqüentemente a medida do endocruzamento é negativa. Isso pode ser devido a dois fatores principais: (1) à presença de alelo deletério ou gene letal; (2) à predominância de cruzamento exogâmico (geralmente entre os indivíduos de diferentes subpopulações). Quando há excesso de homozigoto, em conseqüência, a medida do endocruzamento é positiva. Isso se deve, entre outras possibilidades, a que (1) o *locus* em estudo esteja sob seleção; (2) o endocruzamento seja prática comum na população. Na Tabela 6, encontra-se a diversidade genética média por subpopulação de casco-de-burro a partir dos 25 *loci* de microsatélite.

Tabela 6. Número de indivíduo (N), número médio de alelo por *locus* (NA), heterozigose observada (H_o) e esperada (H_e) bem como o F_{IS} por subpopulação de casco-de-burro a partir dos 25 *loci* microsatélites

Subpopulação	N	NA	H_o	H_e	Fis
Centro-Oeste	29	5,1 ± 1,77	0,50 ± 0,02	0,58 ± 0,03	0,14 (0,07-0,17) ⁺
Sudeste	35	6,2 ± 2,26	0,60 ± 0,02	0,65 ± 0,04	0,07 (0,003-0,10) ⁺
Nordeste	46	7,6 ± 2,96	0,62 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,10 (0,04-0,13) ⁺

()⁺ = IC 95%

Ao se considerar a possível subdivisão da população devido à sua localização nas diferentes regiões do Brasil, observou-se, por meio do parâmetro Fis, que as subpopulações apresentaram déficit de heterozigoto (Tabela 6). A subpopulação do

Centro-Oeste apresentou menor heterozigose que as demais. Isso pode ser devido ao fato de essa subpopulação apresentar menor tamanho populacional.

O número de alelo por *locus* apresentou redução da média geral da população nas três subpopulações (Tabela 5 e 6). Isso possivelmente deve-se ao fato de, na população total, utilizar todos os indivíduos na análise, com todos os alelos presentes na população. Ao dividir em subpopulação, suprimem-se indivíduos, logo os alelos presentes e, conseqüentemente, as proporções em que estão presentes serão alteradas por subpopulação. Não existe necessariamente uma relação direta entre as grandezas estimadas para o total dos indivíduos (população) e para as subpopulações. Em um caso extremo, em que se teriam duas subpopulações fixadas para alelos diferentes (por ex.: subpopulação 1 = alelo A e B/ subpopulação 2 = alelo C e D), o *locus* na população global teria quatro alelos (A, B, C e D). Contudo, ao calculá-lo para cada subpopulação separadamente, ter-se-iam apenas dois alelos por subpopulação. Essas dinâmicas expandidas a um maior número de *locus*, alelo e frequências alélicas tornam quase impossível de se obter uma relação aditiva desses parâmetros das subpopulações para a população total.

Essa redução de alelo nas subpopulações em relação à população pode ser biologicamente mais um indício de haver subdivisão na população, uma vez que, se a população fosse panmítica, mesmo a dividindo em grupos (subpopulações), não era para se notar diferenças substanciais na quantidade de alelo das subpopulações em relação à população total. A existência de alelos privados nas subpopulações demonstra diferentes *pools* genéticos.

De fato, diferenças entre combinação *locus*/subpopulação foram detectadas (Tabela 3). Por exemplo, o S0227 foi monomórfico tanto na subpopulação Sudeste quanto na Nordeste, entretanto não foi na Centro-Oeste (Tabela 7). Como se observa, maior número de *locus* em desequilíbrio foi observado na subpopulação Nordeste, seguida da Centro-Oeste (Tabela 7). A existência de tanto *locus* em desequilíbrio de HWE nas subpopulações (Tabela 7) pode indicar que a população possui mais subdivisão do que a que foi considerada (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste), ou seja,

que cada subpopulação pode ser, na verdade, constituída de subpopulações ainda menores.

Tabela 7. Teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg EHW para os 25 microssatélites nas três subpopulações (Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste) de casco-de-burro

Marcadores	Centro-Oeste	Sudeste	Nordeste
CGA	-	*	-
S0101	-	-	-
S215	-	-	-
S355	1	-	*
SW911	-	-	-
SW936	-	-	-
S0068	-	-	*
SW632	*	*	*
SW24	*	-	*
S0227	-	1	1
S0225	*	-	*
S0090	-	-	-
S0226	-	-	-
SW951	-	*	-
S0228	-	-	*
S0178	*	*	-
S0005	-	-	*
S0386	*	*	*
SW72	-	*	*
S0002	-	-	-
SW857	*	-	-
S0026	*	-	*
IGF1	-	-	-
S0155	-	-	-
SW240	-	-	*
Total ⁺	07	06	11

* $p < 0,01$; 1 – microssatélite monomórfico para a população; ⁺Total dos marcadores em desequilíbrio para a subpopulação

De acordo com as estatísticas de WEIR & COCKERHAM (1984), foram estimados os índices F_{IS} , F_{ST} e F_{IT} na população casco-de-burro considerando-se as subpopulações Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste para cada *locus* (Tabela 8). Segundo HARTL & CLARCK (2007), F_{IS} é uma medida da autozigose devido à consanguinidade, F_{ST} , devido à estruturação e F_{IT} , devido a ambos os fatores.

Tabela 8. Estatísticas-F (F_{is} , F_{it} e F_{st}) de WRIGHT (1965) e a proporção da diversidade total atribuível à subdivisão da população (G_{st}) considerando-se as subpopulações Nordeste, Centro-Oeste e Nordeste

Marcadores	F_{is}	F_{it}	F_{st}	G_{st}
CGA	0,162	0,303	0,168	0,129
S0101	0,075	0,110	0,037	0,034
S215	-0,030	-0,011	0,019	0,020
S355	0,319	0,337	0,027	0,031
SW911	-0,011	0,036	0,047	0,041
SW936	-0,145	0,065	0,184	0,142
S0068	0,081	0,137	0,061	0,058
SW632	0,043	0,118	0,078	0,060
SW24	0,258	0,335	0,104	0,076
S0227	-0,115	-0,081	0,030	0,030
S0225	0,062	0,135	0,077	0,060
S0090	-0,131	-0,087	0,039	0,035
S0226	0,044	0,164	0,125	0,101
SW951	0,167	0,211	0,053	0,047
S0228	0,028	0,119	0,093	0,072
S0178	0,071	0,210	0,149	0,117
S0005	0,097	0,217	0,133	0,109
S0386	0,333	0,403	0,105	0,089
SW72	0,381	0,468	0,139	0,136
S0002	0,135	0,251	0,134	0,112
SW857	0,136	0,173	0,042	0,039
S0026	0,293	0,487	0,274	0,210
IGF1	0,178	0,232	0,065	0,060
S0155	-0,004	0,070	0,074	0,062
SW240	-0,023	0,058	0,080	0,063
Média Geral	0,09 (0,04-0,15)	0,18 (0,13-0,24)	0,10 (0,07- 0,12)	0,08

() IC 95%

Observou-se, em média, o valor de 0,09 para F_{IS} , 0,18 para F_{IT} e de 0,10 para F_{ST} (Tabela 8). O valor médio de G_{ST} para todos os *loci* foi 0,08, oscilando entre 0,02, no *locus* S215, e 0,21, no S0026.

A magnitude de estruturação genética entre as subpopulações pode ser determinada segundo a definição de WRIGHT (1978), sendo considerada baixa ($F_{st} = 0$ a 0,05), moderada ($F_{st} = 0,05$ a 0,15), alta ($F_{st} = 0,15$ a 0,25) ou muito alta ($F_{st} > 0,25$). Assim, o valor de 0,10 obtido para F_{st} (Tabela 8) indica que o grau de subdivisão global nas três subpopulações consideradas corresponde a moderado, ou seja, a população casco-de-burro encontra-se subdividida, possivelmente em unidades ainda menores

que as consideradas (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste). Se, ao dividir cada supopulação em duas, o valor F_{st} aumentasse, tal fato mostraria que as subpopulações inferidas estariam ainda mais estruturadas; mas, se o valor diminuísse, indicaria que não há estruturação entre as seis subpopulações inferidas, ou seja, a população total encontra-se moderadamente subdividida, de fato, em três subpopulações, uma vez que o valor de 0,10 obtido demonstra que a população total não está estruturada, e sim moderadamente subdividida nas três subpopulações consideradas.

Na Tabela 9, encontram-se as distâncias DA (NEI *et al.*, 1983) e a $D_{Reynolds}$ (REYNOLDS *et al.*, 1983) entre as subpopulações, em que, em ambas as distâncias, a maior foi entre Nordeste e Centro-Oeste. Percebe-se que as duas matrizes obtidas (Tabela 9) com diferentes metodologias mostraram proporções similares em relação às distâncias entre as três subpopulações estudadas.

Tabela 9. Valores obtidos da DA (NEI *et al.*, 1983) acima da Diagonal e a $D_{Reynolds}$ (REYNOLDS *et al.*, 1983) abaixo da diagonal

	Centro-Oeste	Sudeste	Nordeste
Centro-Oeste	-	0,10	0,13
Sudeste	0,21	-	0,08
Nordeste	0,29	0,23	-

A partir das matrizes de distâncias genéticas (Tabela 9), foi possível construir árvores genéticas usando-se o método *Neighbour-Joining* (Figura 4A e 4B).

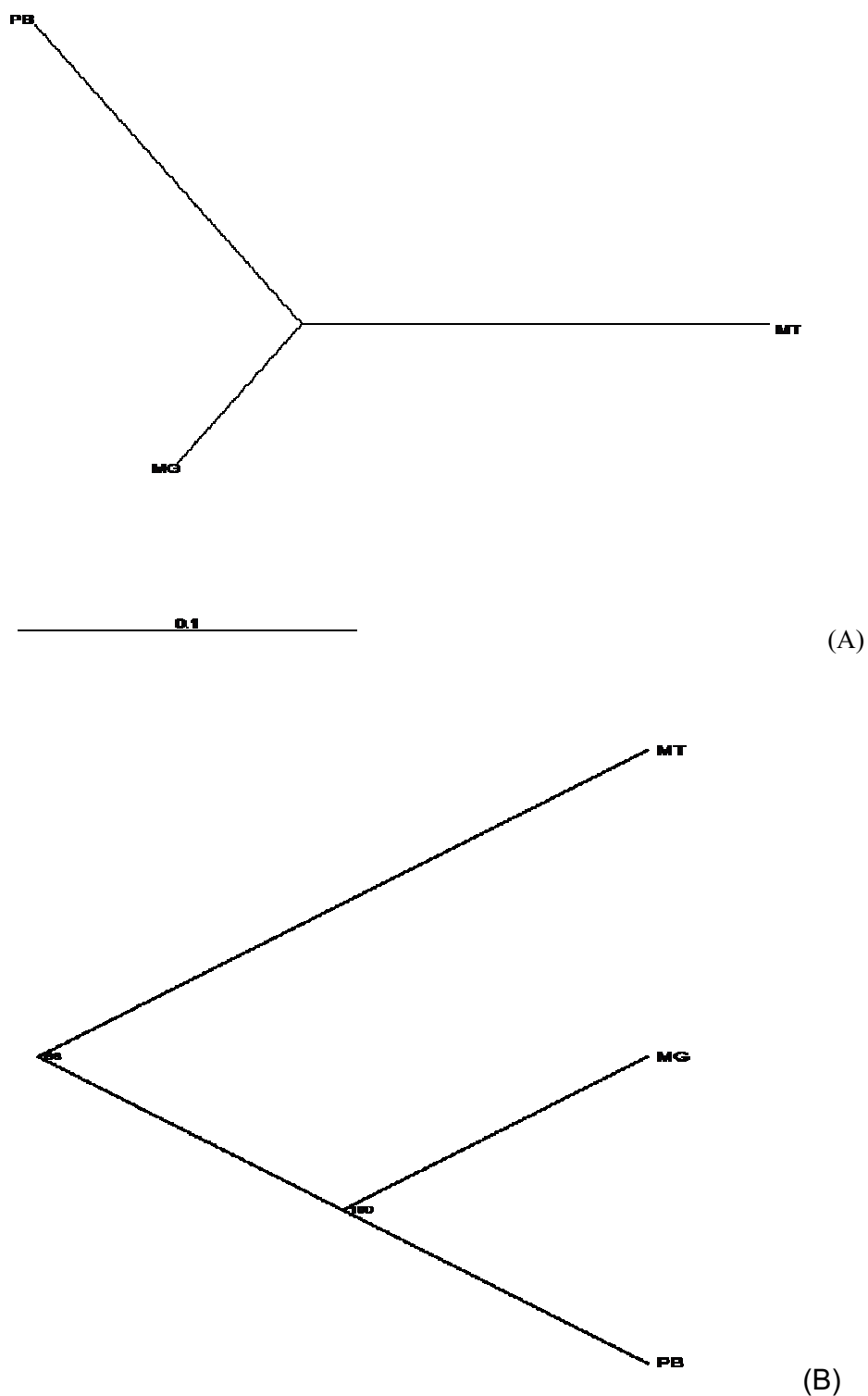


Figura 4. Árvore de distância D_A (A) e $D_{Reynolds}$ (B) entre as subpopulações de casco-de-burro pelo método *Neighbour-Joining* (SAITOU & NEI, 1987), usando-se 25 microssatélites. PB = Nordeste; MG = Sudeste; e MT = Centro-Oeste

Não há consenso sobre que medida de distância genética utilizar nos estudos de relação genética entre população de animal doméstico. A utilização de mais de uma distância genética é aconselhável na prática, devendo-se examinar cada uma delas, observando-se as semelhanças e as diferenças entre elas para que se determine a melhor distância, que permita conclusões razoáveis e se estas estão adequadas às informações *a priori*.

Na Figura 5, encontra-se a representação espacial dos animais cascos-de-burro, empregando-se como variável classificatória os genótipos individuais para os 25 microssatélites. Como se observa, há pouca sobreposição de indivíduo das diferentes subpopulações de casco-de-burro.

De acordo com a Figura 5, nenhuma sobreposição é observada entre os animais das subpopulações Centro-Oeste e Nordeste, enquanto a subpopulação do Sudeste nitidamente se subdividiu em dois grupos, em que um ficou próximo à subpopulação Nordeste e o outro, próximo à Centro-Oeste. Confrontando-se os valores de distância genética média (Tabela 9, Figura 4) com a distribuição da variabilidade genética dos grupos formados pela análise fatorial de correspondência (Figura 5), detecta-se que os dados se complementam, pois as subpopulações com maior distância genética média (Centro-Oeste e Nordeste) são as que apresentaram indivíduos com menor aproximação na distribuição espacial. Nessa análise (Figura 5), observa-se a formação de grupos distintos de genótipo. A menor variabilidade genética na subpopulação Centro-Oeste (Tabela 6) é observada na distribuição espacial dos indivíduos que a compõem, demonstrando uma menor dispersão destes, conquanto se perceba que essa subpopulação também se encontra dividida em dois grupos.

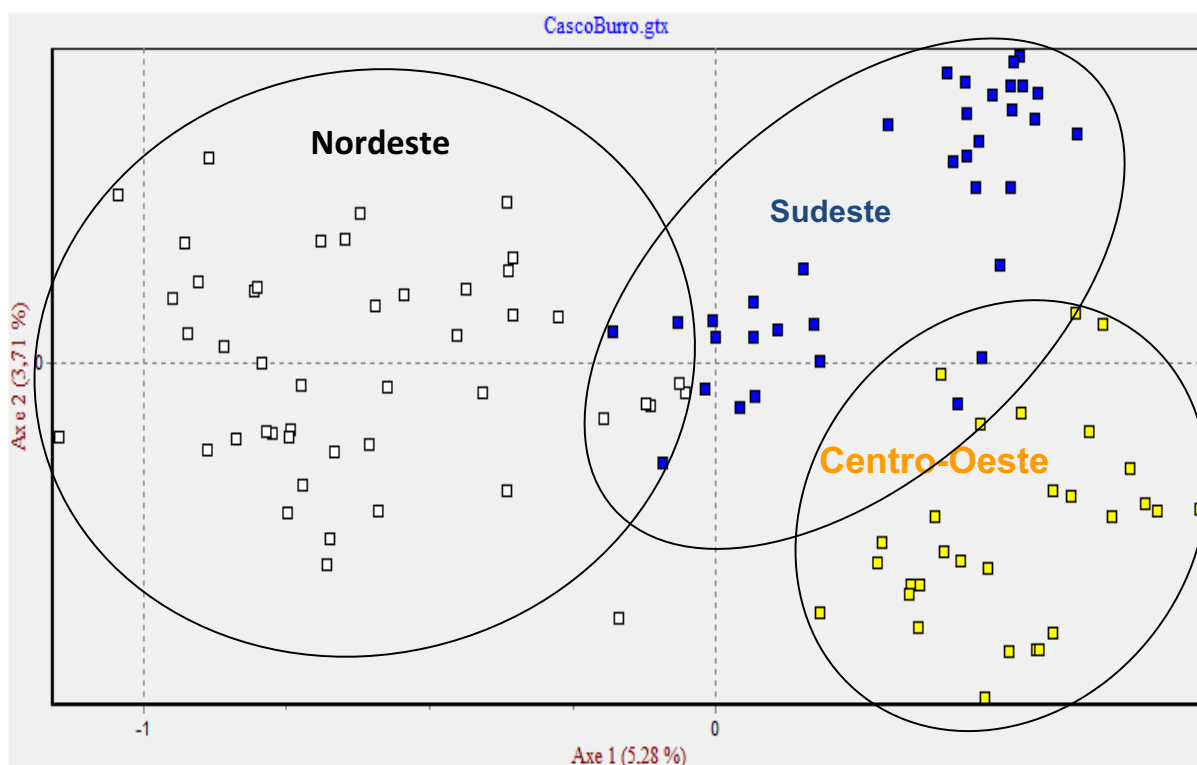


Figura 5. Representação em 2D da análise fatorial de correspondência usando-se as frequências alélicas das subpopulações de casco-de-burro (Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste), obtidas por meio de um painel de 25 microssatélites

A inexistência de HWE na maioria dos *loci* (Tabela 5 e 7), a dispersão espacial dos indivíduos na análise de correspondência (Figura 5) e as distâncias genéticas (Tabela 9) entre as subpopulações de casco-de-burro levaram à suposição de que, de fato, a população de casco-de-burro encontra-se estruturada em unidades geneticamente distintas. No sentido de reduzir ao máximo o grau de subjetividade normalmente associado à definição de subpopulação (PRITCHARD *et al.*, 2000), optou-se por permitir que os dados “revelassem” o nível de estruturação da população.

Assim, usando-se o programa *STRUCTURE*, testou-se a existência de 2 a 6 populações aplicando-se os valores de $\text{Ln}(\text{PD})$, que é obtido pelo *log likelihood* dos dados a cada passo do MCMC, na metodologia proposta por EVANNO *et al.* (2005). Esses autores verificaram que, em muitos casos, os valores de $\text{Ln}(\text{PD})$ não oferecem uma estimativa acurada para a determinação do melhor K. Sendo assim, os autores

delinearam uma metodologia para a determinação do melhor K por meio do ΔK dos valores de $\ln(\text{PD})$. Usando-se esse método, obteve-se $K = 6$ como o número de população existente na casco-de-burro.

A Figura 6 é a representação gráfica da estrutura populacional resultante da análise bayesiana na população casco-de-burro. Observando-se a Figura 6, verificou-se, quando se inferiram duas populações ($K = 2$), a existência de uma população constituída por indivíduos das subpopulações Centro-Oeste e Sudeste (amarelo) e outra das subpopulações Sudeste e Nordeste (azul). Quando $K = 3$, observa-se uma população (vermelho) constituída basicamente por indivíduos da subpopulação Sudeste, outra praticamente por indivíduos da Centro-Oeste, enquanto a terceira, formada tanto por indivíduos da Nordeste quanto da Sudeste. Quando $K = 4$, nota-se que a subpopulação Sudeste foi a primeira a se dividir em duas, concordante com a AFC (Figura 5), que mostrou que essa subpopulação apresenta uma divisão mais acentuada que as demais. Quando $K = 6$, observa-se que todas as três subpopulações se dividiram em duas subpopulações, o que vai ao encontro do parâmetro F_{is} (Tabela 6), que indicou que as subpopulações (Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste) apresentaram níveis altos de consaguinidade, possivelmente por estarem subdivididas em subpopulações ainda menores, corroborando HARTL & CLARK (2007), que afirmaram que a redução no número de heterozigoto – relativamente ao esperado em condições de HWE – poderá ser consequência de não estruturação da população.

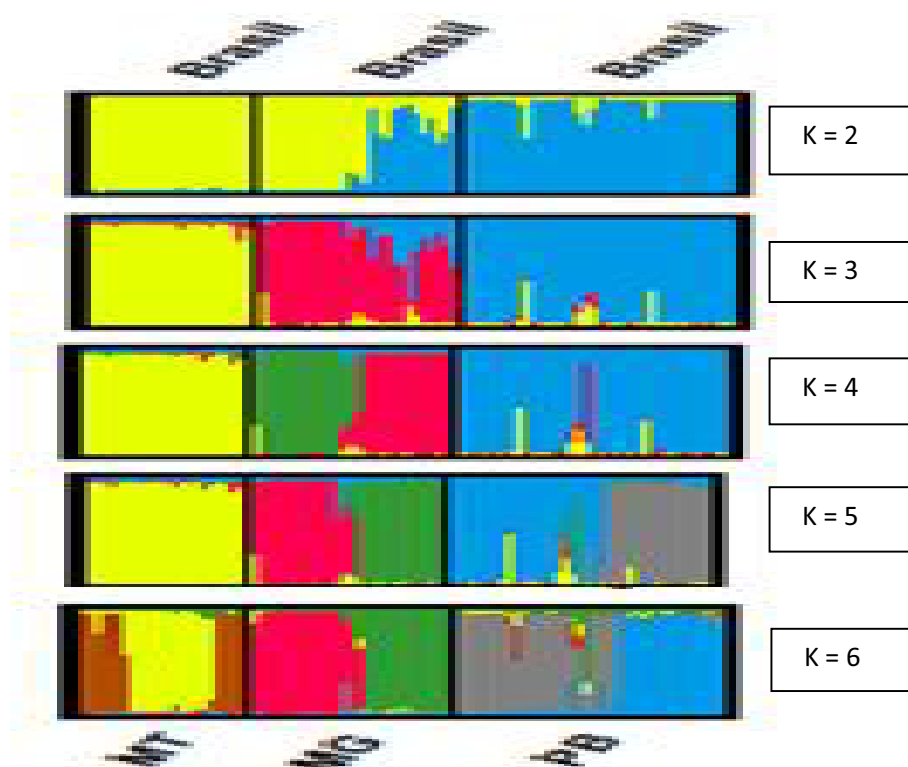


Figura 6. Gráficos representando a atribuição dos genótipos nas populações inferidas (K = 2, 3, 4, 5 e 6). PB = Nordeste; MG = Sudeste; e MT = Centro-Oeste

Os resultados dos parâmetros de diferenciação genética entre as subpopulações mostram que os cascos-de-burro não constituem uma raça definida nem estruturada devido à magnitude da variabilidade intrapopulacional, a qual indica que essa população é constituída por subpopulações geneticamente distintas. SOLLERO (2006), trabalhando com raças nativas do Brasil, verificou que a piau e a monteiro não se encontravam estruturadas, principalmente a piau, que se mostrou mais influenciada por outras raças.

Contudo uma população pode ter alta diversidade intrapopulacional e ainda assim constituir uma raça, caso esteja geneticamente bem diferenciada de outras raças. O fato de a população estar dividida pode apontar que se têm linhagens regionais de casco-de-burro. A estrutura genética observada nos cascos-de-burro pode ser considerada uma consequência tanto da introgressão alélica por indivíduos

de outras raças quanto de um isolamento reprodutivo que possa ter produzido gargalos populacionais.

Conforme MARTÍNEZ *et al.* (2007), a identidade genética deve ser considerada complemento importante para as informações sobre características morfológicas de uma população. Nesse contexto, o painel de microssatélite proposto foi considerado de grande precisão e, portanto, pode ser sugerida sua aplicação em estudo que envolva questões sobre o reconhecimento de população, principalmente naquelas cuja diversidade intrarracial seja mais expressiva, o que dificulta a certificação racial. No entanto foi demonstrada baixa eficácia dos marcadores microssatélites em alguns aspectos, como na certificação racial de produtos da raça ibérica e de seus cruzamentos (ALVES *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2002; GARCIA *et al.*, 2006).

Mas muitos estudos têm enunciado que os microssatélites, além da utilidade para a construção de árvores ou dendrogramas de distâncias, servem para identificar a população de origem de um indivíduo, como podem ser vistos nos trabalhos de MAUDET *et al.* (2002a), com *Capra ibex*; MAUDET *et al.* (2002b) avaliando bovinos; DALVIT *et al.* (2008), com ovinos da raça Alpina; e de BERTTHOULY *et al.* (2008) estudando aves asiáticas e europeias. Assim, a utilização de métodos de designação de indivíduo pode ser útil nos estudos genéticos de população bem como na detecção de migrantes, mistura de raças e em animais em risco de extinção (PAETKAU *et al.*, 1995; CORNUET *et al.*, 1999; MAUDET *et al.*, 2002a), podendo ser utilizados em conjunto para uma avaliação mais precisa dos dados estudados.

Relação Filogenética com populações ibéricas, norte-americanas e internacionais

A partir das frequências alélicas das populações analisadas, realizou-se uma análise fatorial de correspondência com as populações, representando-se as relações entre as populações em um espaço tridimensional (Figura 7). Observando-se essa figura, nota-se a aglomeração das populações da raça ibérica.

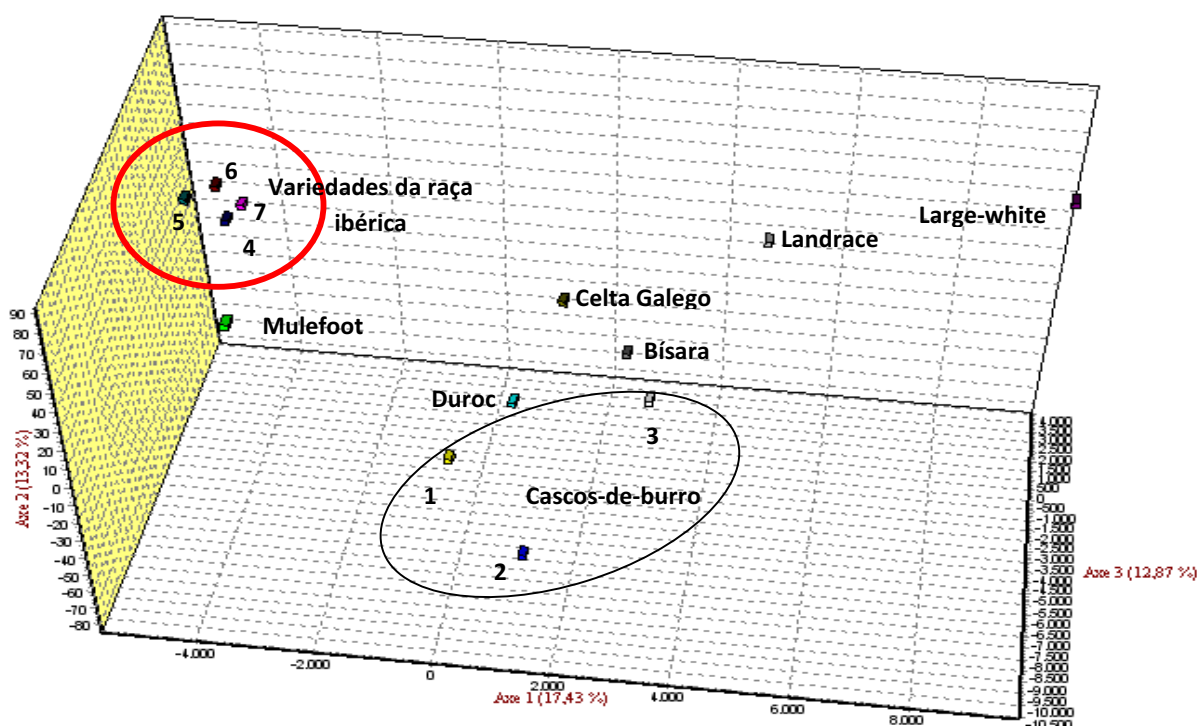


Figura 7. Representação em 3D da análise fatorial de correspondência, usando-se as frequências alélicas das populações de casco-de-burro, ibéricas, norte-americanas e internacionais, obtidas por meio de um painel de 25 microssatélites. 1 = casco-de-burro Centro-Oeste; 2 = casco-de-burro Sudeste; 3 = casco-de-burro Nordeste; 4 = alentejano de Portugal; 5 = *retinto*; 6 = *entrepelado*; e 7 = *lampião*.

As populações de casco-de-burro (1, 2 e 3) encontraram-se mais próximas da *bisara*, de Portugal, e da *duroc* (Figura 7). A população de casco-de-burro do Sudeste encontra-se mais próxima das outras populações de casco-de-burro que de alguma outra estudada (Figura 7).

A estimativa da divergência genética entre os pares das populações foi também efetuada por meio do parâmetro F_{ST} , que mede a componente interpopulacional da variância. Segundo HARTL & CLARK (2007), valores de diferenciação entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação genética moderada; entre 0,15 e 0,25, diferenciação elevada; e valores superiores a 0,25 indicam um grau muito elevado de diferenciação entre as populações.

Assim, na Figura 8, são apresentados os valores de F_{st} estimados entre as populações em estudo. O F_{st} e G_{st} apresentados na Tabela 8 são medidas do grau de estruturação ou divisão da população total. Estes, quando muito, podem ser considerados como a distância média entre duas quaisquer subpopulações dentro da sua população. O F_{st} estimado entre duas populações é que pode ser considerado distância genética.

Todas as estimativas de F_{st} entre as populações foram estatisticamente significativas e correspondem, de modo geral, à diferenciação genética moderada e elevada (Figura 8).

Os menores valores foram observados entre as variedades da raça ibérica (Figura 8), mais precisamente entre a *retinto* e a *entrepelado*, cujo valor (0,02) foi o único de diferenciação genética baixa obtido considerando-se todos os pares de população. Diferenciação genética moderada foi observada entre as demais populações da raça ibérica, o que corrobora os achados de CLEMENTE *et al.* (2008), que encontraram valores de médio a elevado no estudo com as diferentes variedades dessa raça.

Entre as populações de casco-de-burro, a menor distância foi entre a casco-de-burro do Sudeste e a do Nordeste, seguida da menor distância entre a casco-de-burro do Centro-Oeste e a da Sudeste (Figura 8). Esse resultado concorda com os anteriores (Tabela 9, Figura 4 e 5), que mostram que, de fato, a população Centro-Oeste está mais próxima da Sudeste e mais distante da Nordeste. Todas as populações de casco-de-burro mostraram-se mais próximas, por meio desse parâmetro, da população bísara, apresentando distâncias genéticas moderadas, e mais distantes da *mulefoot*, apresentando todas elas distâncias genéticas elevadas em relação a essa última.

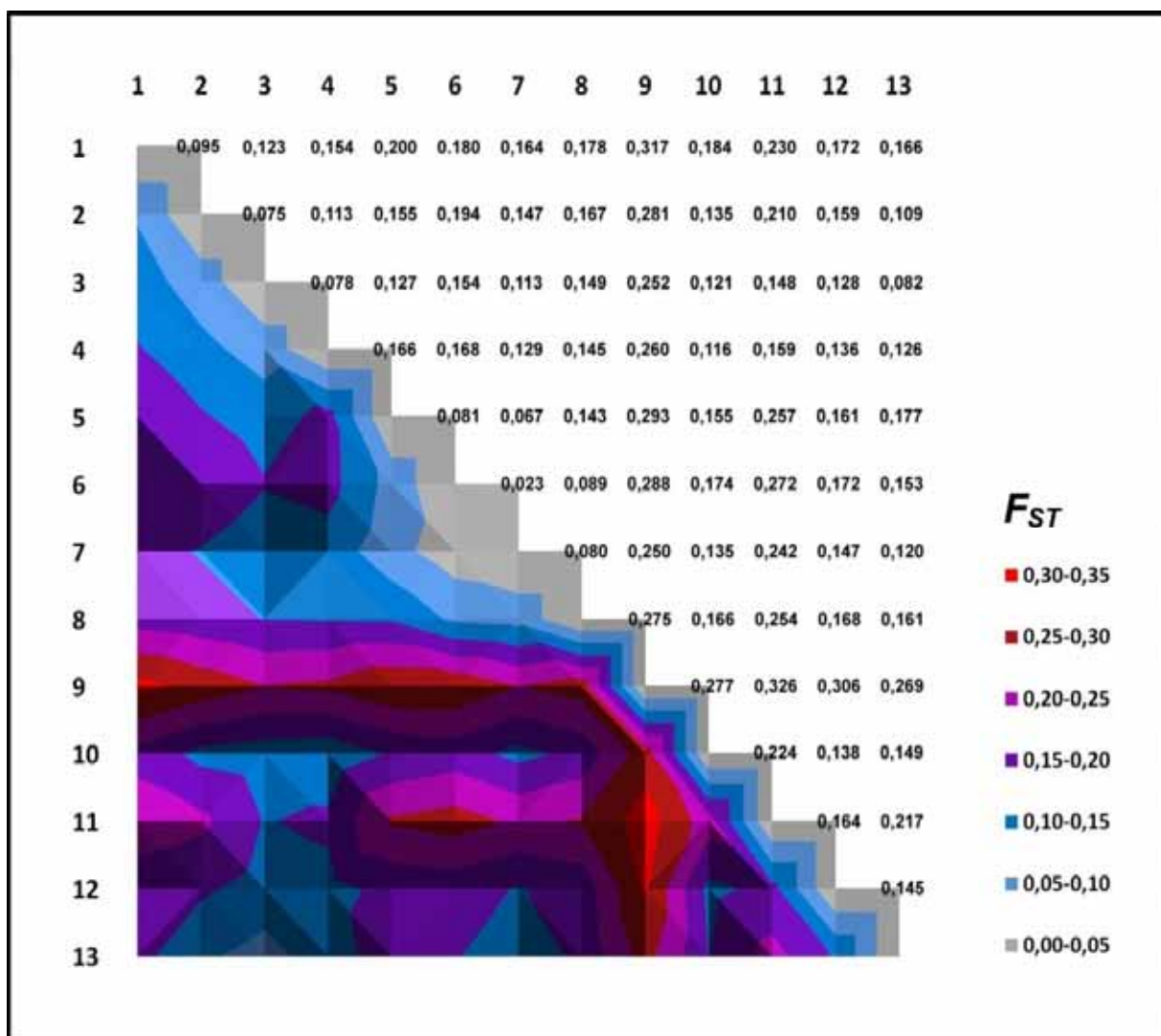


Figura 8. Valores exatos obtidos (acima da diagonal) para o parâmetro F_{ST} entre os pares de população de suíno casco-de-burro, ibéricos, norte-americanos e internacionais. A matriz inferior é a "transposição" dos mesmos valores para uma escala de cor que vai da mais fria (azul, valores mais baixos) à mais quente (vermelha, valores mais altos). Legenda: 1 = casco-de-burro Centro-Oeste; 2 = casco-de-burro Sudeste; 3 = casco-de-burro Nordeste; 4 = bísaro; 5 = alentejano; 6 = *retinto*; 7 = *entrepelado*; 8 = *lampião*; 9 = *mulefoot*; 10 = *celta gallega*; 11 = *large white*; 12 = *landrace*; e 13 = *duroc*

Na Tabela 10, encontram-se as distâncias DA (NEI *et al.*, 1983) e a $D_{Reynolds}$ (REYNOLDS *et al.*, 1983) entre as populações estudadas. Essas distâncias se aplicam a estudos de população com curto período de evolução. As distâncias observadas mostram que as subpopulações de casco-de-burro apresentaram valores mais próximos quando comparadas entre si que quando confrontadas com as demais populações.

Tabela 10. Matrizes de distância genética. REYNOLDS *et al.* (1983) abaixo da diagonal e a DA (NEI *et al.*, 1983) acima

MT	MG	PB	BI	AL	RET	ENT	LAM	MF	CEL	LW	LAN	DUR
MT	-	0,21	0,29	0,36	0,34	0,29	0,31	0,41	0,31	0,39	0,33	0,33
MG	0,10	-	0,23	0,32	0,33	0,30	0,33	0,39	0,28	0,36	0,30	0,23
PB	0,13	0,08	-	0,24	0,28	0,27	0,29	0,38	0,25	0,26	0,26	0,22
BI	0,19	0,14	0,09	-	0,32	0,30	0,33	0,42	0,26	0,33	0,30	0,34
AL	0,22	0,17	0,12	0,18	-	0,13	0,19	0,33	0,27	0,38	0,32	0,32
RET	0,19	0,19	0,15	0,18	0,08	-	0,04	0,32	0,26	0,37	0,29	0,25
ENT	0,18	0,14	0,11	0,14	0,06	0,02	-	0,30	0,24	0,35	0,29	0,23
LAM	0,20	0,17	0,15	0,17	0,14	0,10	0,09	-	0,36	0,38	0,32	0,30
MF	0,36	0,29	0,26	0,31	0,30	0,29	0,31	-	0,34	0,41	0,40	0,36
CEL	0,20	0,14	0,13	0,15	0,16	0,17	0,18	0,28	-	0,31	0,24	0,28
LW	0,26	0,21	0,15	0,19	0,27	0,28	0,27	0,34	0,23	-	0,21	0,34
LAN	0,19	0,16	0,13	0,16	0,19	0,18	0,19	0,34	0,14	0,18	-	0,28
DUR	0,18	0,10	0,09	0,17	0,19	0,18	0,19	0,29	0,17	0,23	0,17	-

A partir das matrizes de distâncias genéticas (Tabela 10), foi possível construir duas árvores genéticas usando-se, na Figura 9, a distância $D_{Reynolds}$ (REYNOLDS *et al.*, 1983) e o método *Neighbor-Joining* e, na Figura 10, a DA (NEI *et al.*, 1983) e o método UPGMA. Na Figura 9, é possível observar que as populações de casco-de-burro do Sudeste e do Centro-Oeste se agruparam com alto valor de *bootstrap* (89), ficando no mesmo ramo com a casco-de-burro do Nordeste e a *duroc*.

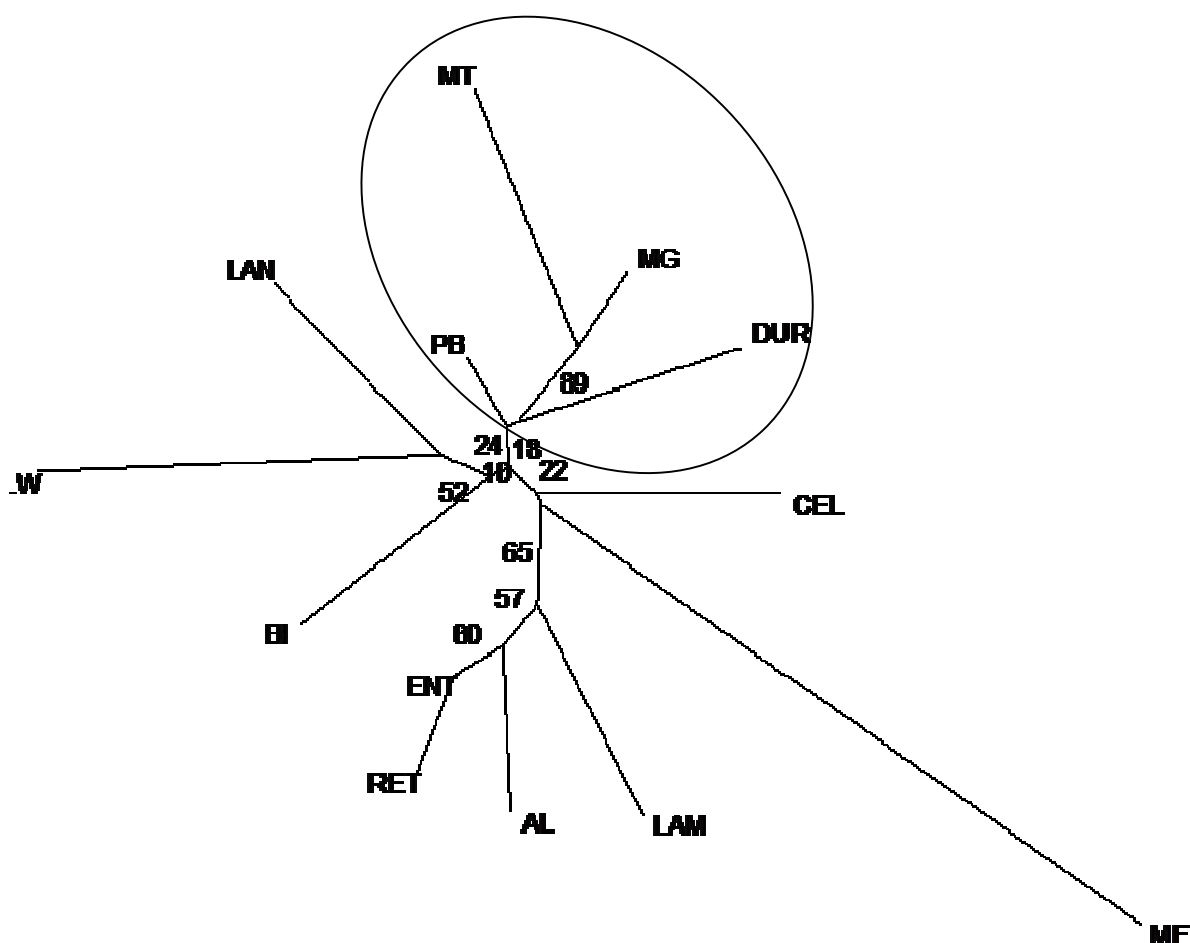


Figura 9. *Neighbor-Joining* construído com base na distância de REYNOLDS *et al.* (1983) entre as subpopulações de casco-de-burro e as populações ibéricas, norte-americanas e internacionais. Legenda: MT = casco-de-burro Centro-Oeste; MG = casco-de-burro Sudeste; PB = casco-de-burro Nordeste; DUR = *duroc*; CEL = *celta gallega*; MF = *mulefoot*; LAM = *lampiño*; AL = alentejano; RET = *retinto*; EN = *entrepelado*; BI = bisaro; W = *large white*; LAN = *landrace*

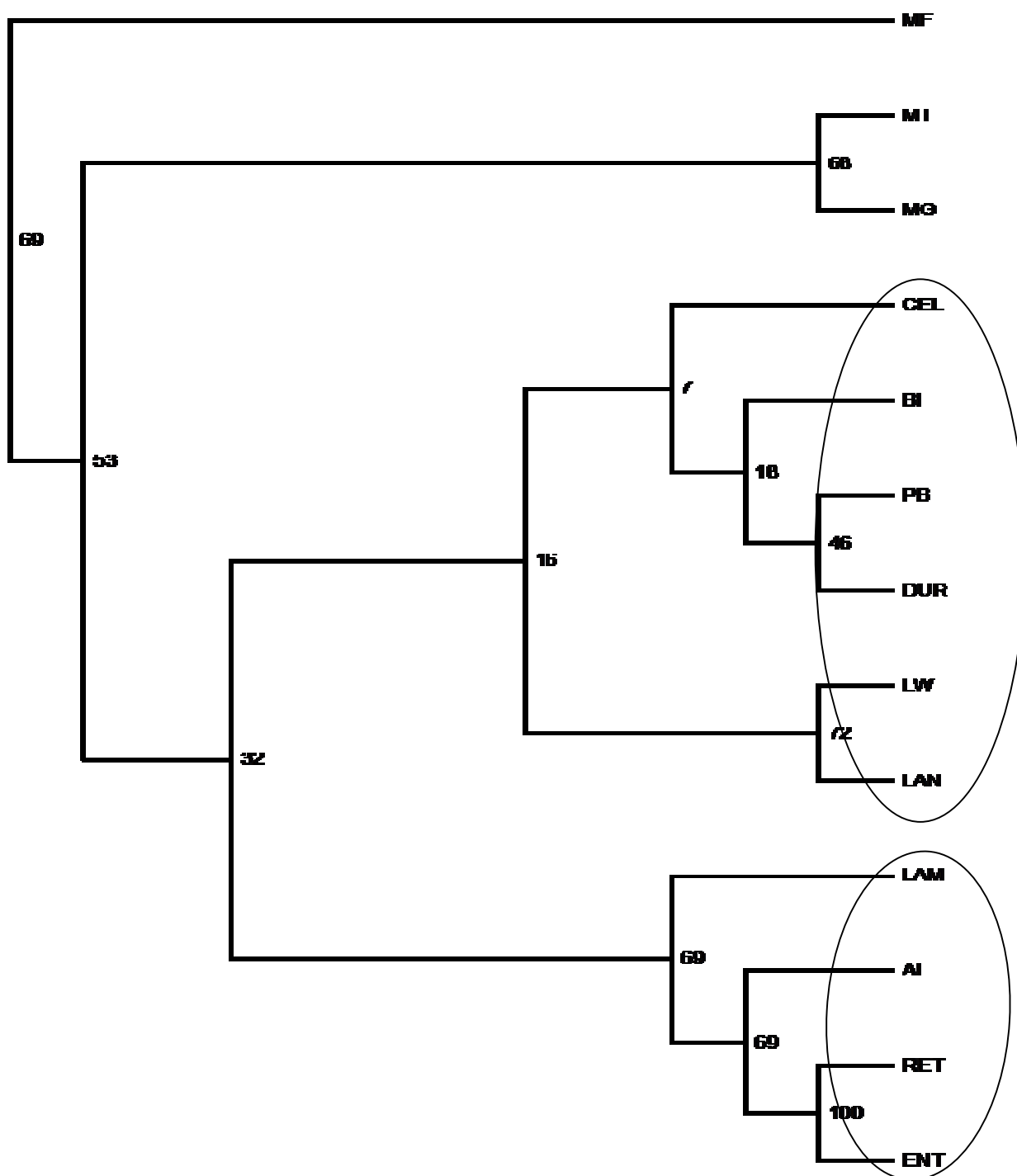


Figura 10. Dendrograma UPGMA, baseado na distância DA (NEI *et al.*, 1983) entre as subpopulações de casco-de-burro e as populações ibéricas, norte-americanas e internacionais. Legenda: MT = casco-de-burro Centro-Oeste; MG = casco-de-burro Sudeste; PB = casco-de-burro Nordeste; DUR = *duroc*; CEL = *celta gallega*; MF = *mulefoot*; LAM = *lampião*; AL = alentejano; RET = *retinto*; EN = *entrepelado*; BI = *bísaro*; LW = *large white*; LAN = *landrace*.

O dendrograma UPGMA gerado (Figura 10) demonstra que a população *mulefoot* ficou fora do agrupamento formado pelas demais populações, ficando, assim, distante do conjunto de todas as outras.

As populações de casco-de-burro do Sudeste e do Centro-Oeste se agruparam com médio valor de *bootstrap*. As demais populações subdividiram-se em dois grupos, em que se observam as variedades da raça Ibérica em um grupo, enquanto, em outro, as internacionais, *landrace* e *large white*, a população de casco-de-burro do Nordeste bem como a *duroc*, a bísara, de Portugal, e a *celta gallega*, da Espanha. Essa subdivisão não se encontra topologicamente bem definida, uma vez que apresentou baixo valor de *bootstrap*. No entanto essas populações se apresentam agrupadas pelo fato de, mesmo não estando topologicamente bem definidas, apresentarem relação mais próxima entre elas, fato que também pode ser observado para as populações *large white* e *landrace*, que se separaram do grupo constituído pelas populações *duroc*, casco-de-burro do Nordeste, bísara e *celta gallega* com baixo valor de *bootstrap*.

Apesar dos relatos de que a formação das raças nativas do Brasil foi a partir de animais trazidos da Península Ibérica no período colonial, as populações ibéricas inferidas neste estudo apresentaram-se distantes dos grupos de casco-de-burro estudados. MARTINÉZ *et al.* (2005) concluíram que os suínos crioulos cubanos, mesmo sendo derivados das raças da Península Ibérica, encontram-se geneticamente bem distintos dos seus ancestrais, depois de quase 500 anos de deriva genética e miscigenação.

Isso certamente deve-se ao fato de que a deriva genética ocorre rapidamente em pequenas populações isoladas, uma vez que esses grupos acumulam diferentes frequências alélicas com rapidez, como afirmam ROSENBERG *et al.* (2002). Ademais, quando uma população é iniciada a partir de reduzido número de indivíduo (fundadores), a sua variabilidade dependerá da amostra de alelo trazida por esses fundadores, e esse “efeito fundador” pode causar diferenças significativas entre as frequências alélicas da população original e da recém-formada (NEI *et al.*, 1975). Os mesmos autores relatam que a redução esporádica no tamanho das populações tem efeito sobre as gerações subsequentes. Assim sendo, o número mínimo de indivíduo que se reproduz durante o período de estrangulamento demográfico (*bottleneck*)

define a probabilidade de perda de alelo por deriva genética, e os alelos só poderiam ser recuperados por mutação ou a partir de outras populações por migração.

Todavia o fato de os cascos-de-burro se mostrarem distantes geneticamente dos seus ancestrais leva também à hipótese do quanto os cascos-de-burro apresentam introgressão alélica, principalmente da raça *duroc* entre as estudadas. Como sabido, a *duroc* foi introduzida no Brasil para fins de aumento de produção, e muitos criadores de raça nativa utilizaram-na em cruzamento no intuito de melhorar a produção dos seus animais.

Os resultados dos microssatélites também indicaram que os cascos-de-burro estão geneticamente distantes dos suínos *mulefoot*, rejeitando-se a hipótese de que os cascos-de-burro são derivados desses animais. O tempo de introdução dos suínos *mulefoot* no Brasil, caso os cascos-de-burro fossem oriundos destes, seria recente comparado aos 500 anos de introdução de suíno da Península Ibérica no Brasil.

As implicações desse tipo de estudo para a conservação são muito importantes: se é uma raça e/ou uma espécie ameaçada que ocupa uma determinada área, então a estratégia de conservação deve ser no sentido de preservar a diversidade da raça e/ou espécie naquela área, pois podem existir adaptações locais que se perderiam no caso de a população ser misturada com outra (SOLÉ-CAVA, 2001). Os efeitos de estocasticidade nas pequenas populações, que incluem o endocruzamento, a perda da diversidade genética e o acúmulo de mutações (FRANKHAM *et al.*, 2008), devem ser estudados e analisados minuciosamente nas populações ameaçadas, uma vez que estas se encontram em número reduzido, situação na qual vive a maioria das populações nativas de suíno do Brasil.

5.4 CONCLUSÕES

A população casco-de-burro estudada não se encontra geneticamente estruturada, o que dificulta certificação racial.

Os resultados dos parâmetros estatísticos utilizados para quantificar a variabilidade genética indicaram altos níveis de variabilidade na população casco-de-burro.

As árvores genéticas e a análise de correspondência mostraram que, de modo geral, as populações de casco-de-burro ficaram mais próximas da bísara, de Portugal, e da *duroc*.

5.5 REFERÊNCIAS

ALVES, E. *et al.* Verificación mediante marcadores genéticos del origen racial de cerdos y productos curados de tipo ibérico. **Solo Cerdo Ibérico**, Zafra, n. 7, out., p. 23-28, 2001.

ALVES, E. *et al.* Differentiation of the raw material of the Iberian pig meat industry based on the use of amplified fragment length polymorphism. **Meat Science**, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 157-162, 2002.

BALAKRISHNAN, V.; SANGHVI, L. D. Distance between populations on the basis of attribute data. **Biometrics**, Oxford, v. 24, n. 4, p. 859-865, 1968.

BARKER, J. S. F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings**. Guelph: International Committee, 1994. v. 5, p. 501-508.

BAUMUNG, R.; SIMIANER, H.; HOFFMANN, I. Genetic diversity studies in farm animals - a survey. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 121, n. 6, p. 361-373, 2004.

BECKMANN, J. S.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. In: BECKMANN, J. S.; OSBORN, T. C. **Oxford surveys of plant molecular & cell biology**. Oxford: Oxford University Press, 1990. v. 3, p. 196-250.

BELKHIR, K. *et al.* **Genetix 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Montpellier: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, Adaptations. Université de Montpellier, France, 2003. Umr5171.

BERTHOULY, C. *et al.* Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 121-129, 2008.

BOTSTEIN, D. *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

BOWCOCK, A. M. *et al.* High resolution of human evolution trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, London, v. 368, n. 3, p. 455-457, 1994.

CANUL, S. M. *et al.* Caracterización genética del cerdo pelón mexicano mediante marcadores moleculares. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 54, n. 206, p. 267-272, 2005.

CASTRO, G. Situación de los Recursos Genéticos Porcinos Locales en Uruguay. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, supl. 1, p. 783-788, 2007.

CASTRO, G. *et al.* Caracterización genética preliminar del cerdo Mamellado Uruguayo. In: SIMPOSIO IBEROAMERICANO SOBRE UTILIZACIÓN DE RECURSOS ZOOGENÉTICOS, 8., 2007, Quevedo. **Anais...** Quevedo: CYTED, 2007. p. 1-4.

CLEMENTE, I. *et al.* El cerdo ibérico: una agrupación racial caracterizada por su elevada diversidad genética. **Solo Cerdo Ibérico**, Zafra, abr., p. 21-28, 2008.

CORNUET, J. *et al.* New method employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 153, n. 4, p. 1989-2000, 1999.

DALVIT, C. *et al.* Genetic diversity and variability in Alpine sheep breeds. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 80, n. 1, p. 45-51, 2008.

DAWSON, R. J. G. *et al.* Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their uses in population studies. **Heredity**, London, v. 79, n. 5, p. 506-514, 1997.

EDING, J. H.; LAVAL, G. Measuring genetic uniqueness in livestock. In: OLDENBROEK, J. K. **Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources**. The Netherlands, 1998. p. 33-58.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Anckland, v. 1, p. 47-50, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2658868/>>. Acesso em: 20 nov. 2008.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v. 164, n. 4, p. 1567-1587, 2003.

FAN, B. *et al.* Genetic variation analysis within and among Chinese indigenous swine populations using microsatellite markers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 33, n. 6, p. 422-427, 2002.

FAO. Swines. In: **Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): recommended microsatellite markers**. FAO: Rome, 1998. p. 19-24

FARID, A. *et al.* Genetic analysis of ten sheep breeds using microsatellite markers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 80, n. 1, p. 9-17, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 783-791, 1985.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 259 p.

GARCÍA, D. *et al.* Estimation of the genetic admixture composition of Iberian dry-cured ham samples using DNA multilocus genotypes. **Meat Science**, Amsterdam, v. 72, n. 3, p. 560-566, 2006.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

- HARTL D. L.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. 4rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2007. 565 p.
- JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. **Mammalian protein metabolism**. v. 3. NewYork: Academic Press, 1969. p. 21-32.
- KELLY, L. A. *et al.* El cerdo pampa rocha como recurso zoogenéticos en Uruguay. Marcadores moleculares. **Veterinaria**, Salamanca, v. 39, n. 155-156, p. 15-16, 2004.
- KIM, T. H. *et al.* Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 83, n. 10, p. 2255-2263, 2005.
- KIMURA, M. A. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.
- LAVAL, G. *et al.* Genetic diversity of eleven European pig breeds. **Genetic Selection Evolution**, London, v. 32, n. 2, p. 187-203, 2000.
- LI, K. *et al.* Analysis of diversity and genetic relationship between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed. **Animal Genetics**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 322-325, 2000.
- LI, Y. C. *et al.* Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 21, n. 6, p. 991-1007, 2004.
- LOUIS, E. J.; DEMPSTER, E. R. An Exact Test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. **Biometrics**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 805-811, 1987.
- MARENGO, S. **Mapeamento genético de tangerina Sunki e *Poncirus trifoliata* para resistência ao “huanglongbing” (greening) dos citros**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramento Genético Vegetal) – Instituto Agronômico, Campinas, 2009.
- MARTINÉZ, A. M. **Caracterización genética del cerdo ibérico mediante marcadores moleculares**. 2001. 174 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2001.

- MARTINÉZ, A. M. *et al.* Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. **Animal Genetics**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 295-301, 2000.
- MARTINÉZ, A. M. *et al.* Caracterización genética del cerdo criollo cubano con microsatélites. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 54, n. 206-207, p. 369-375, 2005.
- MARTINÉZ, A. M. *et al.* Estudio de la diversidad genética del cerdo Negro Canario con microsatélites de ADN. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 56, supl. 1, p. 425-428, 2007.
- MAUDET, C.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Genetic diversity and assignment test among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, n. 4, p. 942-950, 2002a.
- MAUDET, C. *et al.* Microsatellite DNA and recent statistical methods in wildlife conservation management: applications in Alpine ibex [*Capra ibex (ibex)*]. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 421-436, 2002b.
- MÉNDEZ, J. A. A. **Caracterización y relaciones filogenéticas de cinco razas asnales españolas em risco de exticcion**. 2002. 212 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade de Barcelona, Barcelona, 2002.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, Maryland Heights, v. 155, p. 335-350, 1987.
- MURRAY, B. W. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. McMaster University, 1996. Disponível em: <helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>. Acesso em: 20 mai. 2009.
- NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, Chicago, v. 106, p. 283-282, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.
- NEI, M. Genetic distance molecular phylogeny. In: RYMAN, N.; UTTER, F. **Population genetics and fishery management**. Seattle: University of Washington Press, 1987. p. 193-223.

NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Genetics**, Bethesda, v. 76, n. 10, p. 5269-5273, 1979.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The Bottleneck effect and genetic variability in population. **Evolution**, Oxford, v. 29, n. 1, p. 1-10, 1975.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 19, n. 2, p. 153-170, 1983.

NEUMANN, K.; WETTON, J. H. Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow *Passer domesticus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 307-309, 1996.

OLIVEIRA, J. C. V. **Variabilidade genética em caprinos**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Zootecnia - Produção Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2007.

PAETKAU, D. *et al.* Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 347-354, 1995.

PAGE, R. D. Tree View: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer applications in the biosciences**, Glasgow, v. 12, n. 4, p. 357-358, 1996.

PANZARDI, A. **Determinação da paternidade de leitegadas suínas por marcadores microssatélites utilizando inseminação heterospérmica, com deposição espermática intracervical e intrauterina, para a verificação da contribuição individual de machos suínos**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

PINEDA, E. P. **Caracterización genética del cerdo Criollo Cubano utilizando marcadores moleculares**. 2005. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidad de Granma, Granma, 2005.

PIRES, A. V. *et al.* Mapeamento de locos de características quantitativas associados à composição de carcaça, no cromossomo seis de suíno. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 725-732, 2008.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, Bethesda, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

QI, Y. *et al.* Genetic diversity and relationships of 10 chinese goat breeds in the Middle and Western China. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 82., n. 2, p. 88-93, 2009.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (Version 1.2): populations genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, Bethesda, v. 105, n. 3, p. 767-779, 1983.

REVIDATTI, M. A. S. **Caracterizacion de cerdo crioulo do Nordeste argentino**. 2009. 241 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2009.

ROCHA, L. L. **Estudo genético de populações caprinas locais e exóticas através de marcadores microssatélites**. 2009. 151 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

ROGERS, J. S. **Measures of genetic similarity and genetic distance**: studies in genetics. Austin: University of Texas Publications, 1972. p. 145-153.

ROSENBERG, N. A. *et al.* Genetic structure of human populations. **Science**, Washington, v. 298, n. 5602, p. 2381-2384, 2002.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 253 p.

SANCRISTÓBAL, M. *et al.* Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 189-198, 2006.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical taxonomy. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 2nd ed. New York: Freeman and Company, 1981. 959 p.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 172-192.

SOLLERO, B. P. **Diversidade genética das raças naturalizadas de suínos no Brasil por meio de marcadores microssatélites**. 2006. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

SOLLERO, B. P. *et al.* Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 8-15, 2009.

SWART, H. *et al.* Microsatellite-based characterization of Southern African domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). **South African Journal of Animal Science**, Pretória, v. 40, n. 2, p. 121-132, 2010.

TAKEZAKI, N.; NEI, M. Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. **Genetics**, Bethesda, v. 144, n. 1, p. 389-399, 1996.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

VALIENTE, J. Q. **Caracterización genética de los bovinos criollos mexicanos y su relación con otras poblaciones bovinas**. 2007. 155 f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2007.

VICENTE, A. P. A. **Caracterização do porco malhado de alcobaça**. 2006. 214 f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2006.

WAHLUND, S. Zusammensetzung von populationen und korrelations erscheinungen von Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. **Hereditas**, Malden, v. 11, n. 1, p. 65-106, 1928.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis**: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1990. 377 p.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 323-354, 1951.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. **Evolution**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 395-342, 1965.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**: variability within and among natural populations. Chicago: University of Chicago Press, 1978. v. 4.

YANG, S. L. *et al.* Genetic variation and relationships of eighteen Chinese indigenous pig breeds. **Genetics, Selection, Evolution**, London, v. 35, n. 6, p. 657-71, 2003.

ZHANG, G. X. *et al.* Genetic diversity of microsatellite loci in fifty-six Chinese native pig breeds. *Journal of Genetics & Genomics*, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 225-33, 2003.

CAPÍTULO 6. CITOGENÉTICA DE SUÍNO CASCO-DE-BURRO

Resumo – A espécie *Sus scrofa* apresenta polimorfismo cariotípico, que pode variar de 36 a 38 cromossomos. Sendo assim, estudaram-se 12 suínos cascos-de-burro de ambos os sexos, objetivando conhecer a citogenética desse animal em perigo de extinção e verificar, por meio do número diploide, possível miscigenação com o javali. O cariótipo foi organizado em cinco grupos: o primeiro ficou composto pelo par cromossômico 1, em que se observa o maior cromossomo, e de posição, segundo o centrômero, submetacêntrico. O segundo grupo foi constituído pelos pares 2, 3 e 4, em que se notam cromossomos de tamanho médio e submetacêntricos. Os pares 5 e 6 constituíram o terceiro grupo e apresentam um tamanho médio com posição subteloicêntrica. O quarto grupo foi composto pelos pares cromossômicos do 7 ao 12, sendo que são pequenos metacêntricos e foram colocados em ordem decrescente. O último grupo, o quinto, foi formado pelos pares do 13 ao 18. Os cromossomos sexuais X e Y são bem distintos, sendo colocados no canto direito do cariótipo ao lado do grupo 3. No bandejamento C, todos os cromossomos dos animais analisados apresentaram banda C positiva na região do centrômero, apenas o cromossomo Y mostrou-se quase totalmente heterocromático. No NOR, foram marcados dois cromossomos metacêntricos na região centromérica, correspondendo ao par 10. No G, o cromossomo X apresentou fortes marcações em ambos os braços, e a marcação foi pericentromérica no Y. Os cascos-de-burro possuem o número diploide $2n = 38$ cromossomos, o que demonstra possivelmente que esse grupo genético não se encontra misturado ao javali.

Palavras-chave: *Sus scrofa*, sindactilia, cariótipo, cromossomo

CYTOGENETICS OF BRAZILIAN MULEFOOT PIG

Abstract – The species *Sus scrofa* presents karyotype polymorphism, varying from 36 to 38 chromosomes. Thus, with the purpose of describing the cytogenetic characteristics of an endangered group of animals, we studied 12 Brazilian Mulefoot pigs of both sexes aiming to contribute to the karyotyping of this species and to detect possible polymorphisms. The chromosomes in the karyotype were divided into five groups: the first group consisted of pair 1, the largest chromosomes of the complement and – according to the centromere position – submetacentric; the second group comprised the medium-sized and equally submetacentric pairs 2, 3 and 4; the third group comprised the medium-sized and subtelocentric pairs 5 and 6; the fourth group comprised the small metacentric pairs 7 to 12, arranged in a decreasing order of size; the fifth group consisted of pairs 13 to 18. The sex chromosomes X and Y are quite distinct and were placed in the right corner of the karyogram, next to group 3. On C-banding, all chromosomes of the analyzed animals presented a positive band in the centromere region, except for the Y chromosome, which was almost entirely heterochromatic. On NOR staining, two metacentric chromosomes showed positive staining in the centromere region, corresponding to pair 10. On G-banding, the X chromosome presented strong staining of both arms, while the Y chromosome displayed pericentromeric staining. The Brazilian Mulefoot pigs have a diploid number of 38 chromosomes, which may prove that this group is not admixed with the wild boar.

Key words: *Sus scrofa*, syndactyly, karyotype, chromosome

6.1. INTRODUÇÃO

A diminuição do número de raça dos animal no mundo está afetando de forma drástica todas ou quase todas as espécies domésticas (ALAOUI *et al.*, 2000). Por conseguinte conhecê-las citogeneticamente é fundamental.

O número diploide (2n) dos suínos é 38 (GIANNONI, 1973). No entanto, no Brasil, é comum encontrar animais que apresentem cariótipo com 36, 37 e 38

cromossomos (MIRANDA & LUI, 2003; GIMENEZ *et al.*, 2003; GIMENEZ & LUCCA, 2005), resultantes do cruzamento do animal doméstico com o selvagem (javali). Isso se deve ao fato de ser comum criadores de javali praticarem esse cruzamento como forma de aumentar os índices zootécnicos, explorando possível efeito heterótico e consequente melhoria na lucratividade do setor (ANDERSSON *et al.*, 1998; SKEWES *et al.*, 2008), uma vez que o cruzamento entre essas subespécies gera indivíduos férteis (SEABRIGHT, 1972; MIRANDA & LUI, 2003).

Muitos desses animais cruzados foram soltos na natureza, o que contribuiu para gerar animais selvagens com características diferentes tanto no aspecto físico e genético quanto citogenético. O Ministério do Meio Ambiente, por meio da Portaria n. 102, visando a intimidar a soltura e introdução dos animais na natureza por criadores que desistiam da atividade, com consequências que afetariam desfavoravelmente a biota, exigiu o registro das propriedades e de seus respectivos plantéis, vetando a importação de mais espécimes e a abertura de novos criadouros (IBAMA, 1998).

De acordo com DARRÉ *et al.* (1992), a diferença cromossômica entre o porco e o javali provém de uma fusão Robertsoniana entre os cromossomos 15 e 17. No trabalho de MIRANDA & LUI (2003), o complemento cromossômico do javali ($2n = 36$ cromossomos) diferiu daquele do javaporco ($2n = 38$) por exibir um par de submetacêntricos resultantes da fusão Robertsoniana dos cromossomos 15 e 17. O animal com 37 cromossomos contém apenas um cromossomo submetacêntrico, formado pela fusão dos cromossomos 15 e 17.

BOSMA *et al.* (1996) realizaram um estudo citogenético comparativo entre *Sus verrucosus*, *Sus celebensis* e *Sus scrofa vittatus* e encontraram um número diploide de 38 cromossomos – o último com cariótipo idêntico ao do suíno doméstico. Esses autores acreditam que a presença de $2n = 38$ em *Sus verrucosus* e *Sus celebensis* produz uma evidência de que o número cromossômico básico do gênero *Sus* é 38. Em PANDA *et al.* (1995), um porco selvagem (macho) identificado como *Sus s. cristatus* exibiu um número diploide de 38 cromossomos, similar ao registrado para o *S. s. leucomystax* e para o *S. s. vittatus*.

No Brasil, LUI (2000) examinou 1.137 *Sus scrofa sp.* citogeneticamente e encontrou três diferentes cariótipos nas proporções de 52% para o $2n = 36$, 35% para o $2n = 37$ e 13% para o $2n = 38$, confirmando a miscigenação entre o doméstico e o selvagem. No quarto capítulo deste trabalho, foi verificado que vários dos haplótipos mitocondriais observados nos cascos-de-burro eram comuns às populações de javali da Espanha e de Portugal, embora também comuns a outras populações domésticas estudadas. Nessa perspectiva, este capítulo teve como objetivo conhecer a citogenética dos suínos cascos-de-burro, visando a contribuir com a cariotipagem da espécie e a verificar se se encontram misturados ao javali por meio de possíveis polimorfismos cromossômicos.

6.2. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, foram utilizados 12 suínos cascos-de-burro (*Sus s. domesticus*), de ambos os sexos, que apresentaram haplótipos do DNA mitocondrial comuns aos javalis europeus estudados neste trabalho. Esses animais eram provenientes de cinco criatórios da região Sudeste do Brasil e foram analisados no laboratório de Citogenética do Departamento de Zootecnia da UNESP, *campus* de Jaboticabal, SP.

6.2.1 Métodos de obtenção de material para análise de sangue

Para obtenção dos cromossomos metafásicos, foram colhidos cerca de 6 a 8 ml de sangue periférico da veia jugular ou da cava de cada indivíduo usando-se seringas descartáveis (com agulhas 40 x 12) previamente heparinizadas (anti-coagulante – Lique mine[®] 5.000 U/ml, laboratório Roche do Brasil). Os animais eram contidos pelos tratadores com o uso de cachimbos adequados. Efetuava-se, então, a desinfecção do local de colheita usando-se algodão embebido em álcool iodado, e o sangue era lentamente puncionado da veia cava a fim de evitar hemólise e, logo após, o mesmo era transferido para tubos de ensaio de 15 cm de comprimento, previamente esterilizados em autoclave, por 20 minutos a 120°C e hermeticamente fechados com

rolhas de látex, mantidas em álcool 98° GL e flambadas no momento do fechamento. No campo, esses tubos eram identificados de acordo com o animal, colocados em estantes galvanizadas, que eram guardadas em caixas de isopor levemente resfriadas com gelo e transportados ao laboratório para que ocorresse a sedimentação das células sanguíneas.

6.2.2 Cultura de linfócito

Os cromossomos metafásicos eram obtidos a partir da cultura de cerca de 7 a 9 gotas do anel leucocitário sedimentado do sangue periférico e retirado por meio de pipetas Pasteur. A técnica empregada foi a de MOORHEAD *et al.* (1960), modificada e atualizada. Cada amostra de sangue de um animal a ser analisado citogeneticamente correspondia a um vidro de capacidade de 20 ml, no qual eram acondicionados 8,0 ml de meio de cultura HAM F10, enriquecido com 2,0 ml de soro equino inativado e 0,4 ml de fitohemaglutinina, ambos de fabricação no próprio laboratório. Nos vidros assim preparados, adicionava-se a quantidade de anel leucocitário citado, sob rigorosa assepsia, que envolvia sala estéril e capela de fluxo laminar com radiação ultravioleta prévia.

Em seguida, os frascos, levemente agitados, eram mantidos em estufa a 37°C por 72 horas e, nos 60 minutos finais, eram adicionadas 2 gotas de colchicina a 0,0016%. O volume era transportado para um tubo de centrífuga de pirex, e, a baixa rotação por 6 a 10 minutos, as células sedimentavam-se no fundo destes. Desprezava-se o sobrenadante e ressuspendiam-se as células com 1,0 ml de solução hipotônica KCl 0,075M, com vigorosa agitação. Repetia-se esse processo por mais 3 vezes até completar o volume final de 5,0 ml.

Cerca de 1,0 ml de solução fixadora (metanol 3:1 ácido acético) era adicionada, e os tubos centrifugados por 6 a 10 minutos. Desprezando-se o sobrenadante, as células eram ressuspendidas com solução fixadora por mais duas vezes, trocando-se o fixador a cada vez. Com o último sedimento e mais 1,0 ml de fixador, preparavam-se as lâminas. A coloração do material era feita com Giemsa em solução tamponada ou em solução a 3%.

6.2.3 Preparo das lâminas e fotomicroscopia

Para a análise cariotípica, duas ou três gotas do material final foram espalhadas em lâminas histológicas, sendo que a técnica convencional de coloração uniforme dos cromossomos permitiu o conhecimento do número diploide da espécie, do tamanho dos cromossomos e dos braços correspondentes bem como da posição dos centrômeros.

As melhores metáfases, respeitando o número completo para a espécie e coloração uniforme, foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio da marca Zeiss.

6.2.4. Construção dos cariótipos

A montagem dos cariótipos sob coloração Giemsa e bandamentos C, G e NOR baseou-se em fotografias de metáfase, em que os cromossomos foram classificados e separados em cinco grupos, de acordo com o tamanho e a posição dos centrômeros.

A disposição dos cromossomos no cariótipo foi realizada conforme o idiograma elaborado para a espécie (FORD *et al.*, 1980; GUSTAVSSON, 1988), e os homólogos pareados segundo as suas identificações.

6.2.5 Métodos de formação e análises das bandas C, G e NOR

6.2.5.1 Bandamento C

A técnica de formação de banda C foi baseada na de SUMNER (1972), com modificações, as quais compreenderam, basicamente, a utilização das lâminas novas recém-coradas em Giemsa 1:30 e mergulhadas em solução de HCl 0,02N por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, eram colocadas em solução a 0,02N de Ba(OH)₂ por 12 minutos e deixadas em 2X SSC (solução salina citratada) por 1 hora. Por último, eram coradas novamente em Giemsa a 2% por 20 minutos e, após a secagem ao ar, analisadas, primeiramente, ao microscópio óptico comum. As que apresentavam melhores padrões de banda C eram selecionadas e fotografadas. Os

cromossomos marcados foram estudados e pareados de acordo com o par de homólogo correspondente.

6.2.5.2 Bandamento G

A técnica descrita por SHERES (1972), com algumas modificações, foi utilizada neste estudo, de forma que, inicialmente, as lâminas previamente preparadas eram imersas em solução de tripsina (DIFCO 1:250) 0,1% em tampão fosfato 0,06 N e pH 6,8 por um período de tempo que variava de 1 a 5 segundos e a 37 °C; em seguida, eram lavadas em água destilada e coradas em solução de Giemsa 1:30, em tampão fosfato 0,06 N. As melhores metáfases eram fotografadas, e os cromossomos pareados de acordo com o mesmo padrão de banda.

6.2.5.3 Bandamento NOR

A técnica de banda NOR utilizada neste trabalho foi a indicada por GOODPASTURE & BLOOM (1975), com algumas modificações, usando-se impregnação pela prata da região organizadora do nucléolo. Lâminas preparadas, coradas ou não, receberam duas gotas de nitrato de prata a 50% em água deionizada mais uma gota de gelatina a 2% de ácido fórmico. Estas ficavam na estufa a aproximadamente 60°C por 5 minutos, cobertas com lamínula até que se tornavam douradas. Após o bandamento NOR, realizou-se a análise das melhores metáfases marcadas pela prata, que foram fotografadas. Também para a banda NOR, foi montado o cariótipo, analisando-se os possíveis polimorfismos das regiões coradas pela prata, identificando-se os cromossomos para montagem do cariótipo.

6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número, a morfologia, a disposição e o tamanho dos cromossomos de suíno casco-de-burro fêmea podem ser observados na Figura 1. Nessa Figura, de acordo com a ordenação dos cromossomos, segundo o tamanho e a posição dos centrômeros, foram classificados em 5 grupos. O primeiro ficou composto pelo par cromossômico 1,

em que se observa o maior cromossomo, e de posição, segundo o centrômero, submetacêntrico. O segundo grupo foi constituído pelos pares 2, 3 e 4, em que se notam cromossomos de tamanho médio e submetacêntricos. Os pares 5 e 6 constituíram o terceiro grupo, apresentando tamanho médio com posição subtelo-cêntrica. O quarto grupo foi composto pelos pares cromossômicos do 7 ao 12, sendo que são pequenos metacêntricos e foram colocados em ordem decrescente. O último grupo, o quinto, foi formado pelos pares dos 13 ao 18, todos acrocêntricos, em que não se observam os pequenos braços, pois a coloração utilizada (Giemsa) não permite a visualização. Nesse grupo, o par 13 destaca-se pelo seu maior tamanho. Os cromossomos sexuais X e Y são bem distintos e foram colocados no canto direito do cariótipo na mesma linha do grupo 3. O cromossomo X é submetacêntrico de tamanho médio, semelhante ao primeiro par do terceiro grupo, enquanto, nos machos (Figura 2), o Y é o menor do cariótipo.

O Número Fundamental (NF = número de braço cromossômico) foi 64, igualmente relatado por outros estudos, que demonstram que esse número se mantém constante, mesmo nos cariótipos $2n = 36, 37$ e 38 (MIRANDA & LUI, 2003; GIMENEZ *et al.*, 2003; GIMENEZ & LUCCA, 2005). Isso é explicado pelo fato de mudanças no número cromossômico, normalmente, resultarem de rearranjos cromossômicos sem perda ou acréscimo de partes cromossômicas (fusões ou fissões), como ocorreu nos animais estudados por MIRANDA & LUI (2003), enquanto mudanças no número de braço são atribuídas às inversões (WILSON *et al.*, 1975), o que não foi observado no presente trabalho, tampouco em nenhum dos consultados. Consoante WILSON *et al.* (1974), os artiodáctilos são, entre os mamíferos, os que menos possuem mudanças evolutivas no número fundamental.

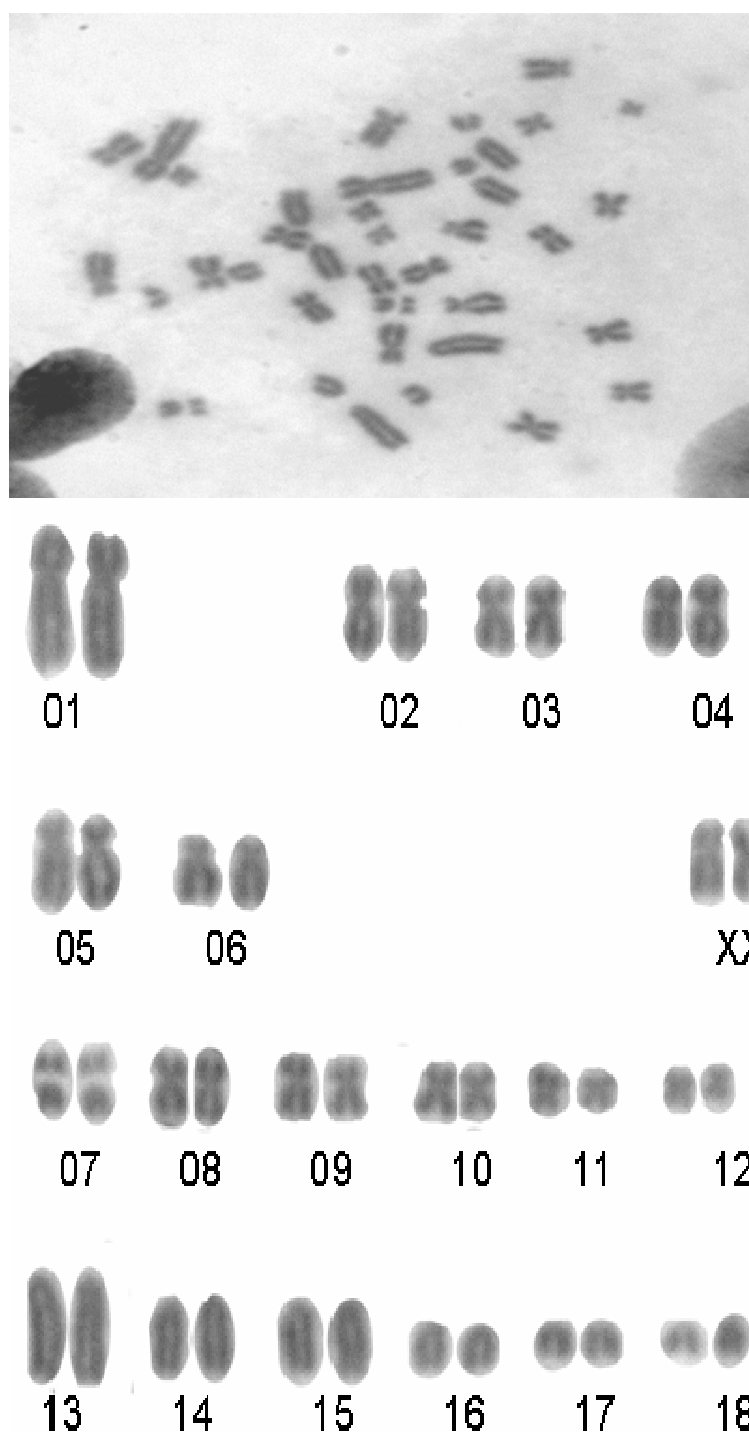


Figura 1. Cariótipo de suíno casco-de-burro (*Sus scrofa domestica*) fêmea, $2n = 38$ (NF = 64)

O polimorfismo cromossômico ($2n=36$, $2n=37$ e $2n=38$) encontrado em animais do Brasil (MIRANDA & LUI, 2003; GIMENEZ *et al.*, 2003; GIMENEZ & LUCCA, 2005) foi também observado por diversos autores (MCFEE *et al.*, 1966; MCFEE & BANNER, 1969; TIKHONOV & TROSHINA, 1975; BOSMA, 1976; BOSMA *et al.*, 1983; DARRÉ *et al.*, 1992) estudando *Sus s. scrofa* bem como outras subespécies de javali. Contudo, atualmente, considera-se o cariótipo padrão para o javali europeu (*Sus s. scrofa* L.) como $2n = 36$ (DARRÉ *et al.*, 1992).

MAYR (1977) admitiu que as alterações cromossômicas são consequências de um processo de isolamento mais amplo, no qual o isolamento geográfico é o elemento mais importante. Segundo WHITE (1977), as alterações cromossômicas podem, todavia, ser a causa da especiação, constituindo-se na primeira barreira entre os indivíduos da espécie. Entretanto, como é sabido, mesmo existindo polimorfismo cromossômico, as subespécies da espécie *Sus scrofa* são férteis entre si e geram indivíduos férteis. Isso ocorre porque, mesmo que o cruzamento do porco (38 cromossomos) com o javali (36) resulte em um exemplar com 37 cromossomos, que é ímpar, não confere alterações na meiose, uma vez que, nesse caso, os cromossomos das subespécies paream-se perfeitamente durante a meiose, produzindo gametas ora com 18 ora com 19 cromossomos. Ou seja, possuem os mesmos cromossomos, com pequenos rearranjos (fissão ou fusão).

A estrutura dos cromossomos e a qualidade da cromatina na região do centrômero parecem desempenhar uma importante função nos rearranjos dos cromossomos do porco (SYSA, 1980). Trabalhando com porcos selvagens, SYSA (1980) encontrou polimorfismo da cromatina centromérica nos cromossomos 1, 7, 12, 13, 15, 16 e 18. No presente trabalho, entretanto, não foi encontrado polimorfismo de cromatina centromérica em *Sus scrofa domesticus*. Na técnica de bandamento C, todos os cromossomos dos animais analisados neste trabalho apresentaram banda C⁺ na região do centrômero, como pode ser observado na Figura 2, e o cromossomo Y mostrou-se quase inteiramente heterocromático.

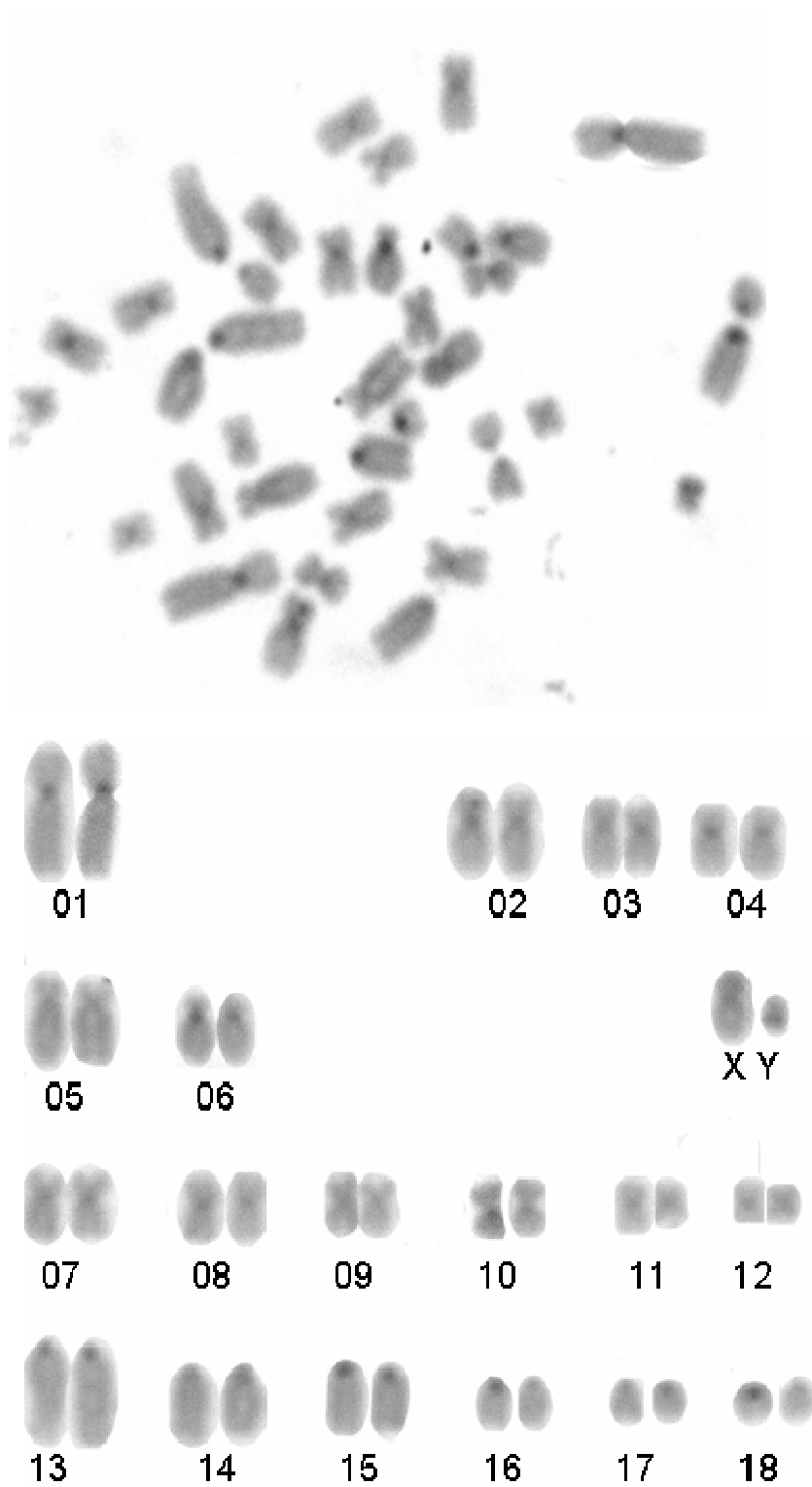


Figura 2. Cariótipo de suíno casco-de-burro (*Sus scrofa domestica*) macho, sob bandamento C (NF = 64)

É bastante comum encontrar diferentes tamanhos das bandas C entre os cromossomos homólogos, como pôde ser observado neste trabalho, e talvez tal fato deva-se às variações do conteúdo da heterocromatina constitutiva, que, em virtude de ser formada por sequência de DNA repetitivo, ficaria sujeita às modificações, no entanto sem prejuízo da informação genética (MIRANDA, 2000).

As metáfases submetidas à técnica de bandamento NOR (Figura 3) apresentaram marcações em dois cromossomos, correspondentes ao par 10. Esses resultados corroboram os de GIANNONI *et al.* (1980), mas discordam dos de MIRANDA & LUI (2003), que encontraram marcações em dois pares de cromossomo, o 7 e o 10.

Foram encontradas também variações inter e intraindividuais quanto à intensidade e ao número de cromossomo marcado, o que confirma os resultados encontrados por MELLINK *et al.* (1994), que trabalharam com porcos domésticos. Têm-se acumulado evidências, sugerindo que a coloração com Ag-NOR reflete atividade dos genes do RNAr mais propriamente que meramente a presença desses genes. O método de Ag-NOR não cora todos os locais de DNAr, mas aqueles que estão com sítios ativos transcricionalmente ou que já tenham sido transcritos (HOWELL, 1977).

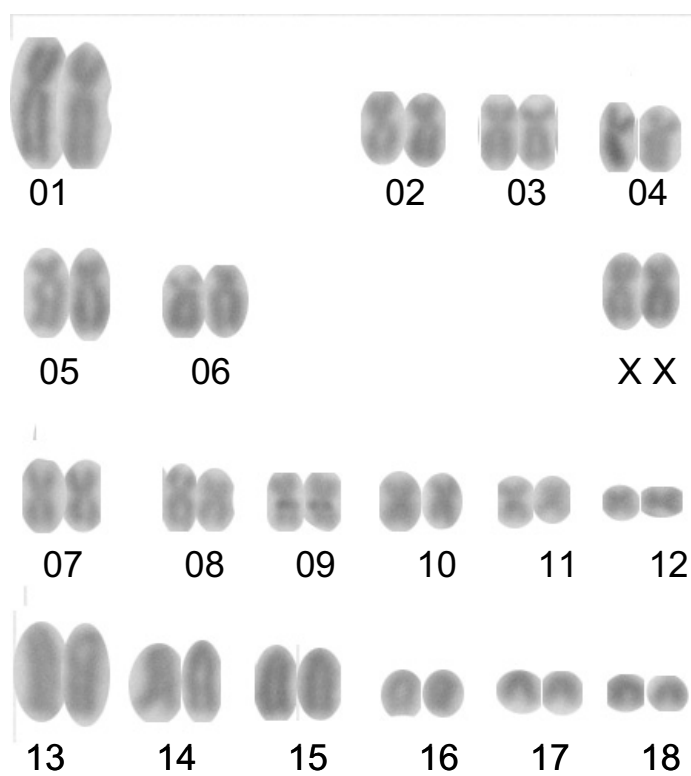
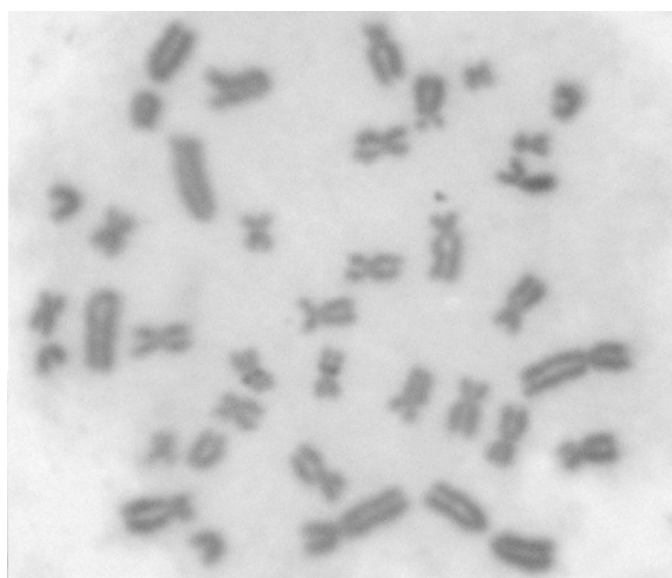


Figura 3. Cariótipo de suíno casco-de-burro (*Sus scrofa domesticus*) fêmea, sob bandamento NOR (NF = 64)

O bandamento G oferece uma marcação distinta dos demais, sendo de grande importância, pois auxilia o pesquisador na identificação precisa dos cromossomos, principalmente na elucidação dos problemas reprodutivos que os animais possam apresentar. O cromossomo X apresenta fortes marcações em ambos os braços (Figura 4). No cromossomo Y, a marcação é pericentromérica (Figura 4). Essa banda permite que cada par seja mais facilmente identificado, uma vez que apresenta padrões específicos de marcação positiva e negativa, com bandas variando no tamanho e intensidade da coloração. Esse bandamento é uma ferramenta que o citogeneticista possui para identificar os pares homólogos com certa precisão. Na metáfase da Figura 4, tem-se quase todos os cromossomos pareados segundo o mesmo padrão entre os homólogos.

Cromossomos metafásicos submetidos ao bandamento G apresentam, em microscopia de luz, regiões cromoméricas (escuras ou banda G), relacionadas à heterocromatina constitutiva intercalar, e regiões intercromoméricas (claras ou banda R), representando a eucromatina, que se dispõe alternativamente, segundo um padrão específico para cada espécie, ao longo dos braços cromossômicos (OKADA & COMINGS, 1974).

De acordo com HOLMQUIST (1988), o padrão da banda G está intimamente relacionado a uma alternância do padrão das diferenças no DNA e nas proteínas cromossômicas. Para esse autor, as bandas escuras (ou G), quando comparadas com as claras (ou R), apresentam maior porcentagem de nucleotídeos AT (adenina e timina) que CG (citosina e guanina); são ricas em sequências repetitivas intercaladas longas (*LINEs-Long Interspersed Nuclear Element*), onde se localizam os sítios de restrição para KpnI, e carentes em sequências repetitivas intercaladas curtas (*SINEs-Short Interspersed Nuclear Element*); e possuem replicação tardia, iniciando na metade da fase S e findando no início da prófase.

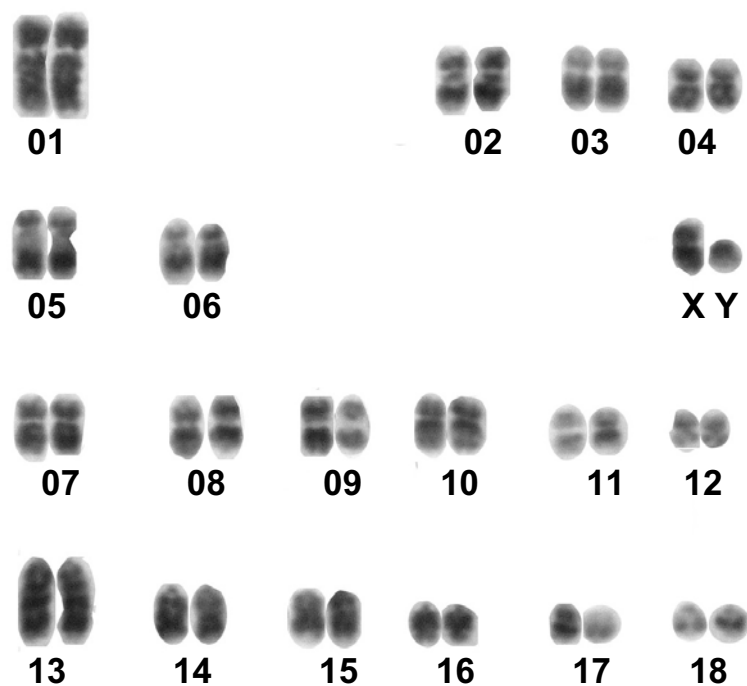
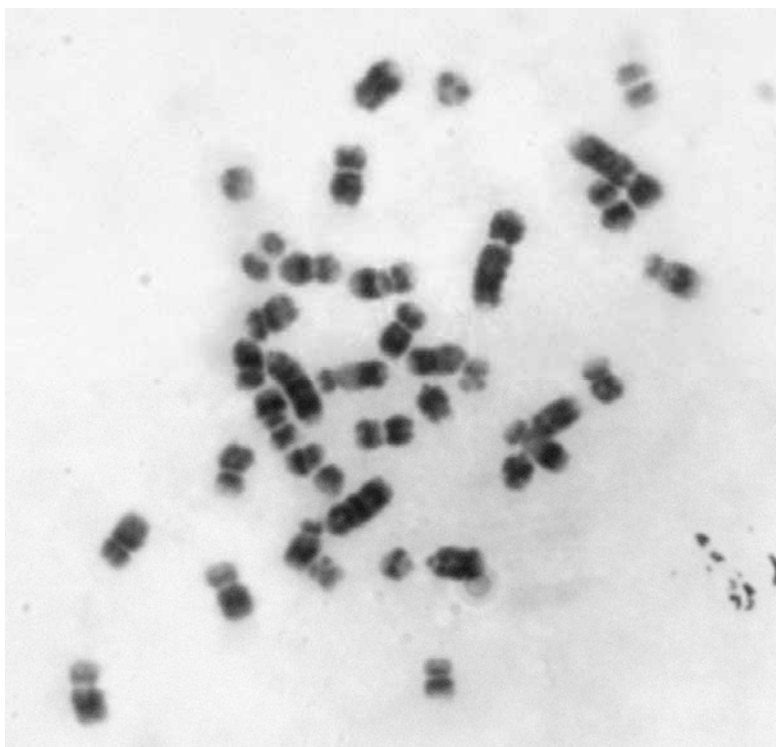


Figura 4. Cariótipo de suíno casco-de-burro (*Sus scrofa domesticus*) macho, sob bandamento G (NF = 64)

Na análise citogenética de javali (*Sus scrofa scrofa* – $2n = 36$), o bandamento G é empregado com o intuito de caracterizar responsáveis pelo par submetacêntrico extra do javali puro em relação ao suíno doméstico (CAPUTO, 2005). Nos javalis de procedência asiática, os cromossomos envolvidos são 16 e 17, enquanto, nos de procedência europeia, são 15 e 17 (REJDUCH *et al.*, 2003).

Do mesmo modo que os domésticos, o javali foi introduzido na América do Sul com a finalidade da caça, especificamente na Argentina (1904-1906). Depois se iniciou um processo de importação da Europa para o Uruguai e, finalmente, para o Brasil (MIRANDA & LUI, 2003). Atualmente, no Brasil, existem criações desses animais, e a ocorrência de cruzamento entre javali e suíno é bastante comum (Apêndice 5 e 6).

No quarto capítulo deste trabalho, foi verificado que vários dos haplótipos mitocondriais observados nos cascos-de-burro eram comuns às populações de javali da Espanha e de Portugal, embora também comuns a outras populações domésticas estudadas. Seria possível que esses haplótipos tivessem chegado aos domésticos por meio de cruzamento com o javali. No entanto os cascos-de-burro estudados neste capítulo que apresentaram haplótipos em comum com o selvagem tiveram ploidia $2n = 38$, mostrando possivelmente não estar misturados ao javali, o que leva a crer que os demais domésticos que apresentaram os mesmos haplótipos comuns aos selvagem podem também não apresentar ploidia 36 e 37.

Como visto ainda no Capítulo 4, um javali da Espanha apresentou haplótipo asiático, o que demonstra possivelmente cruzamento do doméstico com o selvagem. Se esse animal tivesse sido cariotipado, possivelmente seu número diploide seria $2n = 37$.

O trabalho de FANG *et al.* (2006) demonstra, com base no DNA mitocondrial, que os javalis europeus com cariótipo $2n = 36$ estão estreitamente relacionados com outros javalis e porcos domésticos de países europeus com cariótipo $2n = 38$. No entanto os tipos de mtDNA encontrados nesses animais foram claramente distintos dos encontrados em alguns javalis italianos e em alguns, provavelmente selvagens, porcos da Sardenha (GIUFFRA *et al.* 2000; LARSON *et al.* 2005). O resultado é consistente pelo fato de javalis com $2n = 36$ e $2n = 38$ se acasalarem, e os com $2n = 37$ são encontrados na Europa Central (REJDUCH *et al.*, 2003). Note-se que a fusão cêntrica

entre os cromossomas 15 e 17 nos javalis com $2n = 36$ representa apenas um evento único de mutação (FANG *et al.*, 2006). Assim, essa alteração no cariótipo pode refletir um efeito fundador ou uma variação genética durante o desenvolvimento da população de javali na Europa Ocidental. Desse modo, segundo FANG *et al.* (2006), não se pode excluir a possibilidade de os javalis com $2n = 36$ terem contribuído para o desenvolvimento dos suínos domésticos da Europa, apesar da diferença no cariótipo.

A semelhança entre alguns haplótipos de mtDNA europeus com os haplótipos asiáticos apresentam sinais claros de uma expansão populacional recente (LARSON *et al.* 2005; FANG & ANDERSSON, 2006). FANG & ANDERSSON (2006) afirmam, com base na divergência média de sequências entre os haplótipos mitocondriais dos clusters europeus, que essa expansão populacional começou antes da domesticação. O estudo de FANG *et al.* (2006) fornece um forte apoio a essa interpretação, uma vez que a análise de rede de haplótipo mostra que as sequências de DNA mitocondrial de javalis com $2n = 36$ são intercaladas com haplótipos de suínos domésticos europeus e parecem ter origem a partir da expansão da mesma população, que, portanto, deve ter ocorrido antes da domesticação. Caso contrário, deveria ter havido uma miscigenação tão intensa entre os porcos domésticos e as populações de javali que o seu *pool* de mtDNA teria sido substituído, o que, para FANG *et al.* (2006), parece bastante improvável dado os cariótipos distintos e as diferenças na distribuição dos tipos de mtDNA.

Na maioria dos casos, porém, a variabilidade cariotípica frequentemente identificada nas populações de javali é atribuída às hibridações com o suíno doméstico (MCFEE *et al.*, 1966; GUSTAVSSON *et al.*, 1973; GIANNONI *et al.*, 1980; LUI, 2000), e as características fenotípicas dos mestiços são tão diferentes quanto menor o seu grau de sangue (GIMENEZ, 2001).

O fato de domésticos e selvagens, embora com cariótipos numericamente distintos, apresentarem, com bastante frequência, haplótipos mitocondriais comuns indica que o DNA mitocondrial não é bom marcador para inferir miscigenação entre javali e suíno.

Consoante BOSMA (1976), o número diploide do suídeo primitivo era igual a $2n = 38$, o qual sofreu redução para $2n = 36$, devido a um rearranjo espontâneo do tipo fusão cêntrica entre dois pares de cromossomo acrocêntrico e devido a, com a domesticação, um dos pares submetacêntricos do javali, por fissão cêntrica, originar dois pares acrocêntricos no suíno. Javalis encontrados na Iugoslávia e no Japão (*Sus vittatus leucomystax*), em áreas onde, por razões religiosas, não há contato com suínos domésticos, apresentaram número diploide igual a $2n = 38$ (ZIVKOVIC *et al.*, 1970). Esta é a ploidia determinada também para *Sus salvanius*, *Sus verrucosus* e *Sus celebensis*, sendo outra forte evidência para número cromossômico básico do gênero ser 38 (BOSMA *et al.*, 1991).

Os processos de domesticação e seleção artificial dos suídeos fizeram com que novos rearranjos fossem fixados. O número diploide $2n = 38$ do suíno doméstico é decorrente de uma fissão cêntrica ocorrida nos cromossomos submetacêntricos do seu ancestral, o javali (MCFEE *et al.*, 1966). De acordo com TIKHONOV & TROSHINA (1978), um número maior de cromossomo é extremamente vantajoso para qualquer espécie, pois aumenta a probabilidade de combinações gênicas e, com isso, o grau de heterose e as chances de adaptação.

De forma geral, o número de cromossomo e a estrutura são característicos de uma espécie animal, por isso o cariótipo varia, muitas vezes, entre espécie. Os javalis na Europa Ocidental têm $2n = 36$, enquanto a maioria dos javalis selvagens da Europa Central e da Ásia bem como todos os suínos domésticos têm $2n = 38$. A diferença entre os dois cariótipos é uma fusão cêntrica única entre os cromossomas 15 e 17, resultando no cariótipo $2n = 36$. Ainda não foram estudados em pormenor a fronteira exata entre as populações de javali com cariótipo diferente ou em que medida ocorre naturalmente a miscigenação entre as populações.

6.4. CONCLUSÃO

A citogenética é mais uma ferramenta que a genética dispõe e que foi utilizada na tentativa de se obter a caracterização dos cascos-de-burro. Por meio das análises

convencionais de coloração e das técnicas de bandamento C, NOR e G, pôde-se determinar o número de cromossomo e a morfologia dos homólogos.

Os cascos-de-burro possuem o número diploide $2n = 38$ cromossomos, o que demonstra possivelmente que esse grupo genético não se encontra misturado ao javali.

6.5. REFERÊNCIA

ALAOUI, N.; PONSÁ, M.; JORDANA, J. **Caracterización citogenética de cinco razas españolas em peligro de extinción**. 2000. Disponível em: <www.etsia.upv.es/ACTEON/Aida2001/docs/asnos1.pdf> Acesso em: 22 dez. 2009.

ANDERSSON, L. *et al.* Mapping qualitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar x large white intercross. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, p.694-700, 1998.

BOSMA, A. A. Chromosomal polymorphism and G-banding patterns in the wild boar (*Sus scrofa L.*) from the Netherlands. **Genetica**, Dordrecht, v. 46, n. 4, p. 391-399, 1976.

BOSMA, A. A.; OLIVER, W. L. R.; MACDONALD, A. A. The karyotype, including G- and C-banding patterns, of the pigmy hog *Sus (Porcula) salvanius (Suidae, Mammalia)*. **Genetica**, Dordrecht, v.61, n. 2, p. 99-106, 1983.

BOSMA, A. A. *et al.* Chromosome homology between the domestic pig and the babirusa (family *Suidae*) elucidated with the use of porcine painting probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 75, n. 1, p. 32-35, 1996.

BOSMA, A. A. *et al.* Comparative cytogenetic studies in *Sus verrucosus*, *Sus celebensis* and *Sus scrofa vittatus* (Suidae, Mammalia). **Genetica**, Gravenhage, v. 83, n. 3, p. 189-194, 1991.

CAPUTO, D. Z. **Variabilidade genética entre suínos, javalis e seus híbridos**. 2005. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

DARRÉ, R. *et al.* Statut chromosomique des populations de sangliers sauvages et d'élevages en France. **Revue de Médecine Vétérinaire**, Paris, v. 143, n. 3, p. 225-232, 1992.

FANG, M. *et al.* Mitochondrial haplotypes of European wild boars with $2n = 36$ are closely related to those of European domestic pigs with $2n = 38$. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 459-464, 2006.

FANG, M.; ANDERSSON, L. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Science**, London, v. 273, n. 1525, p. 1803-1810, 2006.

FORD, E.; POLLOCK, D. L.; GUSTAVSSON, I. Proceedings of the First International Conference for the Standardisation of banded karyotypes of domestic animals. **Hereditas**, Malden, v. 92, n. 1, p. 145-162, 1980.

GIANNONI, M. A. **Contribuição ao estudo da evolução cariotípica de algumas espécies da família *suidae***. 250 f. 1973. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Agronomia de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1973.

GIANNONI, M. A.; FERRARI, I.; GIANNONI, M. L. Padrões de formação de bandas Ag (bandas pela prata) nos cromossomos das subespécies *Sus scrofa scrofa* (javali) e *Sus scrofa* (suíno doméstico). In: SIMPÓSIO NACIONAL TÓPICOS AVANÇADOS EM REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., 1980, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: Unesp-FCAV, 1980. p. 27-41

GIANNONI, M. L.; GIANNONI, M. A.; FERRARI, I. Métodos para a formação de padrões de bandas cromossômicas. **Citogenética Aplicada às Aves: Técnicas**. Piracicaba: FEALQ, 1989. p. 53-55.

GIMENEZ, D. L. **Análise cromossômica do Javali europeu *Sus scrofa scrofa* e de hibridações com o suíno doméstico *Sus scrofa domesticus* comparando as características qualitativas da carcaça e da carne**. 2001. 90 f. Dissertação (Mestrado

em Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

GIMENEZ, D. L.; LUCCA, E. J. Análise citogenética e comparação das características da carcaça e da carne em *Sus scrofa scrofa* (javali europeu). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 5, p. 1-5, 2005.

GIMENEZ, D. L. *et al.* Análise cromossômica e molecular do javali europeu *Sus scrofa scrofa* e do suíno doméstico *Sus scrofa domesticus*. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 146-154, 2003.

GIUFFRÀ, E. *et al.* The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, Bethesda, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GOODPASTURE, C.; BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer in mammalian chromosomes using silver staining. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 53, n. 1, p. 37-50, 1975.

GUSTAVSSON, I. Standard karyotype of the domestic pig. **Hereditas**, Malden, v. 109, n. 2, p. 151-157, 1988.

GUSTAVSSON, I. *et al.* Identification of Chromosomes in a Centric Fusion/Fission Polymorphic System of the Pig (*Sus scrofa L.*). **Hereditas**, Malden, v. 75, n. 1, p. 153-155, 1973.

HOLMQUIST, G. DNA sequences in G-bands and R-bands. In: ADOLPH, K. W. **Chromosomes and Chromatin**. Florida: CRC, 1988, v. 2, p. 76-88.

HOWELL, W. M. Visualization of ribosomal gene activity: Silver stains proteins associated with rRna transcribed from oocyte chromosomes. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 62, n. 4, p. 361-367, 1977.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº102 de 15 jul. 1998. **Diário oficial [da] União, Brasília**, 15 jul. 1998.

LARSON, G. *et al.* Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centres of pig domestication. **Science**, Washington, v. 307, n. 5715, p. 1618-1621, 2005.

LUI, J. F. Estudo citogenético de javalis puros (*Sus scrofa scrofa*) e híbridos nas regiões Sudeste e Sul do Brasil. **Revista Educação Continuada**, São Paulo, v. 3, p. 43-48, 2000.

MAYR, E. **Populações, espécies e evolução**. São Paulo: EDUSP, 1977. 485p.

MCFEE, F.A.; BANNER, M. W.; RARY, J. M. Variation in chromosome number among European wild pigs. **Cytogenetics**, Basel, v. 5, n. 1/2, p. 75-81, 1966.

MCFEE, F. A.; BANNER, M. W. Inheritance of chromosome number in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 9-14, 1969.

MELLINK, C. H. M.; BOSMA, A. A.; DE HAAN, N. A. Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA in situ hybridization signals in six breeds of domestic pig. **Hereditas**, Malden, v. 120, n. 2, p.141-149, 1994.

MIRANDA, L. L. **Citogenética e alguns parâmetros biométricos do Javali (*Sus scrofa scrofa* L.) em criatórios comerciais das regiões Sul e Sudeste do Brasil**. 2000. 94 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

MIRANDA, L. L.; LUI, J. F. Citogenética do javali em criatórios comerciais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1289-1295, 2003.

MOORHEAD, P. S. *et al.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, Maryland Heights, v. 20, p. 613-616, 1960.

OKADA, T. A.; COMINGS, D. E. Mechanism of chromosome banding. III Similarity between G-bands of mitotic chromosomes and chromosomes of meiotic chromosomes. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 48, n. 1, p. 65-71, 1974.

PANDA, A. K. *et al.* Chromosome study on a wild boar from Sunderban Tiger Reserve. **Indian Journal of Animal Science**, Pusa, v. 65, n. 11, p. 1272-1274, 1995.

REJDUCH, B. *et al.* Chromosome Number Polymorphism in a Litter of European Wild Boar (*Sus scrofa scrofa* L.). **Animal Science Papers and Reports**, Jastrzebiec, v. 21, n. 1, p. 57-62, 2003.

SEABRIGHT, M. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangement in the chromosome of man. **Chromosoma**, Heidelberg, v. 36, n. 2, p. 204-10, 1972.

SHERES, J. M. J. C. Human chromosome banding. **Lancet**, London, v. 1, p. 849, 1972.

SKEWES, O. *et al.* Carcass and meat quality traits of wild boar (*Sus s. scrofa*) with $2n = 36$ karyotype compared to those of phenotypically similar crossbreeds ($2n = 37$ and $2n = 38$) raised under same farming conditions. 1. carcass quantity and meat dressing. **Meat Science**, Amsterdam, v. 80, n. 4, p. 1200-1204, 2008.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, Maryland Heights, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

SYSA, P. S. Polymorphism of metaphase chromosomes in swine (*Sus scrofa* L.) **Genetica**, Dordrecht, v. 52/53, n. 1, p. 312-315, 1980.

TIKHONOV, V. N.; TROSHINA, A. Chromosome translocations in the karyotypes of Wild Boars *Sus scrofa* L. of the European and the Asian Areas of USSR. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 45, n. 7, p. 304-308, 1975.

TIKHONOV, V. N.; TROSHINA, A. I. Introduction of Two Chromosomal Translocations of *Sus scrofa nigripes* and *Sus scrofa scrofa* into the Genome of *Sus scrofa domestica*. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 53, n. 6, p. 261-264, 1978.

WHITE, M. J. D. **Os Cromossomos**. São Paulo: EDUSP, 1977. 196 p.

WILSON, A. C.; SARICH, V. M.; MAXSON, L. R. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies on rates of chromosomal, protein, and anatomical evolution. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 71, n. 8, p. 3028-3030, 1974.

WILSON, A. C. *et al.* Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 72, n. 12, p. 5061-5065, 1975.

ZIVKOVIC, S. *et al.* Chromosome Complement of the European Wild Pig (*Sus scrofa* L.). **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 27, n. 2, p. 224-226, 1970.

Capítulo 7. IMPLICAÇÕES

Embora a domesticação animal tenha-se iniciado há 12 mil anos, antes da chegada dos portugueses em 22 de abril de 1500, o Brasil não possuía animais domésticos: “...o povo desta terra não lavra, nem cria, nem aqui há boi, nem vaca, nem cabra, nem ovelha, nem galinha, nem qualquer outra alimária...”. Essa ausência de animal doméstico foi indicada na carta enviada por Pero Vaz de Caminha ao rei Dom Manuel em abril de 1500.

Os brasileiros, indígenas, que habitavam o Brasil em 1500 viviam da caça, da pesca e da agricultura rudimentar de milho, amendoim, feijão, abóbora, batata-doce e, principalmente, mandioca, enquanto os europeus, desde o período neolítico, já exploravam os animais domésticos para a sua sobrevivência. Os autóctones brasileiros alimentavam-se dos animais de pequeno porte, como queixada e capivara. Não conheciam o cavalo, o boi nem a galinha.

Foi somente a partir de 1530, com a expedição organizada por Martim Afonso de Souza, que a coroa portuguesa começou a interessar-se pela colonização da nova terra. A razão desse interesse residia no fato de os portugueses recearem perder as novas terras para invasores que haviam ficado de fora do Tratado de Tordesilhas, como os franceses, holandeses e ingleses. Navegadores e piratas desses povos estavam praticando a retirada ilegal de madeira das matas brasileiras. Assim, a colonização seria uma das formas de ocupar e proteger o território. Deu-se, então, a introdução dos animais domésticos para uso dos colonizadores na alimentação e no trabalho.

O Brasil foi o único país do continente americano que recebeu raças de origem portuguesa, ocorrendo a primeira introdução 32 anos após a chegada dos portugueses, através do porto de São Vicente, no ano de 1532 (CAVALCANTI, 1985), seguida do desembarque de diversos animais na costa de Pernambuco e na Bahia (MARIANTE & CAVALCANTE, 2006). Além das raças portuguesas, houve a introdução de suíno de origem espanhola, trazido pelas expedições que tinham como destino a Bacia do Prata, nas fronteiras com o Uruguai, a Argentina e o Paraguai (REVIDATTI, 2009).

É possível que tenha havido introdução direta dos suínos das raças espanholas no Brasil, devido ao domínio que a Espanha manteve sobre Portugal entre 1580 e 1640. O estímulo à penetração pelo interior teria sido a principal consequência desse domínio para o Brasil, pois o Tratado de Tordesilhas, que dividia terras entre Portugal e Espanha, foi suspenso, favorecendo a expansão da pecuária e as necessidades do bandeirismo.

Tanto a evolução animal quanto a sua expansão foram moldadas pelo homem ao longo das gerações, devido aos movimentos migratórios e ao estabelecimento do ser humano nas mais diversas regiões. Os suínos foram introduzidos na América durante os primeiros anos da colonização. A história das raças nativas brasileiras foi coetânea ao descobrimento do Brasil e à expansão dos colonizadores no continente americano.

No Brasil, a evolução histórica desses recursos zoogenéticos teve características que podem ser agrupadas em três etapas. A primeira, que vai da chegada dos animais em 1532 até meados do século XX, caracterizou-se pela introdução, multiplicação e difusão de exemplares das diferentes espécies, incluindo os suínos. Esses animais introduzidos no Brasil multiplicaram-se e, por meio de uma seleção, imposta por clima, tipo de solo, altitude, oferta alimentar, doenças endêmicas, parasitismo, deram origem às nossas raças nativas, que possuem composição genética própria e adaptada a nichos ecológicos específicos. Esses animais eram muito importantes, pois constituíam a principal fonte de proteína da época, sendo também muito comum o uso de gordura animal na alimentação humana até os primeiros 50 anos do século XX.

Na segunda etapa, que se estende de 1950 a 1990 aproximadamente, esses animais sofrem um processo de desvalorização com a introdução de raça exótica, que

foi adotada com o objetivo de atender à modernização da agricultura, em decorrência dos novos conceitos que formavam a chamada Revolução Verde. O resultado desse processo foi a drástica redução dos animais de raça nativa, ficando estes em vias de extinção. A terceira etapa, iniciada após 1990 e que se estende até a atualidade, surge – embora continue a introdução de raças exóticas – como uma revalorização desses grupos genéticos nativos, por meio de planos de conservação e da sua utilização na agricultura de subsistência, além de seu reconhecimento como patrimônio genético do país.

Acredita-se que este trabalho represente a maior resenha de caracterização genética em suíno casco-de-burro, além de ter colocado, pela primeira vez, um grupo genético de suíno nativo do Brasil na pauta de estudos internacionais, no âmbito ibero-americano, em que se procurou mostrar uma relação direta desses animais com seus possíveis ancestrais. A área ibero-americana constitui uma região em que os vínculos históricos, culturais e sociais são consideravelmente fortes, por isso as relações que ligam a Península Ibérica com a América Latina chegam a influenciar até a filogenia das raças dos animais domésticos de ambos os lados do Atlântico, assim como os sistemas de criação aplicados nas duas regiões, especialmente no que se referem às raças autóctones e a seus sistemas de exploração. A princípio, isso levaria a supor que existiria uma relação filogenética entre os cascos-de-burro e as raças da Península Ibérica, podendo-se – confirmando-se essa relação – garantir, no caso dos cascos-de-burro, certas qualidades genéticas de origem, que poderiam ser colocadas a serviço dos criadores para a obtenção de animais de alto valor, assim como a serviço dos engenheiros de alimento para a obtenção de produtos derivados de alta qualidade, uma vez que tanto a raça ibérica espanhola quanto a alentejana portuguesa são reconhecidas pela qualidade de seus produtos.

O número de animal utilizado neste trabalho pode ser considerado excelente pelo fato de se tratar de exemplares que estão praticamente extintos no Brasil. Essa situação se estende à maioria das raças nativas de suíno. Com a modernização da agricultura, muitos dos recursos genéticos animais no Brasil encontram-se em diluição genética, devido à constante introdução de raças exóticas altamente especializadas para a produção animal. Isso se aplica aos bovinos, caprinos, ovinos e outras espécies animais

de interesse econômico. Quando SERENO & SERENO (2000) se referem às aves domésticas e aos suínos, afirmam que praticamente não existem mais raças nativas, e as existentes encontram-se em via de extinção.

Neste estudo, apresentaram-se os haplótipos do mtDNA dos animais cascos-de-burro oriundos de diferentes regiões do Brasil, definidos pela sequência completa do CYT-B e pela primeira porção da região *D-loop*. As mutações encontradas no mtDNA foram todas silenciosas, sem mudança na sequência dos aminoácidos. As mutações são consideradas o mecanismo que permite a ação da seleção natural, já que insere a variação genética sobre a qual a mesma irá agir, fornecendo as novas características vantajosas que sobrevivem e multiplicam-se nas gerações subsequentes ou as características deletérias, que desaparecem nos organismos mais fracos.

A teoria evolutiva moderna, no entanto, encara a diversidade e a adaptação como resultados da produção contínua de variação no patrimônio genético, e os efeitos seletivos do ambiente sobre essas variações. Todas as variações ou modificações de uma característica estrutural em uma espécie, que ocorrem ao acaso e com intervalos de tempo indefinidos (desde dias até milhares de anos), advêm das mutações e recombinações genéticas nos indivíduos que a compõem. Enquanto a mutação é uma alteração na constituição genética em um dos dois gametas (óvulo ou espermatozóide) que formarão um novo embrião, a recombinação é a simples e rotineira mistura aleatória dos alelos dos dois gametas, proporcionada pela reprodução sexuada.

Qualquer variação estrutural pode ser vantajosa, nociva ou inócua para a adaptação do indivíduo ao seu meio ambiente. A seleção natural, que fixa padrões severos e constitui uma “peneira” pela qual só passa uma minoria, irá atuar no sentido de “pôr à prova” tal variação. Se esta se mostrar vantajosa para o indivíduo, terá enormes chances de ser preservada e passada para as gerações futuras. Caso seja nociva, fará com que o indivíduo tenha poucas chances de sobreviver ou impossibilitará que o mesmo reproduza-se. As variações sem importância não são afetadas pela seleção natural e passam para as gerações seguintes de forma oscilante. A seleção natural, sempre oportunista, seleciona qualquer tipo de mecanismo que ajude a

preservar a variabilidade genética, estando pronta, em cada geração, para tomar uma nova direção.

A diversidade biológica ou biodiversidade das espécies que se encontram no mundo atual é o resultado do processo evolutivo das espécies nos últimos milhares ou milhões de anos. Com raras exceções, cada espécie natural que habita o planeta hoje está perfeitamente adaptada e equilibrada para o seu *habitat*, pois passou pelo longo processo de seleção da natureza. Representa, assim, o que há de melhor em termos evolutivos para o seu ambiente até o presente momento, já que o processo seletivo, em função de mudança no meio ambiente, em que o homem é, hoje, o principal agente, é constante e implacável.

A ação do homem é um fato indiscutível no que se refere à dispersão e à miscigenação das raças dos animais domésticos. Assim, por exemplo, foi por meio do homem que a espécie *Sus scrofa* chegou ao continente americano. Há ampla evidência histórica de que muitas raças chinesas foram importadas para a Inglaterra entre 1770 e 1860 e integradas às populações inglesas, influenciando o desenvolvimento das raças *landrace*, *berkshire*, *small white* e *middle white*. Estas, por sua vez, foram importadas para muitos países, inclusive para o Brasil, fato determinante para a existência de haplótipo asiático nas raças nativas brasileiras, conforme mostram os resultados aqui obtidos e os de SOUZA *et al.* (2009). Ressalta-se ainda que os híbridos atualmente usados na suinocultura industrial do Brasil possuem, em sua composição, a raça chinesa meishan. Então esses híbridos, por serem altamente produtivos, costumam ser usados para cruzamentos com os animais de raça nativa pelo pequeno produtor, no intuito de melhorar o desempenho desses últimos.

À medida que a espécie *Sus scrofa* ocupou progressivamente as várias regiões geográficas da terra, ocorreram mutações sucessivas no seu DNA mitocondrial. Mutações ocorridas em animais de determinada região geográfica passam a ser marcadores da origem de matrilinea nessa região específica. Embora cada matrilinea seja caracterizada por um haplótipo diferente, muitas delas apresentam características e distribuições geográficas comuns, podendo, então, ser agregadas em haplogrupos. Dessa maneira, as linhagens de DNA mitocondrial de suíno de todo o mundo dividem-

se em dois grandes conjuntos, os chamados super-haplogrupos: asiático e europeu. Ambos estão espalhados por todo o mundo, inclusive pela América do Sul, embora nesse continente predomine o europeu.

Embora seja extremamente informativo, em matéria de estudos evolutivos, o mtDNA possui suas limitações. Por se portar como único *locus* (haplótipo) e ser um marcador extranuclear com uma dinâmica própria, não é um bom indicador para inferências relativas à diversidade genética total. Além disso, devido à sua herança materna, não se detecta o fluxo alélico mediado pelo macho, que possui fundamental importância na evolução dos animais domésticos e na dinâmica dos rebanhos na atualidade.

Por essa razão, o projeto inicial desta tese tinha também como proposta caracterizar os cascos-de-burro por meio do cromossomo Y. Esse objetivo, no entanto, não foi possível atingir devido ao fato de não se ter conseguido, até então, encontrar polimorfismo (SNP) nas regiões estudadas desse cromossomo, o que inviabilizou este objetivo. Para que se possa situar o fato, o primeiro trabalho sobre o cromossomo Y em suíno foi publicado recentemente (RAMÍREZ *et al.*, 2009) – o mesmo deveria estar sendo realizado ao mesmo tempo que este. Embora publicado em setembro de 2009, não foi possível retomar essa caracterização usando-se a metodologia proposta por esses autores devido ao fato de se ter parado com o Y e iniciado os microssatélites.

Com o objetivo de driblar a limitação do mtDNA e com a impossibilidade de avançar no cromossomo Y, utilizaram-se também, neste estudo, marcadores nucleares do tipo microssatélite. Apesar de constatada grande variabilidade genética, a população casco-de-burro mostrou-se subdividida, possivelmente devido à elevada influência de alelo de outras raças. Há necessidade de se manter a integridade genética desses animais para que as pesquisas afins continuem avançando. Entretanto seu potencial genético diferencial poderá ser utilizado mais efetivamente como alternativa para futuros imprevistos na área do melhoramento animal.

Deve-se a WRIGHT (1922) a discussão sobre os efeitos da subdivisão populacional na seleção artificial. Esse autor concluiu que, em alguns casos, o ganho genético seria maior se a população fosse subdividida em várias pequenas linhagens –

com seleção e cruzamento entre as linhagens – que se a população fosse mantida como uma única linha. A partir daí, a formação de populações estruturadas em linhagens atraiu a atenção de muitos, visando a sua aplicação em seleção artificial, embora essa vantagem tenha sido demonstrada apenas em circunstâncias especiais. Os resultados diferem conforme o modo de ação gênica, e o mesmo autor relatou que suas conclusões eram dependentes de seleção para combinações epistáticas no caso de existir um nível ótimo para a característica selecionada e que nenhuma vantagem traria ao selecionar características em que a variação genética fosse aditiva. Dos estudos realizados na intenção de comparar a seleção artificial direcional em populações com e sem subdivisão (BOWMAN & FALCONER, 1960; MADALENA & ROBERTSON, 1975; RATHIE & NICHOLAS, 1980), nenhum mostrou vantagens no uso de população subdividida. Em trabalhos de simulação, a subdivisão foi superior para seleção dos alelos recessivos favoráveis, mas pouco frequentes (MADALENA & HILL, 1972), e para combinações epistáticas (ENFIELD & ANKLESARIA, 1986).

Por isso o método de subdividir uma raça em linhagem visando a aproveitar posteriormente a heterose resultante dos cruzamentos entre elas foi questionado há décadas no melhoramento animal. Um experimento realizado por KING (1967) serve de exemplo. Nesse trabalho, foram formadas 146 linhagens de suíno *large white* por seleção e acasalamento de irmão completo e meio-irmão. Apenas 18 dessas linhagens sobreviveram para chegar a coeficientes de endogamia de 40%, as restantes desapareceram por problemas de reprodução e mortalidade. Nas porcas cruzadas entre as linhagens sobreviventes, o peso total da leitegada desmamada foi 1% menor que nas porcas não endogâmicas da raça, enquanto porcas produzidas cruzando *large white* não endogâmico com *wessex* desmamaram com o peso da leitegada 15,9% superior.

O fato de os cascos-de-burro terem apresentado significativa distância genética dos animais da Península Ibérica, o que se revelou por meio dos microssatélites, mostra que, de fato, eles não constituem um grupo naturalizado, sendo, então, produto da seleção natural, da deriva genética e da miscigenação. Constituem-se um agrupamento genético nativo do Brasil, mas procedente das raças da Península Ibérica, como foi evidenciado pelas análises do mtDNA, apresentando, também,

composição genética nuclear bem distinta dos seus antepassados. Os resultados do DNA nuclear mostram distância ainda maior dos cascos-de-burro em relação aos suínos *mulefoot* dos Estados Unidos, apresentando, portanto, não só uma distância no âmbito do DNA nuclear como também no do mitocondrial, não se sustentando a hipótese de que seriam derivados de animais provenientes dos Estados Unidos.

Contrastando com o esperado – que os cascos-de-burro formassem um *pool* de linhagens procedentes da Península Ibérica ou dos Estados Unidos –, os dados aqui apresentados por meio do mtDNA demonstram uma participação, embora pequena, de raças asiáticas no genoma dos cascos-de-burro brasileiros.

Vários trabalhos estudaram a estruturação genética de raças suínas nativas de diferentes regiões. Como exemplo, citam-se os trabalhos de MARTINÉZ *et al.* (2000) e GUASTELLA *et al.* (2010), que caracterizaram, também por meio de microssatélites, a raça ibérica, da Espanha, e *nero siciliano*, da Itália, respectivamente. Por meio das estatísticas F de Wright apresentadas nos respectivos trabalhos, é possível observar que essas raças não se encontram estruturadas geneticamente, ou seja, estão subdivididas, mas nem por isso deixaram de ser oficialmente raça, continuam reconhecidas como tal. Isso mostra o quanto o conceito de raça é convencionalizado, estando a decisão de admitir um grupo genético como raça nas mãos dos criadores, que propõem sua admissão, e dos técnicos da administração, encarregados de reconhecê-la ou não. Por isso os cascos-de-burro podem vir a ser considerados uma raça, pois possuem uma característica peculiar, que os diferencia de todos os outros grupos de suíno. Ainda assim, apesar da falta de estruturação, os cascos-de-burro apresentaram-se geneticamente bem diferenciados das outras raças aqui estudadas. O fato de a população estar dividida pode apontar que se têm linhagens regionais de casco-de-burro, devido, principalmente, ao isolamento geográfico.

Essa população outrora podia estar geneticamente estruturada, mas a atual miscigenação com as raças internacionais a que estão submetidos os grupos genéticos nativos possivelmente pode ser a razão para a sua presente desestruturação, igualmente à raça piau, reconhecida como tal, que também deve ter sofrido o mesmo processo, baseado nos resultados de SOLLERO *et al.* (2009). Portanto as raças

internacionais de suíno recém-introduzidas contribuíram para a desestruturação genética dos agrupamentos nativos existentes, e não para as suas respectivas formações, tampouco para a estruturação genética (formação) de novos agrupamentos nativos, como frequentemente se supõe. A variabilidade natural dos animais domésticos determina certa evolução no processo de formação das raças que não apresentam a fixidez que se busca encontrar nelas. A raça está longe de ser estática, pois é um estágio no processo de evolução de uma população animal (DOMINGUES, 1968).

O uso de diferentes técnicas possibilita complementar as informações. Assim, devido ao fato de alguns haplótipos do DNA mitocondrial terem sido comuns aos cascos-de-burro e aos javalis, utilizou-se da citogenética para averiguar se os cascos-de-burro possuíam introgressão alélica dos selvagens. Contudo eles apresentaram ploidia $2n = 38$, o que demonstra que, possivelmente, não se encontram cruzados com os javalis e que, embora com cariótipo distinto, o doméstico e o selvagem compartilham matrilineas.

O cariótipo $2n = 36$ é um critério de pureza genética para javali somente quando se consideram a população e muitas gerações e quando todos os indivíduos cariotipados apresentarem 36 cromossomos ou forem de origem conhecida e controlada. Isso porque um exemplar cruzado ($2n = 37$), quando retrocruzado com javali puro ($2n = 36$) ou com suíno puro ($2n = 38$), pode gerar indivíduos tanto com ploidia $2n = 36$, característica do javali puro, quanto com $2n = 38$, própria do suíno, o que impossibilita afirmar se o indivíduo oriundo desse cruzamento com ploidia $2n = 36$ é cruzado ou puro quando o seu fenótipo se aproximar muito do fenótipo do javali (Apêndice 5) – esta é uma das limitações da citogenética para verificar a procedência dos indivíduos pelo cariótipo.

Na atualidade, assistiu-se a uma grande pressão e à retomada de consciência no âmbito internacional a favor da conservação dos recursos genéticos, com vistas à sua utilização racional. Nesse sentido, um acontecimento que marcou definitivamente foi a Conferência Mundial sobre Meio Ambiente ocorrida no Rio de Janeiro em 1992. Desde então, grandes estudos vêm sendo desenvolvidos em todo o mundo para a conservação dos recursos genéticos animais. A manutenção da diversidade genética é fundamental para o melhoramento genético sustentável, facilitando, assim, a rápida adaptação às

mudanças necessárias ou imprevistas para o desenvolvimento dos sistemas de produção.

Sugere-se a realização de trabalhos que estabeleçam um padrão racial para a população casco-de-burro, uma vez que todo e qualquer suíno que apresente o fenótipo é sempre considerado casco-de-burro, mas não necessariamente estará de acordo com um padrão racial estabelecido. O fato de essa característica ser dominante em relação ao casco fendido pode ser a razão para a ausência de estruturação genética nos cascos-de-burro, uma vez que um animal pertencente, de fato, à “raça” casco-de-burro, ao ser cruzado, por exemplo, com um *duroc*, gerará animais que “serão considerados” cascos-de-burro – unicamente em razão de apresentar o fenótipo (casco fundido) –, mas o indivíduo proveniente desse cruzamento é apenas um casco-de-burro meio-sangue. Então, na coleta de amostra dessa “raça” para estudos genéticos, esse animal é considerado casco-de-burro, quando, na verdade, não deveria ser. Esse problema só será resolvido ao se estabelecer um padrão racial para esse grupo, com o qual só seriam estudados os cascos-de-burro que apresentassem esse padrão fenotípico, estando os demais classificados como SRD.

O conhecimento das relações filogenéticas entre os grupos genéticos estudados trará uma base sólida para a implementação de futuros programas de conservação e de melhoramento desses grupos genéticos, além de ter permitido uma reconstrução da história da colonização do Brasil e da sua relação com a Europa. Os resultados deste trabalho elucidam a origem dos suínos cascos-de-burro. Em síntese, espera-se, com este estudo, contribuir para a conservação das raças autóctones, as únicas adaptadas ao seu meio ambiente, singulares sob o ponto de vista genético, de grande beleza externa e de grande importância para o desenvolvimento socioeconômico do meio rural, marcando presença na sua dimensão histórica e cultural.

Ressalta-se que este trabalho esclareceu a origem genética dos indivíduos que possuem o fenótipo casco-de-burro, mas não a origem propriamente do fenótipo. O que fica claro, com base nos resultados aqui obtidos, é que os animais que, hoje, apresentam aquele fenótipo possuem origem nos mesmos animais trazidos pelos colonizadores, ou seja, têm a mesma procedência genética das outras raças nativas

que não o apresentam. Várias das matrilineas que contribuíram para a formação do grupo casco-de-burro são as mesmas que contribuíram para a constituição de outros grupos genéticos nativos brasileiros. Diversas perguntas – quando, onde, por que e como esse fenótipo surgiu – ficarão, ainda, na dependência de outras pesquisas para se ter as respostas.

O que se pode garantir, no entanto, é que essa característica é recente em suíno, uma vez que, nos locais onde primitivamente existiam porcos (Europa e Ásia), não há vestígios de suíno com o fenótipo casco-de-burro. Ela possivelmente emergiu depois de 1532, período no qual os primeiros porcos chegaram ao Brasil. É possível ainda sugerir que seu surgimento tenha ocorrido um pouco antes, a partir de 1492, quando houve a introdução de suíno na América, uma vez que aquele fenótipo também ocorre em outros países desse continente.

Embora com uma característica bastante distinta dos demais grupos genéticos – característica que o torna um animal exterior, inclusive, à ordem taxonômica a que pertence, seja *Artiodactyla* seja *Cetartiodactyla* –, os cascos-de-burro possuem uma ancestralidade materna ibérica, ou seja, descendem dos porcos que outrora povoaram a América, não se sabendo, exatamente, quando esse fenótipo surgiu, tornando-o um grupo com uma característica peculiar, que permanece ainda um mistério a ser desvendado pela ciência.

Os cascos-de-burro têm um passado, estão no presente e merecem um futuro!

7.1 REFERÊNCIAS

BOWMAN, J. C.; FALCONER, D. S. Inbreeding depression and heterosis of litter size in mice. **Genetical Research**, London, v. 1, p. 262-274, 1960.

CAVALCANTI, S. S. **Produção de suínos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985. 453 p.

DOMINGUES, O. **Introdução à zootecnia**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola do Ministério da Agricultura, 1968. 380 p. (Série Didática, 5).

ENFIELD, F.D.; ANKLESARIA, F. An evaluation of multiple peak epistasis and

population structure in directional selection program. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 3, 1986, Lincoln. **Proceedings...** Lincoln: WCGALP, 1986, v. 12, p. 283-294.

GUASTELLA, A. M. *et al.* Molecular characterization and genetic structure of the Nero Siciliano pig breed. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, n. prelo, 2010.

KING, J. W. B. Pig breeding research. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL PRODUCTION, 9., 1967, Edinburg. **Proceedings...** Edinburg: T & A. Constable Ltd, 1967. p. 9-16

MADALENA, F. E.; HILL, W. G. Population structure in artificial selection programmes: simulation studies. **Genetical Research**, London, v. 20, p. 75-99, 1972.

MADALENA, F. E.; ROBERTSON, A. Population structure in artificial selection: studies with *Drosophila melanogaster*. **Genetical Research**, London, v. 24, p. 113-126, 1975.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento**: raças domésticas da história do Brasil. 2. ed. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2006. 232 p.

MARTINÉZ, A. M. *et al.* Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. **Animal Genetics**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 295-301, 2000.

RAMÍREZ, O. *et al.* Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 26, n. 9, p. 2061-2072, 2009.

RATHIE, K. A.; NICHOLAS, F. W. Artificial selection with differing population structures. **Genetical Research**, London, v. 36, p.117-131, 1980.

REVIDATTI, M. A. S. **Caracterización de cerdo crioulo do Nordeste argentino**. 2009. 241 f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade de Córdoba, Córdoba, 2009.

SERENO, J. R. B.; SERENO, F. T. P. S. Recursos genéticos animales brasileños y sus sistemas tradicionales de explotación. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 49, n. 187, p. 405-414, 2000.

SOLLERO, B. P. *et al.* Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 8-15, 2009.

SOUZA, C. A. *et al.* Iberian origin of Brazilian local pig breeds based on cytochrome b (MT-CYB) sequence. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 759-762, 2009.

WRIGHT, S. The effects of inbreeding and crossbreeding in guinea pigs. III. Crosses between highly inbred families. USDA Bulletin 1121, n. 1090, p. 1-60, 1922.

CONSIDERAÇÕES GRAMATICAIS

O estudo da língua portuguesa pode ser, de modo geral, dividido em morfologia, fonologia e sintaxe (INFANTE, 1997). Em termos gerais, a morfologia e a sintaxe são, respectivamente, o estudo da palavra e da oração. A morfologia é algo comumente estudado entre os gramáticos por lidar com a palavra não necessariamente contextualizada. Já a sintaxe trata da função da palavra na oração; a sintaxe lida com a dinâmica da língua, ou seja, com a parte funcional, aplicável, razão pela qual, nessa parte, existe mais divergência entre os estudiosos. Não resta dúvida de que a maioria das divergências é mera justificativa de aplicação gramatical.

Neste posfácio, objetivam-se apresentar e discutir alguns pontos gramaticais que, embora pouco usuais, foram adotados na escrita deste trabalho pelo fato de a redação de um texto científico requerer uma linguagem clara, em conformidade com a norma-padrão. Assim, serão abordados seis tópicos que geram discórdia quando usados de acordo com o que estabelece essa norma. Tais controvérsias podem partir tanto dos “letrados”, que, na maioria das vezes, não a entendem profundamente e acabam por alterá-las, quanto dos leigos, influenciados por essas alterações sem fundamento gramatical e pelo português escrito nos jornais, nas revistas etc.

1) Conjunção

O uso da vírgula depois das conjunções conclusivas (“portanto”, “logo”, “por isso” etc.), adversativas (“contudo”, “entretanto”, “mas”, “porém” etc.) e antes das conjunções aditivas (“nem”, “mas também”, “como também”, “bem como” etc.) necessita ser discutido, pois, na maioria dos casos, não se fundamenta gramaticalmente.

A principal regra gramatical sobre vírgula é muito clara ao apontar que não se coloca vírgula em uma oração que esteja na ordem direta (PASCHOALIN & SPADOTO, 1996). Isso é unânime. Diz-se que uma oração está na ordem direta quando todos os

elementos que a compõem obedecem à sequência sujeito-verbo-complemento, ou seja, não há termo deslocado dessa ordem na oração.

É, no entanto, muito comum encontrar vírgula depois das conjunções conclusivas e adversativas, mesmo na ordem direta da oração. Como mencionado, considerando-se a sintaxe da língua, esse uso não se fundamenta.

Exemplo:

a) *“Isso nunca aconteceu na UNESP, portanto vamos comemorar na próxima semana”*.

Nesse exemplo, encontra-se um período de duas orações, uma com *itálico* e a outra com **negrito**. As duas estão na ordem direta, por isso, embora separadas por vírgula, nenhuma tem vírgula no seu interior. A vírgula existente no período tem a função de separar as duas orações, visto que a segunda (com **negrito**) é coordenada conclusiva.

Mas as vírgulas podem aparecer a partir do momento em que haja locução ou termo deslocado na oração, tirando-a da ordem direta: *“Na UNESP, isso nunca aconteceu, portanto vamos comemorar na próxima semana”*. Na primeira oração, apareceu uma vírgula devido a um elemento deslocado (*“Na UNESP”*), que tirou a oração da ordem direta.

Com base nesse raciocínio, não é adequado colocar vírgula depois das conjunções quando a oração está na ordem direta.

Exemplos:

a) *“Isso nunca aconteceu na UNESP, portanto vamos comemorar na próxima semana”*;

b) *“Isso nunca aconteceu na UNESP; portanto vamos comemorar na próxima semana”*; e

c) *“Isso nunca aconteceu na UNESP. Portanto vamos comemorar na próxima semana”*.

Pelo fato de a segunda oração (com **negrito**) estar na ordem direta, independentemente de como se separem as orações (com vírgula, ponto e vírgula ou ponto final), a estrutura sintática de cada oração que compõe o período se mantém. Por isso, em nenhum desses exemplos, é adequado colocar vírgula depois de “portanto”.

Já quando se intercalam termos, aí as vírgulas, de fato, são necessárias. Nos exemplos a seguir, o adjunto adverbial (“na próxima semana”) será deslocado e, por isso, duas vírgulas, anteposta e posposta, o isolarão – aparecerá, conseqüentemente, uma vírgula depois do “portanto”:

- a) “*Isso nunca aconteceu na UNESP, portanto, na próxima semana, vamos comemorar*”;
- b) “*Isso nunca aconteceu na UNESP; portanto, na próxima semana, vamos comemorar*”; e
- c) “*Isso nunca aconteceu na UNESP. Portanto, na próxima semana, vamos comemorar*”.

Mais exemplos:

- a) “No entanto a amostra foi representativa neste trabalho” (ordem direta da oração, sem vírgula);
- b) “A amostra foi, no entanto, representativa neste trabalho” (conjunção posposta ao verbo, por isso entre vírgula);
- c) “No entanto, neste trabalho, a amostra foi representativa” (“neste trabalho”, que é adjunto adverbial, está deslocado para o meio da oração, por isso está entre vírgula; a vírgula depois de “no entanto” não tem nada a ver com essa conjunção, mas sim com a expressão deslocada; confira-se, no exemplo seguinte, novamente, a inexistência da vírgula depois de “no entanto”); e
- d) “No entanto a amostra, neste trabalho, foi representativa”.

A regra apresentada serve para qualquer conjunção: “entretanto”, “contudo”, “no entanto”, “todavia”, “porém”, “não obstante”, “pois” etc. A conjunção “mas” e a “logo” seguem o mesmo critério das demais, com exceção de não poderem vir deslocadas na oração:

- a) Mas a amostra foi respresentativa neste trabalho (ordem direta da oração, como indicado, não é possível “Mas, a amostra foi...”);
- b) Mas, neste trabalho, a amostra foi representiva (adjunto adverbial deslocado, por isso isolado por vírgulas).

Não é recomendável “A amostra foi, mas, representativa neste trabalho” nem “A amostra foi, logo, representativa neste trabalho”.

Na maioria das gramáticas normativas, não são observados exemplos de conjunções adversativas nem conclusivas iniciando períodos, seja conectando parágrafos seja ligando orações separadas por ponto final (ex.: “Coletaram-se amostras de apenas oito animais brancos e oito pretos. Contudo a amostra foi representativa neste trabalho”), somente ligando orações separadas por vírgula (ex.: “Coletaram-se amostras de apenas oito animais brancos e oito pretos, contudo a amostra foi representativa neste trabalho”). Talvez, seja essa a razão para as pessoas, de modo geral, não aplicarem a vírgula segundo a norma-culta quando a conjunção está conectando parágrafos ou orações separadas por ponto final.

São muitos os gramáticos que justificam o uso de determinada vírgula com o objetivo de ênfase, sendo esta obtida pela intercalação de elementos (que pede vírgula), e não pelo uso inadequado da vírgula. Vírgulas colocadas na ordem direta da oração não estão sugerindo ênfase, como alguns gramáticos afirmam. No exemplo “a)”, a seguir, o adjunto adverbial (“na próxima semana”) está deslocado, indicando o uso de vírgula e, conseqüentemente, isolando o “portanto” e sugerindo ênfase. No exemplo “b)”, não há ênfase, há uma vírgula inadequada pelo fato de a oração estar na ordem direta.

a) “**Portanto, na próxima semana, vamos comemorar**”; e

b) “Portanto, vamos comemorar na próxima semana”.

Um texto escrito segue critérios sintáticos, e não prosódicos (regidos pela fala, pela entonação). É aí que “reside” o problema, uma vez que é comum tentar transpor para o texto escrito características exclusivas da fala, o que nem sempre é possível. Para se obter ênfase por meio de vírgula, é necessário deslocar termos, trabalhando com a oração na ordem indireta. Saber manejar a língua é mais um atributo dos que conhecem a gramática, a qual norteia a escrita formal.

Outro ponto de divergência entre os gramáticos são as conjunções aditivas. Não resta dúvida de que a principal conjunção aditiva é “e”, mas há outras equivalentes, não precedidas de vírgula (“mas também”, “como também”, “bem como”, “assim como” etc.).

Exemplos:

a) “Ele comeu mas também dormiu” (a conjunção “mas também” é aditiva, por isso não é precedida de vírgula; equivale a: “ele comeu e dormiu”); e

b) “Ele comeu como também dormiu” (também sem vírgula).

As expressões “mas também” e “como também” podem vir acompanhadas de “não só”, formando uma locução conjuntiva: “ele não só estudou mas também passou na prova”.

Alguns sintagmas classicamente utilizados como conjunções podem assumir função de advérbio na oração, como “logo”, “por isso”, “então”.

Ex.:

- a) “Começou a chover. Logo irei me molhar” (“logo” é conjunção conclusiva aqui, equivale a: “Portanto irei me molhar”);
- b) “Estou de carro. Logo, chegarei aí” (uso como advérbio, por isso a vírgula depois do sintagma “logo” – ordem direta: “chegarei aí logo”, “chegarei logo aí”, ou seja, “chegarei aí rapidamente”); e
- c) “Estou de carro. Logo chegarei aí” (aqui, sem a vírgula, é uma conclusão, por isso conjunção: “Portanto chegarei aí”. Está-se concluindo, com base na oração anterior, que o sujeito da oração irá chegar, mas não se está dizendo se irá demorar ou não, ou seja, “logo” aqui é conjunção, não um advérbio que muda o verbo “chegar”).

Isso evidencia o quanto não se deve usar vírgula desnecessariamente. Como se vê, a presença ou ausência dela pode até alterar a função de um sintagma na oração. Por isso não se devem levar em consideração gramáticas normativas que descrevem que o advérbio, mesmo deslocado, dependendo do tamanho, não deve vir isolado por vírgula. Como se viu, a ausência da vírgula depois do advérbio pode fazer com que ele perca a natureza de advérbio, da mesma forma, a vírgula colocada depois de conjunção na ordem direta da oração faz com que a descaracterize como tal sem haver uma justificativa gramatical para o seu emprego.

Os advérbios relacionam-se com algum elemento da oração, enquanto as conjunções ligam orações ou termos de mesma função na oração, mas não modificam nenhum elemento intraoracional. Ex.: “Lula, o então presidente da república, viajou para a Europa” (nesse caso, o sintagma “então” é advérbio).

O mesmo pode ser observado com “por isso”, que, quando equivalente a “devido a isso”, é advérbio, mas, quando conclusivo, é conjunção.

Há também o “bem como”, que é usado geralmente como locução conjuntiva de comparação:

a) “O suíno, bem como o javali, pertence à espécie *Sus scrofa*” (equivale a “da mesma forma”: o suíno, da mesma forma que o javali, pertence...).

Ele também pode, entretanto, aparecer como locução conjuntiva aditiva, ou seja, com função de “e”:

b) “O suíno bem como o javali pertencem à espécie *Sus scrofa*”.

Nesse caso, não se coloca a vírgula antes nem depois da expressão “bem como”. Outro exemplo: “A FAO bem como outras organizações internacionais assumiram o papel de conservar as raças”.

O mesmo deve ser observado no sintagma “assim como”.

2) “Respectivamente”

Da mesma forma que o emprego vicioso das conjunções está banalizado pelo uso de vírgula depois delas, ainda que com a oração na ordem direta, isso também é observado no emprego do adjunto adverbial “respectivamente”.

Como se viu, quando as conjunções ocupam o início da oração, esta assume a ordem direta e dispensa vírgula. O adjunto adverbial, ao contrário das conjunções, posiciona-se, quase sempre, no fim da oração para que esta também assuma a ordem direta.

Exemplos:

a) “Os valores foram 1 e 2 respectivamente” (oração na ordem direta, sem nenhuma vírgula);

b) “Respectivamente, os valores foram 1 e 2” (adjunto adverbial deslocado para o início da oração, por isso isolado por vírgula); e

c) “Os valores foram, respectivamente, 1 e 2” (adjunto adverbial deslocado, posposto ao verbo, por isso entre vírgula).

Ou seja, no exemplo “a)”, a vírgula que muitos colocariam antes de “respectivamente” (“Os valores foram 1 e 2, respectivamente”) não tem fundamento gramatical.

Para que isso fique mais claro, segue mais um exemplo, agora, com “corretamente”, também na função de adjunto adverbial de modo:

- a) “Os animais foram vermifugados corretamente”;
- b) “Corretamente, os animais foram vermifugados”; e
- c) “Os animais foram, corretamente, vermifugados”.

Tomando o exemplo do adjunto “respectivamente” e acrescentando a conjunção “portanto”, seria mais comum encontrar a oração assim:

- a) “Portanto, os valores foram 1 e 2, respectivamente”.

Nem a vírgula posposta ao “portanto” nem a anteposta ao “respectivamente” são indicadas pela sintaxe da língua: está-se fracionando uma única oração em três fragmentos, o que não é adequado, porque a oração está na ordem direta. O indicado é:

- b) “Portanto os valores foram 1 e 2 respectivamente”.

Mas podem-se intercalar termos; vejam-se várias possibilidades, todas adequadas:

- a) “Portanto, respectivamente, os valores foram 1 e 2”;
- b) “Os valores, portanto, foram 1 e 2 respectivamente”;
- c) “Portanto os valores foram, respectivamente, 1 e 2”; e
- d) “Respectivamente, os valores foram 1 e 2, portanto”. (aqui, tanto “respectivamente” quanto “portanto” estão deslocados, por isso ambos estão isolados por vírgulas).

3) Locução adjetiva

Locução adjetiva é o agrupamento de duas ou mais palavras que, ao modificar substantivo ou pronome substantivo, exerce o papel próprio de adjetivo.

- Arsenal de guerra (locução adjetiva);
- Arsenal bélico (adjetivo);
- Veneno de serpente (locução adjetiva);
- Veneno ofídico (adjetivo);
- Amor de mãe (locução adjetiva);
- Amor materno (adjetivo).

Nota-se que o substantivo nas locuções está no singular: é “arsenal de guerra”, e não “arsenal de guerras”, pois as locuções adjetivas são formadas por uma preposição e um substantivo, que, nesse caso, é guerra, e não “guerras”. “Guerras” é a flexão do substantivo “guerra”, que, para estar flexionado, ou seja, no plural, tem que ter algo – um artigo, por exemplo – especificando, como em “arsenal das (de + as) guerras”. Nesse sentido:

a) Criação <u>de suíno</u>	Criação <u>dos suínos</u>
b) Fonte <u>de alelo</u>	Fonte <u>dos alelos</u>
c) Fonte <u>de água</u>	Fonte <u>das águas</u>
d) Fonte <u>de fibra</u>	Fonte <u>das fibras</u>
e) Lista <u>de polimorfismo</u>	Lista <u>dos polimorfismos</u>
f) Lista <u>de convidado</u>	Lista <u>dos convidados</u>
g) Lista <u>de casamento</u>	Lista <u>dos casamentos</u>
h) Genética <u>de população</u>	Genética <u>das populações</u>
i) Tipo <u>de microssatélite</u>	Tipo <u>dos microssatélites</u>

Mesmo que acompanhe um substantivo coletivo, a locução adjetiva continua sem ser flexionada para o plural, a não ser que um artigo exija isso. Ex.:

a) Grupo <u>de mãe</u>	Grupo <u>das mães</u>
b) Grupo <u>de suíno</u>	Grupo <u>dos suínos</u>
c) Grupo <u>de animal</u>	Grupo <u>dos animais</u>
d) Bando <u>de ladrão</u>	Bando <u>dos ladrões</u>
e) Bando <u>de homem</u>	Bando <u>dos homens</u>
f) Ninhada <u>de láparo</u>	Ninhada <u>dos láparos</u>
g) Manada ¹⁰ <u>de boi</u>	Manada <u>dos bois</u>

Também pode existir um artigo exigindo singular: “lista do polimorfismo” (como em “lista do polimorfismo mitocondrial”) e “fonte da água” (como em “fonte da água cristalina”).

¹⁰ Alguns substantivos coletivos, como “grupo” e “bando”, podem referir-se a várias coletividades, como grupo de animal, grupo de homem, mas “manada” é exclusivo para boi, como cardume o é para peixe, sendo desnecessário, então, escrever “manada de boi”. Essa forma foi escrita assim somente para mostrar a relação singular-plural.

Ressalta-se ainda que, mesmo o substantivo que acompanha a locução adjetiva estando no plural, esta continua no singular: tipos de microsatélite, bandos de homem, fontes de fibra, cartões de crédito etc.

Em alguns casos, o plural torna-se apenas desnecessário, sem alterar o que está sendo dito, mas há outros casos em que o plural altera o significado da expressão. Por exemplo, grupo de pesquisadores/grupo de pesquisas. No primeiro caso, o plural é apenas redundante, desnecessário, visto que a ideia de que o grupo é formado por vários pesquisadores quem dá é o substantivo “grupo”, e não o substantivo da locução no plural (pesquisadores). Ou seja, “grupo de pesquisador” oferece a mesma mensagem que “grupo de pesquisadores”. Mas a questão é que, como já se ressaltou, “de pesquisador” é, morfologicamente, locução adjetiva e, sintaticamente, adjunto adnominal, tendo somente a função de adjetivar a palavra “grupo”, informando que esse grupo é de pesquisador ou de pesquisa. Agora, percebe-se que – ao utilizar, no lugar de pesquisador, pesquisa, ficando grupo de pesquisa – não estaria adequado usar “grupo de pesquisas”. Nesse caso, o sentido seria alterado, visto que um “grupo de pesquisa” é formado por pesquisadores, mas um “grupo de pesquisas” leva a pensar que é um grupo de pesquisas realizadas, de projetos realizados, ou seja, “agruparam diversas pesquisas” – por ex.: “grupo de pesquisas realizadas em suíno durante o ano de 2009” e “o grupo de pesquisa em suíno durante o ano de 2009 foi premiado”. Nesse último caso, os pesquisadores desse “grupo de pesquisa” foram premiados. Percebe-se que, colocando-se o artigo no plural (grupo das pesquisas), tira-se a ambiguidade que há em “grupo de pesquisas”. Isso mostra que não é adequado pluralizar o substantivo da locução adjetiva quando não há um artigo a exigir, especificar.

A ambiguidade em grupo de pesquisa/grupo de pesquisas pode, contudo, não existir quando a expressão estiver contextualizada, demonstrando não ser necessário manter o plural. Por exemplo:

- a) O grupo de pesquisa em suíno atingiu sua meta; e
- b) O grupo de pesquisa realizada com suíno contribuiu com o aumento da produção.

Mesmo nas expressões que caracterizam quantidade, volume, como “número de”, “quantidade de”, não é necessário que o substantivo depois da preposição “de” venha no plural. Mas, se houver um especificador exigindo plural, é obrigatório que o

substantivo seja flexionado: “quantidade das (*de* + *as*) águas consumidas / quantidade das sojas produzidas” etc.

Vejamos mais exemplos comparativos:

a) Quantidade de água consumida	Quantidade das águas consumidas
b) Quantidade de soja produzida	Quantidade das sojas produzida
c) Quantidade de feijão colhido	Quantidade dos feijões colhidos
d) Quantidade/número de animal utilizado	Quantidade/número dos animais utilizados
e) Número de observação utilizada	Quantidade/número das observações utilizadas
f) Quantidade/número de leitão nascido	Quantidade/número dos leitões nascidos
g) Quantidade/número de raça autóctone	Quantidade/número das raças autóctones
h) Número de herdabilidade estimada	Número das herdabilidades estimadas
i) Estimativa de herdabilidade	Estimativa das herdabilidades
j) Estimativa de morto em acidente	Estimativa dos mortos em acidente

Deve-se lembrar que o número e a quantidade em, por exemplo, “número de leitão nascido morto” pode ser zero ou um, não necessariamente dois, três, quatro etc. — por isso nem quanto ao significado o plural é necessário.

O que ocorre é que a expressão está relacionada a quantidade, o que leva à tendência, sobretudo na fala, a pluralizá-la. Não é à toa que muitos escrevem “a maioria foram” por levar em conta a semântica, comprometendo a concordância verbal, não sabem eles que a concordância adequada é “a maioria foi/as maiorias foram”.

Mais um exemplo:

- a) “Perfume de mulher”; e
- b) “Perfume de mulheres”.

Qual a diferença de significado entre “a)” e “b)”? Nenhuma. Ou seja, o singular (“mulher”) transmite o mesmo que o plural (“mulheres”). Isso é devido à preposição “de”, que carrega a ideia generalizadora, independentemente de o substantivo que a acompanha estar no singular ou no plural. Por isso o plural torna-se desnecessário, pois seria uma concordância feita pelo sentido da expressão, ou seja, pela semântica.

Continuando:

- c) “Perfume da mulher”; e
- d) “Perfume das mulheres”.

Aqui, nos exemplos “c)” e “d)”, temos um artigo exigindo singular (de + a) e outro exigindo plural (de + as) respectivamente. Nota-se que o artigo especifica tanto que, considerando-se o exemplo “c)”, surge a pergunta: Perfume de que mulher? Perfume da mulher do campo, por exemplo. Acrescentando-se um adjetivo (“africana”), tem-se: e) “Perfume da mulher africana”; e f) “Perfume das mulheres africanas”.

Qual a diferença semântica entre “e)” e “f)”? Nenhuma. Mas ambas as formas estão adequadas. O terceiro elemento (“africana / africanas”) generaliza tanto no plural quanto no singular, a ideia é a mesma. Mas em “a)” e “b)”, embora a semântica seja a mesma, o plural, no exemplo “b)”, não é adequado pelo fato de não haver artigo a exigí-lo.

No texto escrito, o critério semântico influencia bem mais do que se pode supor. Na maioria das vezes, ele apenas confunde os que conhecem pouco a gramática, como ocorre com a construção “a gente fomos...”, que compromete a concordância verbal. Mas as nuances semânticas são tão complexas que poucos se dedicam a estudá-las como parte da gramática. No exemplo “Perfume de mulher / Perfume de mulheres”, há uma nuance nem sempre percebida pelos falantes da língua portuguesa. O emprego do singular ou do plural pode depender do contexto. Pode haver um caso específico em que a forma pluralizada “Perfume de mulheres” seja mais adequada em virtude do que se queira transmitir, como foi visto em “grupo de pesquisas”, ou seja, caso, de fato, pretenda-se referir às pesquisas realizadas, o plural, quando a expressão não está contextualizada, seria mais adequado que o singular. Mas, nas locuções adjetivas, o substantivo no singular está mais bem escrito e divulgando melhor a mensagem que o plural.

4) Preposição “entre”

Preposição é um termo invariável que liga dois elementos da oração, subordinando o segundo ao primeiro. Isso significa que a preposição é o termo que liga substantivo a substantivo, verbo a substantivo, substantivo a verbo, adjetivo a substantivo, advérbio a substantivo etc.

As preposições desacompanhadas de especificador (artigo, pronome) não exigem plural, independentemente do sentido que se queira transmitir ao leitor. Sendo assim, a preposição “entre”, mesmo se referindo a dois elementos, não exige que o substantivo esteja no plural – a ideia de plural é obtida pelo seu valor semântico, afinal, possui a ideia de ser entre dois elementos, sendo desnecessário o substantivo que a acompanha estar no plural. Exemplos:

- | | | |
|----|---------------------------|--|
| a) | Entre parto | A produção de leite entre parto foi... |
| b) | Entre indivíduo | A relação entre indivíduo aparentado é... |
| c) | Entre população | A diversidade média entre população foi... |
| d) | Entre mulher | Isso foi entre mulher... |
| e) | Entre raça | A diversidade entre raça é... |
| f) | Entre gente ¹¹ | Isso foi entre gente ruim... |

É claro que, quando há um artigo especificador exigindo plural, torna-se obrigatória a concordância:

- | | |
|----|---|
| a) | A produção de leite entre <u>os</u> partos 1 e 2 foi... |
| b) | A relação entre <u>os</u> indivíduos aparentados é.... |

5) Emprego de letra maiúscula nas iniciais dos nomes das raças

Nas ciências agrárias, ainda existe uma prática disseminada quanto ao emprego de maiúscula na designação de raça, mas, no âmbito gramatical, tem prevalecido que os nomes dos povos e das raças se escrevem com minúsculas: gregos, paulistas, judeus, árabes, brancos, negros, mulatos etc. BECHARA (1988) corrobora esse entendimento (p. 67, item 49, subitem 2º, 2ª observação).

No âmbito animal, em particular, têm-se visto as raças caninas e felinas – as mais populares – grafadas com minúsculas: *cocker*, *yorkshire*, *boxer*, angorá, persa etc. Nomes, como “andaluz” (raça de cavalo da região da Andaluzia) e “aberdin” (adaptação brasileira para o nome do bovino *aberdeen*), constam nos dicionários **Houaiss** e **Aulete** nas versões eletrônicas, e estão ali grafados com letra minúscula.

¹¹ O substantivo gente é singular. Note-se que o mesmo pode vir acompanhado da preposição “entre”, passando a ideia de plural (várias pessoas envolvidas). Isso reforça que o substantivo não tem que vir no plural quando acompanhado da preposição entre. “Entre pessoa” também está correto.

Ressalta-se ainda o Documento nº 2 das Bases Analíticas do Acordo Ortográfico de 1945, que já afirmava, nessa época, que os nomes de raça, povo ou população, qualquer que seja a sua modalidade, os nomes pertencentes ao calendário, com exceção das designações dos dias da semana, deviam ser escritos sempre com minúscula.

A tendência da língua e de sua evolução é passar para inicial minúscula muitas palavras que antes eram grafadas obrigatoriamente em maiúscula, como se deu no último Acordo Ortográfico, que passou a vigorar em 2009, tornando facultativo o uso de minúscula para área de saber e nome de referência (título de obra), mas obrigatória a minúscula em pontos cardeais, dias de semana, mês etc. Antigamente, as pessoas nelas punham maiúscula, mas há tempos que se usam essas palavras em minúscula, só agora, com a última reforma, oficializou-se essa mudança. Mas, no caso de raça, como se viu, o critério já era letra minúscula desde a reforma de 1945, sendo a maiúscula uma prática ainda usada frequentemente nas ciências agrárias.

Pelas razões expostas, optou-se por deixar as iniciais dos nomes das raças em minúscula, colocando-se também em itálico aquelas que se encontram no idioma estrangeiro. Entre as raças de porco, em particular, é comum a nomeação fazer referência ao local de origem. Daí a preferência geral por não transformar o topônimo (nome próprio, designação geográfica de um lugar), que tem a inicial maiúscula, em substantivo comum, que tem a inicial minúscula, o que seria correto se o topônimo fosse usado como tal: “cão de *Yorkshire*”. Mas a transformação do topônimo em designação de raça, portanto em substantivo comum, indica o emprego de minúscula inicial. A raça de cães *yorkshire*, apesar de fazer referência à região, já vem sendo escrita como substantivo comum, com inicial minúscula. Da mesma forma, a raça de cavalo “campolina” é grafada com letra minúscula no **Houaiss**, mesmo tendo sua origem no nome próprio de Cássio Campolina, o primeiro criador da raça.

6) “Abrasileiramentos”

É possível uma instituição aportuguesar uma palavra? Pergunto-me isso desde quando cheguei aqui em Jaboticabal e deparei-me com um envelope da universidade

que trazia a palavra *campus* grafada assim: câmpus. Eu nunca havia visto tal grafia. Depois, percebi que tal fato também ocorria nos demais *campi* da UNESP.

A língua portuguesa não é exclusiva do Brasil. Portugal, por exemplo, desconhece essa palavra acentuada. Uma vez, recebi do meu orientador um envelope da UNESP, enviado para mim quando lá estava. Vocês precisavam ver a expressão de um professor português quando viu a palavra “câmpus” estampada no envelope da universidade.

– Ele perguntou-me: E esse acento, Aderbal?

– Preferi disfarçar, claro: modernamente, professor, no Brasil, há uma tendência a acentuar essa palavra, aportuguesando-a.

– Nossa, nunca vi isso. Também em Cabo Verde, pelo menos, não a usam assim. Isso está no novo Acordo Ortográfico, Aderbal?

– Não, professor, não está.

– Claro que não está, Aderbal, essa palavra é latina, não é nossa.

Eu dou razão ao espanto do professor de Portugal. Na Espanha, por exemplo, também se usa essa palavra, entretanto na forma latina, *campus* – com itálico, pois não é palavra nacional.

Pergunto-me se o Brasil pode mesmo aportuguesá-la, pois como ficam Portugal, Cabo Verde, Angola etc., uma vez que esses países desconhecem tal grafia? Eles também usam a língua portuguesa, também fazem parte da comunidade falante, não pode o Brasil impor um aportuguesamento que, na verdade, é um abasileiramento, visto que só pequena parte do Brasil considera a palavra com acento. E o Acordo Ortográfico, especialmente no contexto da uniformização, que visa a desfazer duplicidades ortográficas, como fica? A maior parte do Brasil desconhece a palavra acentuada, espanta-se ao vê-la assim grafada e não adota isso como padrão.

Até hoje – usada de forma institucional, como se, de fato, fosse oficial –, eu só a vi em envelopes da UNESP. Isso não é oficial. Não segue o padrão culto, como se espera do ambiente acadêmico. Não é padrão. Não está em nenhum bom dicionário do idioma português. Isso, na verdade, é “unespês”.

O mais inaceitável é você comprar a capa da tese, em que já vem o nome da instituição escrito, e ver lá “câmpus”, sem deixar o autor optar pela grafia, como se isso fosse uma escrita muito comum, encontrada em qualquer bom dicionário da língua.

Na verdade, ninguém, nem mesmo uma instituição universitária, consegue impor algo à língua, pois um signo, para fazer parte da língua, depende da adesão popular, ou seja, para que as coisas se oficializem no campo da língua, é preciso que seja algo de uso disseminado, significado compartilhado, sendo, no mínimo, indícios disso a utilização generalizada e a sua inclusão em respeitáveis dicionários.

A língua portuguesa é o idioma oficial de todos aqueles países que citei, mas, de fato, evolui de maneira diferente em cada um, é difícil, sim, saber como essa palavra vai continuar historicamente (prever), todavia oficializar antecipadamente sua ortografia no meio acadêmico não segue a lógica espontânea da língua. A tendência é que tudo seja aportuguesado, mas quando? Antecipar parece-me loucura e, no caso da capa, falta de consideração com os que não adotam o mesmo critério, que, em vista do que registram os bons dicionários, são a grande maioria.

Alguns até podem achar que a minha compreensão da língua portuguesa é conservadora, mas há de se convir que nada melhor que o tempo para demonstrar sua evolução, inferir quais termos serão aportuguesados e, conseqüentemente, incluídos no português padrão. Por isso tentar adivinhar o que evoluirá a ponto de ser considerado padrão antes do devido tempo é precipitado, afinal, como saber o que vai, de fato, ser mudado e o que não vai antes de isso ocorrer? São suposições que deveriam respeitar o tempo, sendo, portanto, inadequado utilizar, em textos técnico-científicos, palavras que não foram oficialmente aportuguesadas.

Na escrita formal, um termo não dicionarizado só pode ser usado com itálico. Portanto, nesta tese, mesmo estando impressa a forma “câmpus” na capa e assim aparecer em toda a norma de elaboração da tese, optou-se pela escrita latina, uma vez que a forma acentuada não é de conhecimento geral nem considerada padrão. Em português, esse vocábulo foi traduzido por “centro”. Por exemplo, “Centro Universitário de Jaboticabal” ou “*Campus* de Jaboticabal”. Não é necessário, então, utilizar “câmpus”, visto que já temos uma palavra que pode ser utilizada com o mesmo significado.

Idêntico raciocínio para *et al.* (abreviatura de *et alii*), usada em itálico neste trabalho por ser latina. Essa abreviatura sempre foi motivo de controvérsia entre revisor, entre unidade de ensino superior bem como entre os revisores e as unidades de ensino superior. Recentemente, vários manuais que estabelecem normas para trabalhos científicos, como a ABNT, indicam seu uso sem itálico. Nos dicionários, entretanto, vem grafado sempre com itálico, destacando sua origem latina. Há em português “e col.” (abreviatura de “e colaboradores”), que transmite o mesmo significado, por isso não achamos adequado retirar o itálico de *et al.*, como se esta fosse a abreviatura da língua portuguesa usada para tal fim.

Também se optou por *locus/loci* em vez de *loco/locos*, por entender que, embora bastante usada no Brasil e encontrada em alguns dicionários, essa última forma não existe nos demais países de língua portuguesa, sendo, portanto, um gênero abasileirado. Muitas edições recentes de dicionários conceituados não a contemplam por não reconhecerem a sua existência. Há dicionários, no entanto, que trazem a forma “l^ocus” como o gênero português. Percebe-se que esta foi vencida pelo uso demasiado da forma *loco/locos*. Isso é mais uma das razões para respeitar o tempo e não utilizar a palavra “câmpus” antecipadamente como se fosse oficial, pois não se sabe se a mesma será, de fato, a forma utilizada futuramente por todo falante da língua.

Lendo as normas da ABNT de 2006, curiosamente, encontrei algumas palavras “aportuguesadas”, que servem para continuar refletindo sobre o caso “câmpus”, que são *leiaute*, *copirraite*, *copidesque*. Esses aportuguesamentos podem ser considerados verdadeiras aberrações na língua portuguesa pelo fato de, por exemplo, *copyright* ser, em português, “direito autoral”. Já *layout* tem uma abrangência maior, que acaba por ter várias palavras que traduziriam o seu significado na língua portuguesa dependendo do contexto: disposição, apresentação, montagem, impressão, projeto, arte-final, diagramação, projeto gráfico. Não vejo, portanto, motivo para aportuguesar a grafia de palavras estrangeiras que já possuem tradução incorporada na nossa língua.

Eu, entretanto, aprecio aportuguesamento, desde que seja de palavra que ainda não exista na língua, que já tenha caído no entendimento de todos, que seja mera consequência do uso corrente ao longo do tempo. Não é à toa que a língua portuguesa

vem do latim, então a palavra “câmpus”, se aportuguesada, será apenas mais uma derivada dessa língua.

Considerações finais

A noção de adequação/inadequação gramatical é mais ampla que a de norma – um enunciado pode ser gramaticalmente incorreto (do ponto de vista da gramática normativa de padrão culto), mas ser adequado do ponto de vista do discurso, e vice-versa. No entanto é aconselhável sempre basear o discurso científico no que é estabelecido pela gramática, uma vez que, como visto, um texto que segue os critérios gramaticais, sintáticos, dificilmente estará sujeito à ambiguidade, de todo indesejada em textos que tratam de ciência. Mas é possível escrever um texto em padrão culto conferindo-lhe propositalmente múltiplos sentidos, como se faz sempre em linguagem poética, vide “o mundo rodando nas patas do meu cavalo”, o que não quer dizer que não está no padrão culto.

O texto poético ou literário tem mesmo como característica essencial a multiplicidade de sentido, que dá justamente o efeito poético. Todavia a linguagem científica pretende, adotando um padrão culto, eliminar as ambiguidades, embora, quer queira quer não, utilize metáforas: “o **bombeamento** do sangue”, “a **falência** dos órgãos (que conta não pagaram para falir?)”, “tumor **benigno** (eu é que não quero esse bem!)” etc. De fato, a ciência usa metáforas, que são consideradas catacreses, ou seja, não possuem valor poético, mas o discurso científico tende – ao máximo – ao grau zero da alusão metafórica, enquanto o discurso não científico é tão alusivo quanto mais se afasta da ciência e mais se aproxima da literatura. Assim, o que foge dos padrões cultos assentados não está conforme os padrões científicos, o que é o mesmo que dizer que fica aberta a porta para a escrita alusiva, ambígua, de todo inadequada ao tratamento de temas científicos no ambiente universitário.

Nem sempre é possível separar totalmente esses níveis (gramática/discurso) num texto, devendo-se priorizar sempre a noção de clareza – considerando-se, por exemplo, que o texto científico não conta com uma gramática própria, e sim com a gramática da língua, que se presta a uma grande diversidade discursiva, terreno no qual a adequação/inadequação baseia-se em outros fatores além da norma gramatical.

Há uma tendência dos que não conhecem o português-culto, o gramatical, de, quando se deparam com as suas regras, afirmarem que se trata de normas que, atualmente, não são mais usadas, ou seja, que são arcaicas. Nesse sentido, o que não falta são gramáticos que assim justificam a sua falta de domínio da norma culta. É bom esclarecer que o que é errado não pode ser confundido com moderno. Por exemplo, séculos atrás, no Brasil, existia o português-culto, trazido originalmente de Portugal. Mas o falar das ruas preferia naturalmente o português não padrão, o não culto, pois é menos regrado, mais fácil e acessível por ser encontrável em toda esquina. Naquela época, no entanto, a impressão desses falantes do português popular – que passaram a misturar, a partir da chegada dos colonizadores, o espanhol, o português e as línguas indígenas – já era de que a variante culta parecia-lhes arcaica. Ou seja, a tendência é sempre achar anacrônica essa língua original, porque o acesso a ela é menos frequente, mais formal e, conseqüentemente, mais difícil. Eu me pergunto: qual a linha tênue que delimita o que é arcaico e o que é moderno?

O discurso científico deve ser redigido numa linguagem que obedeça à norma culta, do ponto de vista morfológico e sintático, respeitando os padrões de regência nominal e verbal, de concordância, de ortografia, de pontuação etc. Ele deve afastar-se de regionalismos, usos coloquiais ou informais. Tal exigência não é uma questão de purismo linguístico, tampouco de pedantismo acadêmico — sua finalidade é facilitar a leitura do texto e evitar ruídos na comunicação.

REFERÊNCIAS

BECHARA, E. **Moderna gramática portuguesa**. 32^a. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1988.

INFANTE, U. **Curso de gramática aplicada aos textos**. 5 ed. São Paulo: Scipione, 1997.

PASCHOALIN, M. A.; SPADOTO. **Gramática: teoria e exercícios**. São Paulo: FTD, 1996.

APÊNDICE 1



Apêndice 1. Casco-de-burro encontrado na região Sudeste, em que se pode notar a penetrância incompleta da característica sindactilia. As patas traseiras são fundidas, enquanto as dianteiras, fendidas

APÊNDICE 2



Apêndice 2. Casco-de-burro encontrado na região Sudeste do Brasil em Minas Gerais

APÊNDICE 3



Apêndice 3. Leitão casco-de-burro encontrado na região Nordeste do Brasil

APÊNDICE 4



Apêndice 4. Casco-de-burro encontrado na região Centro-Oeste do Brasil

APÊNDICE 5



Apêndice 5. Ninhada de javali puro *versus* ninhada de javali cruzada com o porco doméstico. Na ninhada cruzada, nota-se que três dos cinco filhotes apresentam fenótipo muito próximo aos da ninhada pura. Ao serem cariotipados, se apresentarem 36 cromossomos, podem ser negociados como puros quando na verdade não o são

APÊNDICE 6



Apêndice 6. Fêmeas de javali criadas como puras, quando cariotipadas, apresentaram 37 cromossomos. Embora com o fenótipo muito próximo ao do javali puro, na Figura A, encontra-se uma fêmea com o traseiro abaixado, hábito do descanso, típico do porco doméstico, além das orelhas grandes. Na Figura B, nota-se o rabo enrolado, também típico do doméstico

APÊNDICE 7



Apêndice 7. Javali no seu *habitat* natural em Portugal

ANEXO

Curiosidade

Para conservar as carnes por mais tempo, numa época em que não havia geladeira, o homem, desde a mais remota antiguidade, aprendeu que era preciso tirar dela todo o líquido.

Perexutos (Presunto em português e *Jamon* em espanhol), em latim, quer dizer exatamente isso, ou seja, privado de todo líquido. Curioso é que esse processo utilitário tem a vantagem adicional de deixar as carnes, sobretudo a de porco, muito mais saborosas.

Sem contar o fato de que, apesar de cruas, não estragam, pois são "curadas" em um processo que inibe o crescimento de bactéria. A fabricação dos presuntos se faz por etapas – salga, defumação, secagem, condimentação, maturação. Há tantos presuntos quantas sejam as combinações entre esses cinco procedimentos.

Mas, entre esses tantos, nenhum se iguala ao presunto cru espanhol "pata negra". Nem na fama nem no gosto. O segredo da qualidade está na maneira de preparar, claro; mas, sobretudo, na raça do animal – a ibérica, um porco meio selvagem, gordo, com pêlo negro, pernas longas, canelas finas e famosas unhas escuras (nem sempre). Daí o nome como é conhecido – pata negra. Esses presuntos nada têm a ver com os usualmente encontrados em nossos supermercados, de preço mais em conta e sabor mais comum – por usarem, entre outros ingredientes, sobras de carne de porco prensada.

A qualidade da carne é determinada pelo tipo de alimentação dos porcos. As melhores são as de animais alimentados apenas das bolotas – frutos do azinheiro e do sobreiro (árvore da cortiça). Cada animal chega a consumir até 12 quilos delas por dia. "Jamon Ibérico de Bellota" ou, simplesmente, "pata negra".

Depois, menos valorizadas, vêm as de animais que, na alimentação, recebem, além das bolotas, cereais. Por fim, considerados de menor qualidade, os porcos que

são engordados apenas com cereais. Em todos os casos, são abatidos em local próprio (chacineria) quando atingem por volta dos 180 quilos, entre 14 e 18 meses. Depois de mortos, os animais seguem um ritual que se reproduz há séculos. Primeiro, são lavados em água morna, tosados e resfriados por 24 horas. Em seguida, são cortados em partes – reservando-se as pernas traseiras para fazer o presunto. Do restante da carne do porco ibérico, fazem-se *chorizo* – de todo tipo: finos ou grossos, secos ou defumados, temperados com ervas e colorau – e *lomo embuchado* – lombo do porco curado, sem gordura e bem temperado. O pernil é pendurado, até que todo o sangue escorra. Em seguida, cobre-se com camada grossa de sal, permanecendo assim por 14 dias. Depois, são lavados e armazenados por 6 semanas, em local fresco (entre 6° e 8°C), que mais parece adega.

Inicia-se, então, o processo da cura. Para tanto, pendura-se o pernil, com cordas ou ganchos, em secadouros, sendo a temperatura ambiente regulada com dispositivo especial. Essa carne “transpira”, chegando a perder até um terço de seu peso inicial. Depois, as peças vão para local com temperatura ainda menor, onde ficam dependuradas por mais 14 meses. Esse tempo é necessário para que o fungo *Penicillium roquefortis*, o mesmo do queijo *roquefort*, possa cobrir a carne, produzindo sabor e aroma característicos do presunto. Nesse ponto, um “calador” faz a prova, espetando o “punze” (objeto pontiagudo, feito de osso ou chifre) em várias partes do pernil, retirando pedacinhos de carne. Se tiver as qualidades exigidas, fica ainda mais algum tempo curando. Quando não, é logo posto de lado. Todo o processo de preparação e cura dura, em média, 30 meses.

Depois de pronta, a peça terá entre 6 e 8 quilos, com gordura marmorizada ao longo de toda a carne. Nasce, então, o presunto, uma das mais saborosas carnes do mundo. Especialmente quando for pata-negra. Mas, como a perfeição não existe, há só um defeito nesse presunto. É grande. O preço.

E não se admire se um dia encontrar em um supermercado um presunto ainda mais caro e saboroso, chamado de *presunto casco-de-burro*.