

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE JAVALIS POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Paula Vianna Corrêa da Silva

Orientador: Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a Obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
novembro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULA VIANNA CORRÊA DA SILVA - Brasileira, nascida na Alemanha no dia 6 de maio de 1980, filha de Paulo Fernando Andrade Corrêa da Silva e Iara Lucia Vianna Corrêa da Silva, iniciou o curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, MG em 2001. De 2003 a 2005 realizou estágio como bolsista de iniciação científica CNPq no Laboratório de Biotecnologia Animal do departamento de Zootecnia de Universidade Federal de Viçosa. Em Julho de 2005 concluiu o curso de graduação e no mesmo ano iniciou o curso de pós-graduação, em nível de mestrado, na Universidade Estadual Paulista, Campos de Jaboticabal, na área de Genética e Melhoramento Animal.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista (Unesp – Jaboticabal);

À Embrapa Pecuária Sudeste, pelo suporte técnico-científico;

À Capes, pela concessão de um ano e meio de bolsa de estudos;

Ao meu orientador professor Doutor Jeffrey Frederico Lui, pelos valiosos conhecimentos transmitidos, oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pela boa vontade e orientação;

À Doutora Luciana Correia de Almeida Regitano pela permissão do uso dos Seqüenciadores Automáticos além de outros equipamentos e materiais da Embrapa Pecuária Sudeste e pela colaboração e auxílio na condução do experimento;

À todos os colegas da Embrapa, especialmente João José que tanto me ajudou me auxiliando com boa vontade em todos os momentos que precisei;

À professora Doutora Selma de Fatima Grossi pelas sugestões e ao professor Doutor Humberto Tonhati pela concessão dos *primers*;

Aos colegas de Jaboticabal, Davi, Aderbal e todos os outros pela amizade e apoio;

À Aline, Guilherme e todos os novos amigos conquistados em São Carlos pelos momentos de alegria e descontração;

Ao Mauricio pelo apoio, amizade e sugestões durante o trabalho em São Carlos;

Aos grandes amigos de Viçosa, Marcos, Lagartixa, Fabiana, Pat, Lívia, Priscila, Tércia e muitos outros, não menos importantes, que me receberam com tanto carinho todas as vezes que precisei ir a Viçosa;

À Professora Doutora Simone Eliza Facioni Guimarães e à Bruna pela ajuda nas análises estatísticas;

Às pessoas que moraram comigo em algum momento durante esses dois anos e dividiram comigo as angústias e muitas alegrias: Marcia, Micuim, Karol e especialmente à Josi Maria pela sincera amizade de tanto tempo e todas as ajudas dispensadas, que contribuíram em grande parte para a realização deste trabalho;

Às minhas irmãs Flávia e Marcela pelo apoio, amizade e força que tanto me incentivaram, e à Junia pelas palavras certas na hora exata;

Ao meu cunhado João Renato que se tornou um verdadeiro irmão apoiando e ajudando nas horas mais difíceis;

À minha mãe, pela paciente e sábia “presença”, zelo, carinho, amparo e amizade, inigualáveis;

Ao meu pai pelo incentivo, conselhos, preocupações e exemplos de perseverança;

A todos os meus queridos tios (as), primos (as) e à minha Vovó Neuza que torceram por mim;

E, às pessoas que não foram mencionadas, mas que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional.

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	IV
ABSTRAT	V
1. INTRODUÇÃO	1
2. OJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. O JAVALI.....	4
3.2. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS.....	5
3.2.1. CONSERVAÇÃO DO JAVALI PURO DE ORIGEM.....	7
3.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA.....	9
3.3.1. MARCADORES MOLECULARES.....	10
3.3.2. A TÉCNICA DE PCR.....	12
3.3.3. MICROSSATÉLITE.....	14
3.3.3.1. MICROSSATÉLITES EM ESTUDOS COM ANIMAIS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. ORIGEM DOS ANIMAIS UTILIZADOS.....	18
4.2. COLETA DE MATERIAL.....	19
4.3. MÉTODOS.....	19
4.3.1. EXTRAÇÃO DO DNA.....	19
4.3.2. QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	20
4.3.3. MARCADORES UTILIZADOS.....	21
4.3.4. AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	22
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICAS.....	24
4.4.1. VARIABILIDADE INTRA-POPULACIONAL.....	24
4.4.2. VARIABILIDADE INTER-POPULACIONAL.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1. VARIABILIDADE INTRA-POPULACIONAL.....	26
5.2. VARIABILIDADE INTER-POPULACIONAL.....	34
6. CONCLUSÃO	37
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
8. REFERÊNCIAS	39

ÍNDICE DE TABELAS

Tabelas	Página
1. Lista de pares de iniciadores (<i>primers</i>) e temperaturas de anelamento utilizadas para <i>Sus scrofa domestica</i> e para <i>Sus scrofa scrofa</i>	22
2. Freqüências alélicas do microssatélite IGF1 obtidas em amostras de suínos, javalis puros e seus híbridos.....	27
3. Freqüências alélicas do microssatélite ACTG obtidas em amostras de suínos, javalis puros e seus híbridos.....	28
4. Freqüências alélicas do microssatélite TNFB obtidas em amostras de suínos, javalis puros e seus híbridos.....	30
5. Diversidade genética intra-populacional para os cinco grupos genéticos obtido a partir dos 3 locos de microssatélites.....	33
6. Matriz de valores correspondentes ao índice F_{ST} obtidos entre os possíveis pares de cinco grupos genéticos analisados (todos marcadores).....	34
7. Matriz de distância D_A com os respectivos valores para os possíveis pares de cinco grupos genéticos analisados.....	35
8. Matriz de distância D_A com os respectivos valores para os possíveis pares de três grupos genéticos analisados.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1 Fragmentos de DNA genômico quantificados em gel de Agarose 1%.....	20
2. Amplificação do loco ACTG2 em gel de poliacrilamida 10%.....	23
3. Dendrograma UPGMA baseado na distância D_A com os respectivos valores de <i>bootstrapping</i> em cada grupamento.....	36

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE JAVALIS POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

RESUMO - A ocorrência de híbridos entre javalis e suínos, tanto na natureza como em cativeiro, é bastante comum. Assim, tem-se detectado polimorfismo em javalis, variando o número de cromossomos de 36 a 38. Nesse sentido, objetivou-se, com este trabalho, caracterizar geneticamente javalis (*Sus scrofa scrofa*) puros e híbridos criados no Brasil, por meio de loci de microssatélites (STRs) do suíno doméstico (*Sus scrofa domestica*). Para efeito de classificação, os animais foram agrupados, segundo análise de pedigree e número diplóide ($2n$), em 5 grupos genéticos: **grupo I**, constituído de 59 suínos domésticos; **grupo II**, formado por 46 javalis puros de origem; **grupo III**, constituído de 3 híbridos, com $2n=36$, provenientes de acasalamentos entre híbridos e retrocruzamentos; **grupo IV**, representando 30 híbridos com suíno doméstico de ploidia igual a 37 cromossomos; e **grupo V**, constituídos de 10 híbridos também com o doméstico, porém com $2n=38$, conhecidos popularmente como Javaporcos, devido à similaridade cariotípica e fenotípica com o suíno doméstico. O DNA genômico foi extraído e, posteriormente, amplificou-se, pela técnica de PCR, os fragmentos desses microssatélites - IGF1, ACTG2, TNFB -, os quais foram desenvolvidos para a subespécie *Sus scrofa domestica*. As condições de amplificação foram padronizadas para as amostras de javali realizadas em um termociclador, com as temperaturas de anelamento variando para cada primer. Ao final das amplificações, os produtos dos microssatélites foram colocados em um seqüenciador capilar modelo ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que os microssatélites IGF1, ACTG2 e TNFB, usados em suínos, são eficiente na amplificação heteróloga e podem ser aplicados em javali. Os javalis puros se diferenciam geneticamente dos suínos e dos híbridos. Por meio dos marcadores utilizados foi possível a identificação de alelos específicos de javali e de suínos e evidenciar a diversidade genética entre as populações estudadas.

Palavras chave: alelos, amplificação heteróloga, conservação, diferenciação genética, diversidade genética, Javaporco.

GENETIC CHARACTERIZATION OF WILD BOAR (*SUS SCROFA* SP.) THROUGH THE MICROSATELLITES LOCI

ABSTRACT - The occurrence of crossbred animals between wild boar and pigs, both in nature and in captivity, is quite common. Thus, polymorphism has been detected among wild boar, varying chromosomes from 36 to 38. Considering this, the objective of the present work was to perform a genetic characterization of wild boar and crossbred boars raised in Brazil, through the microsatellites loci (STRs) of the domestic pig (*Sus scrofa domestica*). For classification purposes, the animals were grouped according to pedigree analysis and diploid number (2n) into 5 genetic groups: **group I**, composed of 59 domestic pigs with $2n = 38$; **group II**, composed of 46 wild boar with $2n = 36$ imported from France in 1997; **group III**, composed of 3 crossbred animals with $2n = 36$ from the crossing between crossbred and backcrossing animals; **group IV**, composed of 30 crossbred animals with domestic pig with ploidy equal to 37 chromosomes and **group V**, composed of 10 crossbred animals also with domestic pig, but with $2n = 38$, popularly known as “Boarpigs” due to their karyotypic and phenotypic similarity with the domestic pig. The genomic DNA was extracted and, after that, the fragments of these microsatellites - IGF1, ACTG2, TNFB - were amplified through the PCR technique, which were developed for the *Sus scrofa domestica* species. The amplification conditions were standardized for wild boar samples and performed in a thermocycler with the annealing temperatures varying for each primer. At the end of amplifications, the products of microsatellites were placed in a genetic analyzer model ABI 3100 Avant (Applied Biosystems). Considering the results of this research, the microsatellites IGF1, ACTG2 and TNFB used for pigs, were considered to be efficient on the heterologous amplifications and can also be applied on wild boar. The wild boar differs genetically from pigs and crossbreds. Through the markers utilized, the identification of specific wild boar and pig alleles also as the genetic diversity characterization, was made possible.

Keywords: alleles, Boarpigs, conservation, genetic differentiation, genetic diversity, heterologous amplification.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, no Brasil, tem-se notado um incremento na criação de animais silvestres, com a organização de criatórios específicos, com finalidades que vão do manejo e reprodução a exploração econômica. Assim, capivara, porco-do-mato (cateto e queixada), entre outros mamíferos autóctones da América do Sul, associados aos javalis, uma espécie exótica originária da Europa, estão sendo criados. Originário do Norte da África e sudoeste da Ásia, o Javali é um mamífero que pertence à ordem *Artiodactyla*, da família *Suidae*, que é representada por cinco gêneros, entre eles, o *Sus* e o *Babirusa* (BOSMA et al., 1996). De acordo com NOWAK (1999), o gênero *Sus* compreende cinco espécies vivas, entre elas, a *Sus scrofa* L. Acredita-se que existam, no mínimo, 16 subespécies (GIUFFRÀ et al., 2000), como, por exemplo, o javali europeu (*S. s. scrofa*), o suíno doméstico (*S. s. domestica*), o javali da Malásia e o da Indonésia. A sua área de distribuição estende-se por quase toda a Europa - exceção das zonas mais ao Norte – Islândia, Noruega, Finlândia e das Ilhas Britânicas - onde se extinguiu por volta do século XIV- pela Ásia e pelo Norte da África.

O Javali foi introduzido na América do Sul, inicialmente com a finalidade da caça, especificamente na Argentina no início do século (1904-1906). Depois se iniciou um processo de importação da Europa para o Uruguai e, finalmente, para o Brasil. Seus rebanhos iniciais foram importados diretamente da Europa ou, como no Rio Grande do Sul, indiretamente do Uruguai no início da década de 1990. Atualmente estes animais são criados em condições especiais e controlados pelo IBAMA, pela portaria 102/98 (SBALQUEIRO et al., 2006).

Com a necessidade de aumentar a produtividade nas javalinoculturas, vêm sendo praticado, há vários anos, cruzamentos do Javali com o suíno doméstico. Assim, na tentativa de melhorar os Javalis, alguns criadores têm-se baseado apenas nesses cruzamentos, que originam animais com novo genótipo, constituído pela fusão dos genótipos do doméstico com o selvagem, resultando em animais cruzados e não melhorados. Nesse sentido, SEABRIGHT (1972) enfatiza que a ocorrência de híbridos

entre javalis e suínos, tanto na natureza, como em cativeiro, é bastante comum, pois, o cruzamento entre essas subespécies gera indivíduos férteis.

Muitos desses animais cruzados foram soltos na natureza em seu habitat de origem, o que contribuiu para gerar animais selvagens com características diferentes tanto no aspecto físico como genético. A pureza genética tornou-se, pois, uma das condições exigidas pelos criatórios de Javali que visem critérios de qualidade.

Considera-se o cariótipo padrão para o javali europeu (*Sus scrofa scrofa*) como sendo $2n = 36$ cromossomos (DARRÉ et al., 1992). Em nosso país, assim como em outros também, ocorrem animais híbridos com $2n = 37$ e 38 cromossomos, resultantes do cruzamento do javali com o suíno doméstico e seus acasalamentos. MIRANDA et. al. (2003) verificaram, no Brasil, por meio da caracterização citogenética, um polimorfismo intenso em javalis, com o número de cromossomos variando de 36 a 38, o que gera dificuldades na obtenção de animais puros para o desenvolvimento da criação.

Atualmente, a distinção entre animal puro e híbrido é feita não só pela observação do fenótipo, mas também por meio da análise do número de cromossomos nas células diplóides. Porém, em alguns casos, esses métodos são insuficientes para a determinação segura da origem do animal, já que pode ocorrer do fenótipo do híbrido aproximar-se ao do animal puro, e a análise cromossômica não determina pureza individual e sim populacional, uma vez que, pode surgir Javalis com 36 cromossomos, oriundo de cruzamentos de animais híbridos (37×37 ; 36×37) (GIMENEZ et. al., 2003). Outros métodos, como marcadores moleculares, podem colaborar com essa distinção.

O conhecimento e a conservação do patrimônio genético é de suma importância, visto que, a perda da diversidade genética pode acarretar severas consequências, tais como, descaracterização racial, decréscimo da fertilidade, ou diminuição da qualidade da carne (MIRANDA, 2005). Em ambas as situações, advindo implicações econômicas negativamente significativas.

2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

De modo geral, o presente trabalho objetivou utilizar marcadores microssatélites (STRs) desenvolvidos para suínos domésticos para caracterização genética de javalis puros (*Sus scrofa scrofa*) e híbridos

De modo específico, o desenvolvimento deste trabalho fundamenta-se nos seguintes objetivos:

- a) confirmar a eficiência da amplificação heteróloga por meio do uso de marcadores microssatélite desenvolvidos para suíno doméstico e aplicados em javalis puros e híbridos;
- b) caracterizar os locos microssatélites quanto ao tamanho das regiões de amplificação;
- c) analisar a variabilidade genética de amostras do javali, do suíno doméstico e seus híbridos por meio de marcadores microssatélites;
- d) determinar, com base no mesmo marcador, as suas relações filogenéticas; e
- e) verificar se, nos fragmentos analisados há diferenças moleculares entre as formas selvagens, domésticas e cruzadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O JAVALI

Os javalis (*Sus scrofa scrofa*) chegaram à América do Sul, na região do Prata, no início do século 20. Na época, o rei espanhol Afonso XIII programou viagem à Argentina, onde desejava caçar javalis, porém, como ainda não havia exemplares do animal na América, o governo argentino importou alguns da Europa. Afonso XIII acabou não vindo para a Argentina, então o primeiro ministro tomou posse da manada, contudo alguns animais fugiram da propriedade e embrenharam-se no pampa, disseminando-se pelo Uruguai (MARIANO, 2005).

Em 1980, em consequência de uma seca que assolou o Uruguai, o leito do Rio Jaguarão diminuiu e muitos animais aproveitaram a fraca correnteza para fugir em busca de alimentos e para longe das áreas de caça. Os primeiros indivíduos foram detectados, em 1990, em território brasileiro, nas fazendas de Herval, município a 380 km ao sul de Porto Alegre, com 7.000 habitantes, e sustentado pela pecuária de bovinos e ovelhas. Só em 1993, os javalis mataram, pelo menos, 200 cordeiros e destruíram 30% das lavouras de milho e sorgo. Em 2002, o prejuízo alcançou R\$ 4,3 milhões e afetou 1.850 propriedades rurais do município. GERCHMAN, 2005 verificou que segundo dados do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de 1994, existiam cerca de 2.000 javalis invasores no Rio Grande do Sul .

No Brasil, as primeiras criações destinadas ao consumo datam do início da década de 1990 e localizavam-se exclusivamente nos Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo. Como na época, o conhecimento sobre a espécie era escasso, os rebanhos foram iniciados com animais cruzados com o suíno doméstico, principalmente, com o porco bagual. Posteriormente, foram importados reprodutores e matrizes puros da Europa, onde o cruzamento híbrido é proibido por lei (PAIVA, 1996).

O rebanho nacional oficial está estimado em torno de 40.000 cabeças e 450 criadores, sendo que, só no Estado de São Paulo, existem cerca de 10.000 cabeças

distribuídas entre 130 criatórios. Desde 1998, o IBAMA regulamenta a criação de javalis com base na Portaria nº102, visto que, a espécie é considerada exótica no país (MARCHIORI FILHO et al., 2002).

O Ministério do Meio Ambiente, Por meio da Portaria nº102, visando intimidar a soltura e introdução dos animais na natureza, por criadores que desistiam da atividade, com conseqüências que afetariam desfavoravelmente a biota, exigiu o registro das propriedades e de seus respectivos plantéis e vetou a importação de mais espécimes e a abertura de novos criadouros (IBAMA, 1998).

Hoje, há somente 3 criadouros atuando oficialmente no território nacional, com Licença Ambiental e que enviam, anualmente, Relatórios de Monitoramento e Declarações de Estoque aos órgãos competentes. Eles estão lotados no Distrito Federal e nos Estados do Espírito Santo e Santa Catarina (IBAMA, 2004).

Criadores que outrora abatiam seus animais, agora se dedicam exclusivamente a abastecer outras propriedades com a venda de matrizes e reprodutores. Reprodutores puros de origem, com Atestado Citogenético e com microchip, são vendidos como material genético por cerca de U\$400,00 as matrizes com 8 meses por, aproximadamente, U\$900,00 os machos com 18 meses, podendo chegar a U\$3.500,00 no caso de animais adultos aos 5 anos de idade. Enquanto filhotes desmamados, com 5 meses, vendidos para terminação, não saem por mais de U\$200,00 (STEIERNAGEL, 1997).

3.2. CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS

A biodiversidade é o complexo resultante das variações das espécies e dos ecossistemas existentes em determinada região (SANTOS, 2005). Seu estudo tem importância direta para a preservação ou conservação das espécies, fato que contribui para melhor aproveitamento dos recursos biológicos, permitindo a harmonia entre o desenvolvimento da atividade humana e a preservação.

A variabilidade genética é um parâmetro extremamente importante para a conservação dos recursos genéticos, sendo uma característica que permite a adaptação às mudanças ambientais. O conhecimento da diversidade genética intra e inter-raciais poderá evitar a descaracterização, assim como a extinção de raças e/ou tipos (GAMA, 2004).

A diversidade genética das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variação presente dentro de cada uma delas. A perda de um único tipo ou raça compromete o acesso a seus genes e combinações genéticas únicas que poderão ser úteis no futuro (EGITO et al., 2002).

Vários estudos têm validado a eficiência na utilização de marcadores do tipo microsatélite para avaliar essa diversidade genética e a relação entre algumas raças de suínos.

Estudos sobre recursos genéticos animais têm se tornado prioridade de muitos países ao perceberem que atendem as necessidades humanas e beneficiam o meio ambiente, sendo responsabilidade cuidar, resgatar, fomentar e melhorar, se for o caso (HERSON, 1992).

Na Europa, diversas medidas adicionais como apoio às explorações, associações de criadores, produtos certificados bem como políticas de subsídio, representam um importante estímulo na estratégia nacional de conservação dos recursos genéticos (TELO DA GAMA, 2002). Um projeto lançado pela Comissão Européia em 1998 chamado “Caracterização da variação genética em suínos europeus” com o intuito de facilitar a manutenção e exploração da biodiversidade desta espécie (PigBioDiv), demonstrou os benefícios da avaliação da diversidade genética dos suínos europeus, considerando tanto populações de raças comerciais como locais. A segunda versão do projeto (PigBioDiv2) incluiu raças chinesas, com o propósito de estender experiências européias para a China (BLOTT et al., 2003). De forma semelhante, um banco de dados europeu de genética animal tem sido estabelecido como um reservatório para identificar algumas raças e acessar os níveis de risco as quais estão submetidas (ROTSCHILD, 2003).

3.2.1. CONSERVAÇÃO DO JAVALI PURO DE ORIGEM

O javali europeu foi endêmico na Inglaterra, em particular na área de Dorset, e seu declínio iniciou-se durante a Guerra Civil, em 1640, quando a caça indiscriminada tornou-se popular entre ricos e nobres (ORIGINAL, 2005). Já no século XVIII, o javali de vida livre tornou-se extinto no Reino Unido, devido à caça e à destruição de seu habitat, só sendo encontrado em cativeiro. Atualmente, a espécie tenta se restabelecer na natureza a partir de indivíduos que escaparam de criatórios licenciados e coleções privadas. Devido à possibilidade de hibridação com suínos domésticos, o status genético hoje da espécie de vida livre neste país é desconhecido (HUCKLE, 2002). Apesar de em extinção na Europa, o javali em vida livre ainda é muito comum na Ásia (COLUMBIA, 2003).

A carne de javali é uma das preferidas pelos consumidores, devido às suas propriedades organolépticas (cor vermelha e sabor diferenciado) e nutricionais (baixas taxas de gordura e colesterol), porém somente o javali puro (*Sus scrofa scrofa*) possui tais características (BRISSAC & PROPATO, 2005).

Por todas essas qualidades, existe um mercado para o escoamento da produção da carne de javali brasileira, porém ele se apresenta estagnado, devido, em parte, às limitações legais, mas, principalmente, pela desorganização do setor e à concorrência desleal da comercialização dos animais cruzados (BEZERRA, 2006).

Estudo efetuado por RATIANI (1990) mostrou que o cruzamento do javali com suínos pode causar um aumento acima da normalidade do número de cromossomos e, conseqüentemente, pode alterar as características da carne, lesando o consumidor com oferta de produtos de qualidade inferior.

O maior obstáculo enfrentado no mercado dessa carne, que prejudica o desenvolvimento da atividade, é a competição com os criadores de animais cruzados, dentre eles, o javaporco, que é um híbrido com o suíno doméstico, cujo número diplóide é $2n=38$. Como já dito, a ocorrência de híbridos entre javalis e suínos, tanto na natureza como em cativeiro, é bastante comum, uma vez que, o cruzamento entre essas

subespécies gera indivíduos férteis, e segundo ANDERSSON (1998), esse fato levou certos criadores a praticarem este tipo de acasalamento como forma de aumentar os índices zootécnicos, explorando um possível efeito heterótico e conseqüente melhoria na lucratividade do setor (TROSHINA & TIKHONOV, 1980; BEZERRA, 2006; e SARUBBI, 2006).

Devido a isso, a imagem do javali acaba sendo denegrida frente aos consumidores, que são ludibriados, pois, adquirem um produto com qualidade inferior, às vezes, até mesmo pelo preço do original.

Os animais híbridos, dependendo do grau de sangue, podem ser identificados por seu fenótipo característico. Eles têm corpo cilíndrico, membros curtos e grossos, cernelha baixa e larga, garupa selada, horizontal e larga, e a distância entre os membros anteriores e posteriores forma um espaço retangular. O crânio tem chanfro largo, côncavo e curto, sendo o focinho despigmentado ou rosa e direcionado para cima, os olhos são grandes, têm diferentes cores e implantação baixa e as orelhas são grandes e caídas. A pelagem é de coloração branca, manchada de branco ou preta, a cauda é enrolada e a pele e os cascos são despigmentados ou rajados de cor clara (PRADA, 2005). Mas, na maioria dos casos, somente o exame citogenético é capaz de discernir o animal puro do animal cruzado.

O exame citogenético não é suficiente para determinação segura sobre a origem do animal, considerando que, em alguns casos, o fenótipo do híbrido aproxima-se ao do animal puro e somente a análise cromossômica não determina pureza individual mas pode ser útil na análise populacional. O cariótipo $2n=36$ é um critério de pureza genética válido somente quando se considera uma população e muitas gerações, em que todos os indivíduos possuem 36 cromossomos ou forem de origem conhecida e controlada, pois híbridos com o suíno doméstico, quando retrocruzados com javalis puros, também podem apresentar ploidia $2n=36$ (GIMENEZ et. al., 2003).

A Associação Britânica de Javalis (BWBA), fundada em 1989, além de criar o registro para animais puros, ainda hoje coordena a importação de novos espécimes e o intercâmbio de animais entre os criadores, para desencorajar o cruzamento com o suíno doméstico e a descaracterização da carne de javali.

No Brasil, a Associação dos Criadores de Javalis (Acrijavali), de âmbito nacional, surgiu com a proposta de centralizar o abate e a distribuição, na expectativa de melhorar a rentabilidade do associado, investir em marketing, tentando fomentar o consumo, abrir novos nichos de mercado e padronizar a produção, visando o mercado externo (BEZERRA, 2006). Contudo ela se extinguiu e não há registro genealógico da espécie ou dados exatos referentes à criação, produção e comércio da carne no país (CAPUTO, 2005).

3.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

A caracterização genética de populações, raças e espécies diferentes permite o estudo da variabilidade genética, fundamental para os programas de conservação. A variabilidade genética total de uma espécie resulta do conjunto representado pela contribuição da variabilidade intra e inter-populacional. O conhecimento desses dois parâmetros é de grande importância para a conservação dos recursos genéticos e, desta forma, evita a extinção dos animais ameaçados.

A determinação do grau de diferenciação entre as populações de uma determinada espécie é necessária por várias razões. Uma delas seria evitar que, durante o manejo, ocorra redução na diferenciação genética existente entre elas. O fluxo gênico é um processo evolutivo homogeneizador que minimiza a diferenciação genética entre as populações (SILVA, 2006).

No Brasil, a caracterização de animais de produção existentes foi baseada, por muito tempo, nos aspectos morfológicos e produtivos, no entanto essa pode ser influenciada pelo meio ambiente ou insuficiente para distinguir animais puros. Os trabalhos sobre caracterização genética, até pouco tempo, envolviam apenas raças de animais domésticos, como exemplo, o suíno.

Segundo SPRITZE et al. (2003), a caracterização genética é importante para os programas de conservação de recursos genéticos animais, pois permite avaliar a distância entre as populações e auxilia na escolha dos animais a serem utilizados na

conservação, mediante a estimativa de índices de similaridade entre indivíduos. Com isso, possíveis acasalamentos podem ser indicados, evitando, assim, a manutenção de amostras geneticamente similares.

Numerosos estudos sobre diversidade genética vêm sendo desenvolvidos em muitos países, e mais extensamente focados nas raças Européias (BAUMUNG et al., 2004). Este mesmo autor cita que em mais da metade da Europa (71%) e países norte-americanos (100%) são realizados estudos em diversidade, enquanto esta proporção é bem menor na Ásia (25%) e América do Sul (21%). Em aproximadamente 90% de todos os projetos analisados, locos de microssatélites são os marcadores genéticos mais utilizados, seguidos por marcadores bioquímicos como polimorfismo protéico (29%) e RFLP (*Restriction Fragment-Length Polymorphism*) (17%).

3.3.1 MARCADORES MOLECULARES

Na criação animal, seja para produção ou para conservação de espécies, podemos definir os marcadores como ferramentas utilizadas para mapear o genótipo e prever e caracterizar um fenótipo.

Inicialmente, os estudos genéticos eram realizados, utilizando-se marcadores morfológicos (fenotípicos) de fácil identificação no organismo e geralmente regidos por um único gene. Apesar dos marcadores morfológicos terem contribuído significativamente para o estabelecimento dos princípios teóricos do mapeamento genético e das análises de ligação gênica, o fato de existir um número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis limita sua utilização (GUIMARÃES E MOREIRA, 1999). Nos dias de hoje, além de marcadores morfológicos, é comum o uso de marcadores moleculares para o estudo de divergência genética em uma ampla gama de espécies vegetais e animais.

Por marcador molecular defini-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas ou de um segmento específico de DNA, expresso ou não. A seqüência de nucleotídeos e a função de um marcador

molecular podem ou não ser conhecidas, sendo em geral desconhecidas. Verificando-se o seu comportamento, de acordo com as leis de Mendel, um marcador molecular é definido como marcador genético. Portanto é importante enfatizar que o simples fato do marcador ser uma seqüência de DNA ou produto da transcrição e tradução de uma seqüência de DNA não implica que se constitua em um marcador genético, como geralmente é suposto (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Podem ser utilizados com vários objetivos, como na identificação de paternidades, construção de mapas genéticos, diagnóstico de doenças, identificação de loci responsáveis por características quantitativas (QTL), genética populacional e melhoramento genético.

Os marcadores moleculares têm se mostrado uma ferramenta eficaz na quantificação da diversidade genética em diferentes populações (SAITBEKOVA et al., 1999; BARKER et al., 2001). Estas populações podem ser ou não geneticamente similares, mesmo que pertençam à mesma raça, devido ao isolamento geográfico e adaptações a diferentes nichos ecológicos, podendo ter acumulado diferentes alelos ao longo de processos adaptativos.

Os marcadores moleculares surgiram com o advento das técnicas de biologia molecular a partir de 1980. O princípio básico envolvido na obtenção e detecção de cada classe de marcador consiste no uso de eletroforese. Este termo foi criado por Michaelis em 1909, o qual descreve a migração de colóides sob a influência de um 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).

Marcadores baseados no DNA apresentam várias vantagens: encontram-se em número elevado, apresentam alto grau de polimorfismo, exibem neutralidade fenotípica, geralmente são herdados co-dominante, raramente exibem interações epistáticas ou pleiotrópicas e podem ser detectados tanto em tecidos jovens como adultos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Nos últimos anos, com o avanço da biologia molecular, a descoberta de microssatélites de DNA, e o uso da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), tornou-se possível a identificação de polimorfismos em vários sítios genômicos nos animais,

revolucionando, as possibilidades de monitoramento genético de populações. Segundo ROTSCHILD (2006), novos marcadores genéticos continuam sendo identificados e mapeados na espécie suína, além dos estudos das interações entre mapas e a expansão dos mapas de QTL. No início de 2006 já existiam mais de 1.588 genes e 2.493 marcadores da espécie suína identificados e depositados em bancos de dados.

Os marcadores genéticos são capazes de assistir na seleção visando melhora da qualidade de carne e podem ser considerados como uma das mais excitantes oportunidades para a indústria animal. No entanto, a valorização da utilidade destes marcadores na avaliação das diferenças genéticas existentes entre populações deve ser enfatizada, de forma a avançar nos estudos de conservação da diversidade.

Uma das maiores vantagens de dados moleculares está na forma objetiva com que podem ser analisados. Os marcadores moleculares não são susceptíveis a efeitos ambientais, portanto são mais seguros para diversas análises, incluindo as filogenéticas (AMORIM, 1997).

3.3.2 A TÉCNICA DE PCR

Desenvolvida por SAIKI, *et al.* (1985) e, aperfeiçoada, por MULLIS, *et al.* (1987), a técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase) se constitui numa importante ferramenta para o desenvolvimento da genética molecular

A reação de PCR permite amplificar a sequência de DNA específica entre dois oligonucleotídeos conhecidos (*primers* ou iniciadores). A descrição posteriormente feita por SAIKI *et al.* (1988), substituiu o fragmento de Klenow de *E. Coli* pela enzima DNA polimerase termostável (Taq Polimerase), tornando assim a utilização de marcadores moleculares de DNA possível em larga escala. Possibilitou a reação de PCR ser passível de automatização e aumentou a especificidade e sensibilidade da reação, além de possibilitar a amplificação de fragmentos maiores.

A PCR se baseia no pareamento de sequências homólogas da fita de DNA, tornando-se possível reproduzir uma sequência de DNA com até 2000 nucleotídeos de

comprimento, de forma exponencial (2^n), de modo a se obter uma quantidade grande somente da seqüência de interesse, que depois pode ser separada e visualizada no gel eletroforético.

Um ciclo de PCR consiste em três fases: desnaturação do DNA molde (a 95°C), ligação (anelamento) dos *primers* e polimerização do DNA (a 72°C). Na 1ª etapa faz-se a separação das cadeias de dupla hélice de DNA por meio do calor. Esta separação é essencial para que, na 2ª fase, dois *primers* de oligonucleótidos se liguem às seqüências dos pares de bases complementares da cadeia molde. Estes *primers* são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar. Os *primers* servem, portanto, de ponto de partida para a replicação de DNA e, na última etapa, faz-se a sua extensão. A enzima responsável por esta polimerização é a DNA polimerase termo-estável (Taq), tendo sido isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* que vive em elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos de PCR ocorrem a temperaturas situadas entre os 64°C e 95°C. Para executar este ciclo usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do ciclo com repetições de cerca de 30 ciclos (SAIKI et al. 1988)

Assim, duas novas cadeias são sintetizadas a partir da cadeia molde em cada ciclo completo de PCR, logo dá-se um crescimento exponencial, havendo ao fim de n ciclos 2^n vezes mais cópias do que no início.

O segredo do sucesso da PCR reside na capacidade que ela tem de amplificar uma seqüência precisa de DNA aliada à sua simplicidade, rigor, elevada sensibilidade e especificidade. Não é necessário isolar o DNA que se pretende amplificar (mesmo que se encontre misturado com DNA de outras espécies), uma vez que a especificidade da PCR é dada pelos *primers*.

3.3.3 MICROSSATÉLITE

Os microssatélites (STRs) são seqüências moderadamente repetitivas dispersas pelo genoma de eucariotos, formadas por repetições em tandem de 1 a 6 pares de bases. Estas seqüências formam conjuntos de cinco até centenas de repetições por loco, podendo variar em tamanho e possuindo um caráter altamente polimórfico (TAUZ, 1989).

Os microssatélites podem ser analisados pela técnica de PCR, utilizando-se iniciadores complementares às seqüências flanqueadoras de copia única (TAUZ, 1989). Por não serem seqüências codificantes e não estando, aparentemente, expostas aos mecanismos de seleção natural, possibilitando a manutenção de sua variabilidade.

Suas variações podem ser causadas principalmente por um alinhamento incorreto das fitas do DNA ("DNA replication slippage") durante a fase de replicação (TAUZ, 1989).

Os loci de microssatélites ocorrem em todo o genoma de muitos organismos (LITT E LUTY, 1990) e, portanto, podem ser usados como marcadores para estabelecer grupos de ligação e mapear cromossomos. Se a freqüência alélica for conhecida, os loci de microssatélites altamente polimórficos podem ser úteis para identificação individual em uma população e para determinar a probabilidade de parentesco entre dois indivíduos (ARAÚJO, 2004).

MIRANDA (2005) concluiu que, como a maioria dos microssatélites (STRs) localiza-se em regiões específicas dos cromossomos, com marcante similaridade na seqüência de bases de suas unidades de repetição entre as espécies, acompanhada da variação no comprimento dessas unidades, talvez um emprego interessante seja na determinação de uma ligação ancestral entre os taxos, por meio da utilização de iniciadores heterólogos. Mas, para que os STRs possam ter tal aplicação, é necessário que algumas análises sejam realizadas, entre estas, o estudo da distribuição de suas freqüências em diversos segmentos da população, a definição das taxas de mutação para cada sistema utilizado, e o cálculo da quantidade de informação que cada sistema pode oferecer.

O isolamento de loci de DNA hipervariáveis, como os microssatélites, tem revolucionado nossa capacidade de estudar a estrutura das populações. O conhecimento da distribuição da diversidade genética dentro e entre populações é a maior contribuição que o geneticista da conservação pode fazer em relação à avaliação da viabilidade das populações.

As populações da maioria, se não de todas, as espécies mostram algum nível de estruturação genética, que pode ser devida à variação de agentes não mutuamente exclusivos. Barreiras ambientais, processos históricos e sistemas de acasalamento podem todos, em alguma extensão, moldar a estrutura genética das populações. Em adição, como as distribuições geográficas das espécies são tipicamente mais extensas que a capacidade de dispersão individual, as populações são, com frequência, geneticamente diferenciadas por meio do isolamento por distância.

Como a estruturação genética reflete o número de alelos trocados entre populações, 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).

3.3.3.1. MICROSSATÉLITES EM ESTUDOS COM ANIMAIS

A técnica de DNA microssatélite vem sendo aplicada com sucesso em vários animais e tem sido usada para teste de paternidade em programas de melhoramento (ARRANZ et al., 1996; REGITANO, 1996; RON et al., 1996; e ROSA, 1997) e para identificação de paternidade de rotina (FREDHOLM & WINTERO, 1996; PIHKANEN et al., 1996 ; BINNS et al., 1995; BOWLING et al., 1997).

Segundo KUMAR (2000), os marcadores de microssatélites apresentam um alto grau de polimorfismo, são bem documentados em algumas espécies (bovinos, suínos, ovinos, eqüinos, aves e peixes), podendo ser usados para a caracterização de rebanhos, além de estabelecer as relações filogenéticas entre diversas raças. A

exemplo de SOLLERO (2006) que trabalhou com diversas raças naturalizadas de suínos no Brasil encontrando resultados que permitem a proposição de estratégias de manejo e conservação.

Sua utilização em estudos de relações entre populações, relações filogeográficas e estrutura populacional tem aumentado consideravelmente. ARRANZ et al. (1996) compararam as árvores filogenéticas obtidas, utilizando polimorfismos bioquímicos e microssatélites para cinco populações de gado doméstico. Neste estudo, foram utilizados 14 locos de sistemas protéicos, nos quais 71,4% apresentaram-se polimórficos, ao passo que, para 5 locos de microssatélites, este número foi de 100%. Além disso, os sistemas protéicos apresentaram 28 alelos diferentes, com uma heterozigosidade média de 0,206 a 0,264 em comparação a 79 alelos obtidos, utilizando microssatélites com uma heterozigosidade média de 0,697 a 0,765. As duas árvores construídas a partir dos dados obtidos mostraram-se idênticas quanto às relações entre as populações, sendo que a obtida com dados de microssatélite apresentou distâncias genéticas maiores, permitindo uma melhor diferenciação entre populações proximamente relacionadas.

GONELA (2003) trabalhou com seis locos microssatélites de suíno doméstico em queixada (*T. pecari*) e porco monteiro (*Sus scrofa* sp). Em uma das análises concluiu que iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* podem ser utilizados com sucesso em *Tayassu pecari*, sendo altamente informativos e podendo ser úteis nas análises populacionais, estudos filogenéticos e, posteriormente, no melhoramento genético. Entre os seis locos analisados, quatro foram polimórficos (66,7%). Porém, quando se trabalha com iniciadores heterólogos é de se esperar que haja uma redução no número de alelos observados, podendo variar de drástica a suave. No caso específico deste trabalho, em cinco locos foi observada uma redução drástica (mais de 50%) no número de alelos, sendo que a única exceção foi observada em um loco, no qual houve redução de apenas um alelo. Esse fato pode ter duas explicações. A primeira estaria relacionada ao comportamento de *T. pecari*, o qual necessita de uma vasta área para sobreviver e os indivíduos de um bando não cruzam com os de outro bando, o que pode favorecer a endogamia e efeito do fundador. A segunda estaria

relacionada à presença de alelos nulos, já registrada em muitas espécies (JONES et al., 1998).

Microssatélites tem sido 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 de populações (VIARD et al., 1996); para entender mecanismos de comportamento sexual (LIFJELD et al., 1997; SAINO et al., 1997) e para organizar programas de conservação (GARCIA-MORENO et al., 1996; HOULDEN et al., 1996).

Segundo MIRANDA (2005), os microssatélites também podem ser utilizados para o estudo do processo de identificação de hibridização em javalis, sendo que os iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* poderiam ser usados em *Sus scrofa scrofa* em análises populacionais e na identificação de marcadores moleculares úteis ao melhoramento genético.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Genética Molecular, do Departamento de Zootecnia, e no Laboratório de Biotecnologia do Departamento de Tecnologia, ambos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal – Unesp, em Jaboticabal, no Estado de São Paulo, e no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, SP.

4.1 ORIGEM DOS ANIMAIS UTILIZADOS

Cerca de 148 animais (javalis, híbridos e suínos) de grupos genéticos bem definidos foram utilizados, sendo 46 javalis puros de origem, com $2n=36$ cromossomos, provenientes de dois criadouros particulares de javalis no Estado de São Paulo; 43 híbridos, com $2n=36, 37$ e 38 cromossomos, provenientes de um terceiro criadouro particular de Javalis também no Estado de São Paulo; e 59 suínos: *three cross* (Landrace, Large White e Duroc) lotados no Setor de Suinocultura do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Campus de Jaboticabal e de uma suinocultura particular, localizada também em São Paulo.

Para efeito de classificação, os animais em estudo foram agrupados, segundo análise de pedigree e número diplóide ($2n$), em 5 grupos genéticos: **grupo I**, constituído de 59 suínos domésticos e que possuem $2n=38$; **grupo II**, formado por 46 javalis puros de origem (PO), que possuem $2n=36$; e **grupo III**, constituído de 3 híbridos, com $2n=36$, provenientes de acasalamentos entre híbridos e retrocruzamentos; **grupo IV**, representando 30 híbridos com suíno doméstico de ploidia igual a 37 cromossomos; e **grupo V**, constituídos de 10 híbridos também com o doméstico, porém com $2n=38$, conhecidos popularmente como Javaporcos, devido à similaridade cariotípica e fenotípica com o suíno doméstico.

Para a classificação dos javalis puros e híbridos em seus respectivos grupos, recorreu-se a análise citogenética, a qual foi realizada por meio da cultura de linfócitos do sangue periférico de acordo com a técnica descrita por MOORHEAD et al. (1960). Cerca de 15 metáfases de cada indivíduo foram analisadas para verificação do seu número diplóide e, conseqüentemente, a classificação em grupos genéticos de acordo com a ploidia encontrada ($2n = 36, 37$ e 38 cromossomos).

4.2 COLETA DE MATERIAL

De cada animal, foram colhidos 10 mL de sangue da veia cava cranial com seringa descartável e colocados em tubo *vacutainer* contendo 0,05ml de solução de EDTA 15,0%. A imobilização dos animais foi mecânica, dispensando-se o uso de anestésico e/ou relaxantes musculares. As amostras foram transportadas refrigeradas em embalagem térmica e imediatamente processadas ao chegar ao laboratório.

4.3 MÉTODOS

4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico foi extraído conforme metodologia descrita por ZADWORNY & KUHNLEIN (1990), que consiste na remoção dos eritrócitos por sucessivas lavagens com tampão salino, contendo o detergente Nonidet P-40, com subsequente lise e precipitação das proteínas dos leucócitos, utilizando-se SDS (dodecilsulfato de sódio) e precipitação do DNA em etanol absoluto, na presença de solução saturada de NaCl (6M). Após a retirada do sal, por lavagem com etanol 70%, o DNA foi dissolvido em tampão TE (10 mM Tris HCl pH = 7,6 e 1mM EDTA pH = 8,0) na proporção de 10:1, sendo posteriormente armazenado a 4 °C.

Uma alíquota de 10 µL da solução de DNA foi diluída com 990 µL de H₂O, procedendo-se a leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm,

visando quantificar a concentração do DNA, bem como a sua pureza, sendo as amostras de DNA estocadas a 4°C, para posterior amplificação.

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A integridade do material genético e a eficiência do método de extração foram averiguados qualitativamente, pela aplicação de 1µL de DNA estoque e 1µL de tampão de carregamento (Tris-HCl 0,1M 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 89mM, H₃BO₃ 89mM, EDTA 2,5mM e pH 6,8) contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio. Procedeu-se a eletroforese a 100V por 40', o padrão de tamanho molecular utilizado para comparação foi de 100 pb (Invitrogen®).

Os fragmentos de DNA genômico (Figura 1) foram visualizados sobre transiluminador de luz UV e documentados em um fotodocumentador modelo GEL DOC 2000 (BIO RAD).

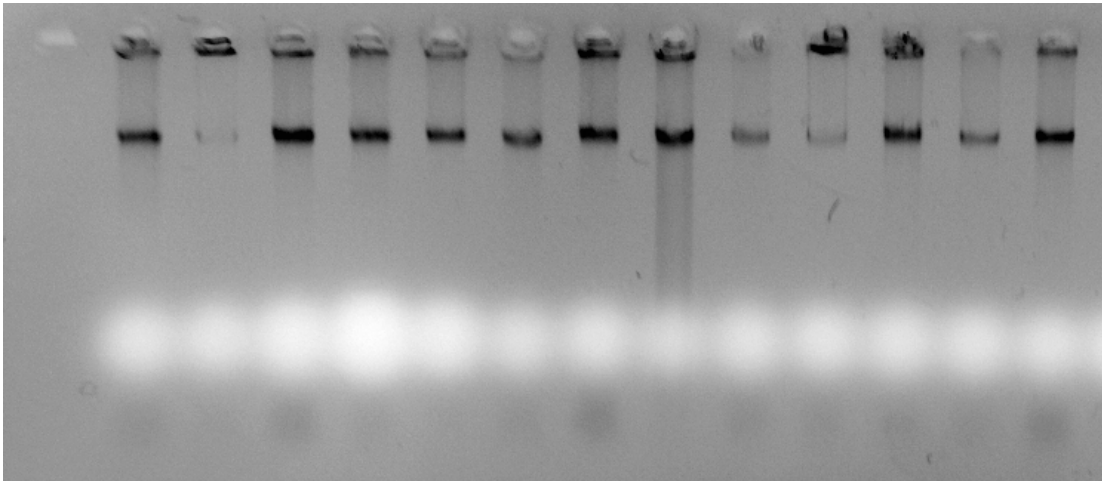


Figura 1. Fragmentos de DNA genômico quantificados em gel de Agarose 1%.

Concomitantemente, a quantificação do DNA estoque foi determinada por meio da quantificação por espectrofotometria, utilizando-se um equipamento DU 640B (Beckman). Após serem diluídas 50 vezes, as amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro com comprimentos de onda de 260 e 280nm. A absorção da luz ultravioleta a 260nm permite a quantificação do DNA na amostra, enquanto que o índice obtido pela razão entre os dois comprimentos permite avaliação da sua pureza. Preparações sem contaminantes (proteínas, resquício de tampões) possuem razão 260/280 nm entre 1,8 e 2,0, tendo este valor diminuído na presença dos mesmos (SAMBROOK et al., 1989).

A solução de trabalho foi, então, preparada na concentração de 10ng/ μ L em água esterilizada e estocada a -20°C .

4.3.3 MARCADORES UTILIZADOS

Para realização deste trabalho foram analisados 3 locos de microssatélite (polimorfismo de número de repetições de seqüências simples em *tandem*) (Tabela 1), utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os marcadores foram selecionados do trabalho de MIRANDA (2005), por apresentarem amplificações com fácil identificação dos genótipos e segregação coerente com as leis de Mendel.

A proposta original do presente trabalho era trabalhar com 5 marcadores moleculares (IGF1, ACTG2, TNFB, SW444, ALOX12). Mas os marcadores SW444 e ALOX12 não amplificaram em dezenas de tentativas para os javalis, mas para suínos houve êxito. Como o objeto de interesse eram os javalis, utilizou-se apenas três marcadores.

Tabela 1. Lista de pares de iniciadores (*primers*) e temperaturas de anelamento utilizadas para *Sus scrofa domestica* e para *Sus scrofa scrofa*.

cromossomo	Tamanho da repetição	Sequência 5' –3'	Temperatura de Anelamento (°C)	
			<i>Sus s. domestica</i>	<i>Sus s. scrofa</i>
ACTG2	3	Dinucleotídeo CATCTTCCTCTTCCCTTCCC TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC	58	51
IGF1	5	Dinucleotídeo GCTTGGATGGACCATGTTG CACTTGAGGGGCAAATGATT	58	58
TNFB	7	Dinucleotídeo CTGGTCAGCCACCAAGATTT GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC	60	55

4.3.4 AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES

As reações da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em volumes de 20 µl que consistiam de 3 µl de DNA (3 ng/µl), 1,0 µl de cada iniciador *forward* e reverso (4 µM); 1,6 µL de dNTPs (2,5 mM); 2,0 µl de Tampão 10X (Tris HCl 1 M, pH 8,4 100 mM, KCl 500 mM); 1,5 ou 2,0 µl de MgCl₂ 6H₂O (cloreto de magnésio hexa-hidratado a 50 mM); 0,2 µl (1 unidade) de *Taq DNA Polimerase* (5U/µl) e água MiliQ autoclavada para completar o volume final. As concentrações de MgCl₂ e água variaram de acordo com a otimização para cada loco.

Inicialmente foram utilizadas as condições padronizadas para o genoma do suíno doméstico; a partir destes dados, que envolviam desde as condições ideais da PCR até os programas utilizados, foram realizados os ajustes para que os iniciadores desenvolvidos para o suíno doméstico amplificassem em javali (Tabela 1).

Após a reação de PCR, a visualização dos produtos de amplificação dos locos de microsatélites foi, inicialmente, realizada em gel de poliacrilamida 10%, submetido a

uma condição de corrida de 100 Volts por, aproximadamente, 4 hora. O gel foi corado com brometo de etídeo e analisado sob luz Ultra-Violeta (Figura 2). Foi também utilizado um marcador de peso molecular de 50 pb. Esta etapa é importante para verificar se, de fato, houve amplificação dos fragmentos esperados. Após serem refeitas as falhas de amplificação, os produtos da reação de PCR foram aplicados em um seqüenciador capilar modelo ABI 3100 Avant (Applied Biosystems).

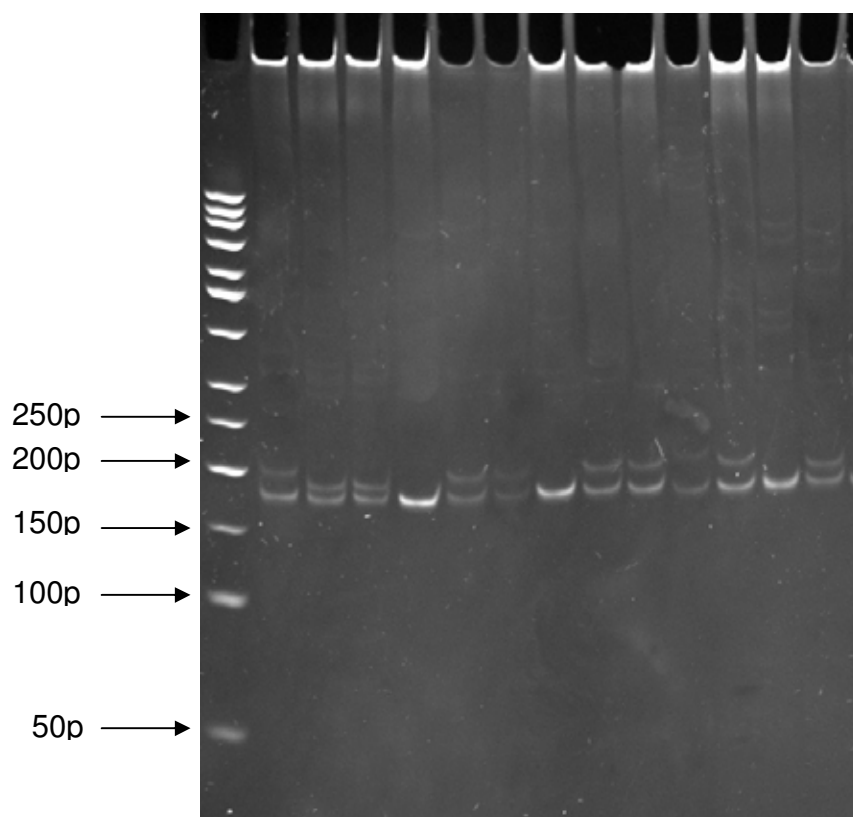


Figura 2- Amplificação do loco TNFB em gel de poliacrilamida 10%

4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises foram feitas sob duas perspectivas: variabilidade intra e inter populacional, contabilizando todos os cinco grupos genéticos da espécie *Sus scrofa* considerados, totalizando 148 animais.

4.4.1. VARIABILIDADE INTRA-POPULACIONAL

As frequências alélicas dos grupos genéticos foram analisadas por meio do programa MS_Tools (PARK, 2001) para verificação de alelos diagnósticos nos 148 animais analisados.

Os parâmetros populacionais tais como: heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) também foram calculadas por meio do programa MS_Tools (PARK, 2001).

O coeficiente de endogamia (F_{IS}) dentro de cada população foi calculada pelo programa FSTAT (GOUDET, 2002).

Para analisar a existência de Equilíbrio Hardy-Weinberg dentro das populações foram feitos os testes globais para Déficit e Excesso de heterozigotos utilizado o programa Genepop (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Valores de p exatos foram obtidos pelo método de cadeia de Markov mediante análise com os seguintes parâmetros: 10000 dememorizações, 40 batches e 2000 permutações.

4.4.2. VARIABILIDADE INTER-POPULACIONAL

Para testar as relações existentes entre os cinco grupos genéticos analisados foi estimado o índice de fixação F_{ST} proposto por WEIR & COCKERHAM (1984), calculados pelo programa Genepop. As frequências alélicas apresentadas nas

populações também foram comparadas por meio de distâncias genéticas estabelecida pelo programa DISPAN (OTA, 1993). Testou-se, portanto, o padrão de distância genética D_A (NEI et al., 1983) para a construção de dendogramas pelo método algarítimo de *Neighbor joining* (SAITOU & NEI, 1987). Análise de bootstrap com 1000 replicações foi utilizadas para avaliar a consistência interna dos grupamentos sugeridos, bem como a magnitude dos efeitos de erros amostrais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. VARIABILIDADE INTRA-POPULACIONAL

Com base nas frequências alélicas encontradas nos 148 animais analisados a partir de três microssatélites, 97 alelos foram identificados. Na amostragem realizada com os três microssatélites utilizados pode-se efetuar algumas inferências a partir dos dados obtidos.

Os resultados das frequências alélicas obtidos pelos locos de microssatélites para os diferentes grupos genéticos são apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

A nomenclatura dos Alelos utilizada nesse estudo corresponde ao tamanho destes alelos em pares de bases. A opção de se utilizar o comprimento dos alelos para sua identificação deve-se à tentativa de evitar problemas advindos de variações de nomenclaturas que dão margem a erros na comparação entre diferentes trabalhos. Contudo, essa maneira de identificação não garante a homogeneidade de resultados gerados em diferentes laboratórios, devido ao uso de diferentes métodos ou equipamentos que resultam em variações nas estimativas do tamanho do produto de amplificação. A explicação dessas variações poderia ser feita com a utilização de amostras-padrão disponíveis em bancos de dados (STUDART, 2001).

No presente trabalho, para o marcador IGF1 foram encontrados 11 alelos com tamanho variando de 214 a 240, sendo que o Grupo I (suíno) variou 220 a 234 e o Grupo II (javali) de 226 a 240 (Tabela 2). MIRANDA (2003) utilizando o mesmo marcador encontrou seis alelos com variação de 223 a 237 e 230 a 250 para suíno e javali respectivamente. Em relação à frequência desses alelos, nota-se que o alelo mais freqüente nos suínos (Grupo I) foi o 226, o qual foi pouco freqüente nos javalis puros de origem (Grupo II), que apresentaram maior freqüência do alelo 240 (Tabela 2). O alelo 220 foi detectado apenas nos suínos e o 224 foi detectado nos suínos e nos cruzados (Grupo IV e V) indicando especificidade desses alelos aos suínos e, conseqüentemente, aos cruzados. No entanto, os alelos 236, 238 e 240 parecem ser específicos dos javalis (Grupo II), e não nos suínos.

Tabela 2. Frequências alélicas do microssatélite IGF1 obtidas em amostras de suínos, javalis puros e seus híbridos.

Pares de bases	Grupo Genético				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	Frequência alélica				
214	-	-	-	5,56	-
220	4,55	-	-	-	-
224	1,14	-	-	8,33	14,29
226	29,55	12,22	-	13,89	7,14
228	20,45	5,56	-	13,89	14,29
230	28,41	15,56	33,33	16,67	64,29
232	13,64	7,78	16,67	25,00	-
234	2,27	23,33	-	-	-
236	-	1,11	16,67	11,11	-
238	-	10,00	33,33	5,56	-
240	-	24,44	-	-	-

Grupo I = suíno, Grupo II = javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

Na Tabela 3, encontram-se as frequências alélicas do microssatélite ACTG obtidas em amostras de suínos (Grupo I) javalis puros (Grupo II) e seus híbridos Grupos III, IV e V. Observa-se que neste marcador foram detectados 11 alelos com tamanho variando de 102 a 134, sendo que tanto o Grupo I (suíno) como o Grupo II (javali) variaram de 112 a 134 (Tabela 3). Utilizando o mesmo marcador MIRANDA (2003) encontrou oito alelos com variação de 109 a 142 para o suíno e 110 a 140 para o javali. Em relação à frequência desses alelos, nota-se que o fragmento mais freqüente nos suínos (Grupo I) foi o 128, o qual foi também o mais freqüente nos animais cruzados (Grupos III, IV e V). Enquanto, que para o javali puro (Grupo II) o

alelo mais freqüente foi o 112. Os alelos 114, 122 e 126, parecem ser específicos do suíno.

Tabela 3. Freqüências alélicas do microssatélite ACTG obtidas em amostras de suínos, javalis puros e seus híbridos.

Pares de bases	Grupo Genético				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	Freqüência alélica				
102	-	-	-	2,38	7,14
112	11,22	50,00	33,33	19,05	-
114	4,08	-	-	14,29	28,57
116	8,16	8,33	-	4,76	-
118	7,14	25,00	-	4,76	-
122	5,10	-	-	-	-
126	13,27	-	-	-	-
128	31,63	4,17	66,67	45,24	50,00
130	9,18	4,17	-	2,38	-
132	4,08	4,17	-	-	-
134	6,12	4,17	-	7,14	14,29

Grupo I = suíno, Grupo II = javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

Na Tabela 4, encontram-se as freqüências alélicas do microssatélite TNFB obtidas em amostras de suínos (Grupo I), de javalis puros (Grupo II), e seus híbridos Grupos III, IV e V. Observa-se que o tamanho dos alelos detectados para o microssatélite TNFB nos grupos genéticos analisados variou de 170 a 218, sendo que tanto o Grupo I (suíno) variou de 170 a 196 enquanto o Grupo II (javali) variou de 172 a 206. MIRANDA (2003) utilizando o mesmo marcador encontrou 8 alelos com variação de 174 a 213 e 175 a 210 para suíno e javali respectivamente. Nesse estudo, foram

detectados 17 alelos correspondentes a esse microssatélite, o alelo mais freqüente no suíno foi o 170, ao passo que, em todos os cruzados, foi o 172 e para o Javali puro foi o 176. Os alelos 170, 174, 180, 182, 184, 190, 192, 194 e 196 parecem ser exclusivos dos suínos, enquanto que os alelos 198 e 206 parecem ser exclusivos dos javalis. Estes alelos exclusivos podem ser úteis na diferenciação do javali puro do híbrido.

No Grupo genético II (javali) quando comparado com o Grupo I houve redução no número de alelos de 11 para 4. Este resultado pode ser explicado, pelo fato de que quando o tamanho efetivo de uma população é reduzido, como no caso de espécie introduzidas como o javali a deriva genética é intensificada, o que pode ocasionar que alguns alelos sejam perdidos e outros fixados (MIRANDA, 2003). Muitas abordagens que utilizam dados genéticos para examinar reduções no tamanho das populações observam as mudanças nas freqüências alélicas ou perda de alelos (GARZA & WILLIAMSON, 2001).

Dos três locos padronizados, todos foram polimórficos para as cinco populações estudadas. Em resumo, comprovou-se a eficiência da amplificação heteróloga por meio do uso de marcadores microssatélites desenvolvidos para suíno doméstico (*Sus scrofa scrofa*) e aplicados em javali, como também foi visto por MIRANDA (2003) aplicando os mesmos marcadores para javali.

Observa-se na Tabela 5 que o grupo genético que apresentou o maior número de alelos identificados foi o de suíno (Grupo I) com 28 e o híbrido $2n=37$ (Grupo IV) com 28, seguido pelo javali (Grupo II) com 19 alelos.

Tabela 4. Frequências alélicas do microssatélite TNFB obtidas em amostras de suínos, javalis puros e seus híbridos.

Pares de bases	Grupo Genético				
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	Frequência alélica				
170	27,00	-	-	2,27	-
172	16,00	25,00	33,33	34,09	50,00
174	3,00	-	-	-	-
176	7,00	41,67	33,33	-	-
180	3,00	-	-	-	-
182	9,00	-	-	4,55	12,50
184	3,00	-	-	-	-
188	-	-	-	2,27	12,50
190	2,00	-	-	6,82	-
192	4,00	-	16,67	13,64	-
194	5,00	-	-	-	-
196	21,00	-	16,67	18,18	-
198	-	25,00	-	2,27	-
202	-	-	-	2,27	25,00
206	-	8,33	-	-	-
208	-	-	-	11,36	-
218	-	-	-	2,27	-

Grupo I = suíno, Grupo II = javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

Os valores médios de heterozigosidades observadas nas populações variaram 0,537-0,7871 e apresentam-se inferiores aos valores médios de heterozigosidades esperadas (0,6749-0,8279). No grupo genético híbrido $2n=38$ (Grupo V), o número efetivo de alelos (3,0761) e a heterogozigosidade esperada (0,6749) corresponderam

aos mais baixos valores entre todos os grupos analisados. Já os grupos genéticos, híbrido $2n=37$ (Grupo IV) e o suíno (Grupo I), apresentaram os maiores valores para estas estimativas de número efetivo de alelos (5,8 e 5,6 respectivamente). De uma forma geral, os cinco grupos genéticos apresentaram heterozigosidade observadas inferiores aos valores de heterozigosidade esperadas e estas estimativas, assim como a diversidade alélica, se mostraram variáveis entre estas populações.

No presente trabalho, os valores de F_{IS} (coeficiente de endogamia) para os Grupos II e III apresentaram negativos (Tabela 5), -0,005 e -0,037 respectivamente, indicando um excesso de heterozigotos nestas populações, esta diversidade gênica pode estar associada ao fato dessas populações não terem passado por uma ação de seleção artificial intensa. Nos demais grupos (I, IV, V) os valores de F_{IS} foram positivos (Tabela 5). GONELA (2003) obteve valores negativos de F_{IS} nos locos AGTG2, CGA e SW444 em estudo em populações de porco-Monteiro (*Sus scrofa* sp.) e queixada (*Tayassu pecari*) com o uso de marcadores microssatélite de *Sus scrofa*.

Dentre os cinco grupos genéticos analisados, o suíno (Grupo I) e o híbrido $2n=37$ (Grupo IV) não apresentaram em equilíbrio de acordo com os dados obtidos no teste global de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para Déficit de heterozigotos (Tabela 5). Os suínos amostrados pertenciam a duas pequenas propriedades e a endogamia poderia estar ocorrendo. A seleção de animais não aparentados em populações com estas características geralmente é dificultada, e pode também influenciar nos resultados de desvio em relação ao EHW.

O desequilíbrio do EHW nos animais representantes dos híbridos $2n=37$ pode ser explicado pelo fato das amostras serem coletadas de um único rebanho e fazem parte de uma população, provavelmente, formada a partir de poucos indivíduos, o que poderia tornar sua base genética restrita. Além do endocruzamento, outras fontes também podem estar envolvidas ou serem igualmente responsabilizadas pelo desequilíbrio do EHW, como erros na genotipagem dos indivíduos e presença de alelos nulos (SILVA, 2006), sendo o último originado por uma mutação no sítio de hibridação de pelo menos um dos oligonucleotídeos iniciadores do microssatélite a ser amplificado. Este fato leva à detecção de um excesso de aparentes homozigotos, resultando em

estimativas incorretas de freqüências alélicas, superestimando coeficientes de endocruzamento (MARSHALL et al., 1998).

A presença de alelos nulos poderá ocorrer em homozigose e, neste caso, será confundida com falha na PCR (ausência do produto da PCR). Quando ocorrer em heterozigose, os heterozigotos poderão aparecer como homozigotos, implicando em excesso de homozigotos na população, o que poderá causar erros nas análises estatísticas que dependem das freqüências alélicas (CALLEN et al., 1993; ENGEL et al., 1996).

Apesar dos híbridos serem do mesmo criatório ocorreu uma diferença nos resultados do teste de equilíbrio de HW, em que os grupos híbridos $2n=36$ e $2n=38$ apresentaram equilíbrio e o híbrido $2n=37$ não. Isto pode ser explicado pelo fato que os híbridos $2n=36$ e $2n=38$ possuem baixa amostragem em relação ao híbrido $2n=37$.

Segundo GONELA (2003), com relação ao número de alelos quando se trabalham com iniciadores heterólogos, a redução pode variar de drástica a suave comparativamente à espécie original. No presente estudo, o número de alelos médios do Grupo II apresentou redução com relação ao Grupo I, sugerindo, neste caso, duas explicações aos valores observados. Pela primeira, está relacionado com manejo destes animais nos criatórios, onde indivíduos de uma população não cruzam com os de outras, haveria o favorecimento da endogamia. Outra explicação para a redução estaria relacionada à presença de alelos nulos, os quais representam um problema quando se utilizam iniciadores de uma espécie em outra. Como já foi dito anteriormente, se os alelos nulos ocorrerem em homozigose será considerado falha na reação de amplificação e se ocorrerem em heterozigose, os heterozigotos serão considerados como homozigotos, subestimando, desta forma, o número de alelos.

Tabela 5. Diversidade genética intra-populacional para os cinco grupos genéticos obtido a partir dos 3 locos de microsatélites.

Grupos Genéticos	N	Na	Nm	He	Ho	Ne	F _{IS}	EHW1	EHW2
Grupo I	59	28	9,33	0,824	0,7871	5,6804	0,045	0,0510 (0,0037)*	0,9982 (0,0007)
Grupo II	46	19	6,33	0,7657	0,7685	4,2685	-0,005	0,5567 (0,0181)	0,4397 (0,0181)
Grupo III	3	10	3,33	0,7556	0,7778	4,0909	-0,037	0,6489 (0,0060)	0,6309 (0,0057)
Grupo IV	30	28	9,33	0,8279	0,7244	5,8109	0,128	0,0003 (0,0002)*	0,9927 (0,0024)
Grupo V	10	12	4,00	0,6749	0,5357	3,0761	0,220	0,0255 (0,0019)	0,9719 (0,0024)

Grupo I = suíno, Grupo II = Javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = Animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

Tamanho das amostras (N), número de alelos identificados (Na), número médio de alelos por população (Nm), heterozigosidade esperada (He), heterozigosidade observada (Ho), número de alelos efetivos (Ne), coeficiente de endogamia ao nível de indivíduo dentro de cada população (F_{IS}), valores de *p* obtidos nos testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg para Déficit de heterozigotos (EHW1) e excesso de heterozigotos (EHW2) e erros padrão para cada valor de *p* entre parênteses.

*=P<0,01

5.2.VARIABILIDADE INTER-POPULACIONAL

De acordo com a análise de diferenciação genética existente entre os possíveis pares de grupos genéticos, os valores de F_{ST} (Tabela 6) evidenciaram uma maior diferenciação entre os grupos genéticos javali (Grupo II) e híbrido $2n=38$ (Grupo V) de 0,2007, sendo a menor vista entre o híbrido $2n=36$ (Grupo III) e $2n=37$ (Grupo IV) de 0,0222.

Tabela 6. Matriz de valores correspondentes ao índice F_{ST} obtidos entre os possíveis pares de cinco grupos genéticos analisados (todos marcadores).

Grupos Genéticos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Grupo II	0,1085*	-	-	-
Grupo III	0,0467	0,0869	-	-
Grupo IV	0,0351	0,1021	0,0222	-
Grupo V	0,0803	0,2007	0,0513	0,0527

Grupo I = suíno, Grupo II = javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

A estimativa de F_{ST} utilizada para mensurar o grau de divergência entre populações ou raças é fortemente influenciada pelo nível de diversidade existente dentro das populações (WRIGHT, 1951). De uma forma geral, a natureza da amostra, os diferentes tipos de marcadores utilizados, o tamanho populacional amostrado e a estrutura genética das populações em questão, influenciam os valores de F_{ST} , portanto, comparações com resultados de outros países são limitadas (SOLLERO, 2006).

Observa-se na Tabela 7 que a maior distância genética foi encontrada entre os grupos genéticos javali (Grupo II) e híbrido $2n=38$ (Grupo V) de 0,6420, enquanto o suíno (Grupo I) se apresentou mais relacionado com o grupo híbrido $2n=37$ (Grupo IV) de 0,233.

Tabela 7. Matriz de distância D_A com os respectivos valores para os possíveis pares de cinco grupos genéticos analisados.

Grupos Genéticos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Grupo II	0,4084	-	-	-
Grupo III	0,4122	0,3988	-	-
Grupo IV	0,2333	0,4359	0,2848	-
Grupo V	0,4093	0,6420	0,5172	0,3040

Grupo I = suíno, Grupo II = javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

De acordo com a distância genética (Tabela 8) para os três grupos genéticos (javali, híbrido e suíno), pode-se dizer que a maior distância foi observada para os grupos javali (Grupo II) e suíno (Grupo I) de 0,4084 seguido de híbrido e javali de 0,4059, sendo que os grupos híbridos (Grupos III, IV e V) e suíno se apresentaram mais relacionados. A distância D_A (NEI *et al.* 1983) geralmente é considerada mais adequada para a obtenção de topologias baseadas no modelo de alelos infinitos e mais indicada para verificar distâncias genéticas a nível populacional do que específico (SOLLERO, 2006).

Tabela 8. Matriz de distância D_A com os respectivos valores para os possíveis pares de três grupos genéticos analisados.

Grupos Genéticos	Grupo II	Grupo III, IV e V
Grupo I	0,4084	0,2235
Grupo II	-	0,4059

Grupo I = suíno, Grupo II = javali, Grupo III = animais cruzados com ploidia igual a 36 cromossomos, Grupo IV = animais cruzados com ploidia igual a 37 cromossomos, Grupo V = animais cruzados com ploidia igual a 38 cromossomos.

O dendrograma selecionado (Figura 3) indica a separação de três grupos distintos. O primeiro grupamento formado por grupo V e grupo IV obteve 74% de confiabilidade. O segundo grupo, formado pelo grupo I apresentou valor de 82%

distante do primeiro grupamento. O terceiro foi representado pelo grupo II e grupo III, mostrou-se mais diferenciado e distante em relação aos outros analisados.

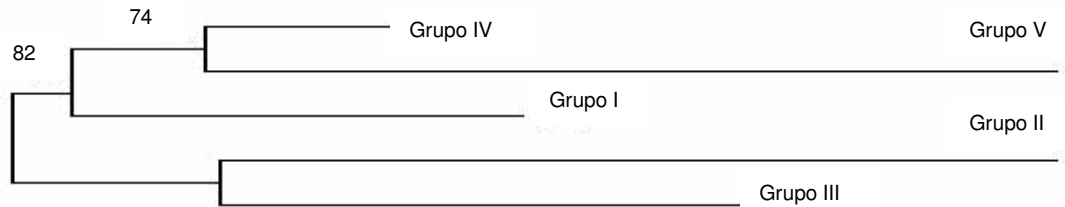


Figura 3. Dendrograma UPGMA baseado na distância D_A com os respectivos valores de *bootstrapping* em cada grupamento

A distância D_A (NEI *et al.*, 1983) possibilitou a inferência de uma árvore representativa baseada no método de UPGMA e com valores de *bootstrapping* (EFRON, 1985) confiáveis.

A caracterização de populações de suínos, javalis e seus híbridos poderá ser útil para outros trabalhos de população e também em projetos que visem conservar o javali puro e avaliar as diferenças entre tais grupos genéticos.

A identificação de marcadores genéticos pode contribuir para discriminar linhagens e indivíduos. Os loci de microssatélites podem ser usados como marcadores e, se a frequência alélica for conhecida e esses loci forem altamente polimórficos, podem ser úteis para identificação individual em uma população.

É imprescindível considerar a contribuição relativa da variabilidade genética intra e inter-populacional, bem como suas correlações para indicar prioridades e manejo de conservação (OLLIVIER & FOULLEY, 2005). Foi observado que a diversidade genética dos cinco grupos genéticos analisados e a identificação de suas estruturas populacionais permitindo esclarecer a variabilidade e identidade genética.

Considera-se ideal que os programas de conservação permitam que as populações mantenham vigor e potencial necessários para atingir seus objetivos, sem esforço e alto capital de investimento (GANDINI *et al.*, 2004). Por isso, as práticas de manejo devem ser coerentes e valorizadas enquanto alternativas de conservação.

6.CONCLUSÃO

Comprovou-se a eficiência da amplificação heteróloga por meio do uso de marcadores microssatélites desenvolvidos para o suíno doméstico (*Sus scrofa scrofa*) e aplicados em javali. Os javalis puros se diferenciam geneticamente dos suínos e dos híbridos. Houve diferenças quanto ao tamanho dos loci de microssatélites. Houve variabilidade genética entre os grupos analisados comprovada pelo coeficiente de endogamia e heterozigotidade. As distâncias genéticas permitiram construir o dendograma que estabelece as relações filogenéticas. Os marcadores moleculares permitiram definir os tamanhos dos fragmentos de cada grupo genético.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui encontrados poderão servir como um piloto para estudos posteriores que, possivelmente, serão capazes de esclarecer as relações filogenéticas entre os grupos genéticos (javali, suíno e híbridos). Desta forma, será possível obter informações essenciais para a implementação e manutenção de trabalhos de conservação.

8. REFERENCIAS

ARAÚJO, A.M. **Paternidade e diversidade genética em caprinos no brasil por meio de microssatélites de DNA**. 2004. 56f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa.

ARRANZ, J.J.; BAYÓN, Y; SAN PRIMITIVO, F. Genetic variation at five microsatellite loci in four breeds of cattle. **Journal of Agricultural Science**, v. 127, p. 533-538, 1996.

AMORIM, D. **Elementos básicos de sistemática filogenética**. Holos Editora & Sociedade Brasileira de Entomologia, segunda edição, 276 p., 1997

ANDERSSON, L.; ANDERSSON, K.; ANDERSSON, E.L.; ELLEGREN, H.; HALEY, C.S.; HANSSON, I.; JOHANSSON, M.M.; LUNDSTROM, K.; MARKLUND, L. Mapping qualitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar x large white intercross. **Journal of Animal Science**, v.76, p.694-700, 1998.

BARKER, J.S.F.; TAN, S.G.; MOORE, S.S., et al. O.S. Genetic variation within and relationships among populations of Asian goats (*Capra hircus*). **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 118, p. 213-233, 2001.

BAUMUNG, R.; SIMIANER, H.; HOFFMANN, I. J. Genetic diversity studies in farm animals – a survey. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 121, p. 361-373, 2004.

BEZERRA, J.A. **Javali - Sangue Azul no Campo**. Revista Globo Rural Online. Edição nº195. Janeiro de 2002. Acesso em 23 de janeiro de 2006. Disponível em <http://globorural.globo.com/barra.asp?d=/edic/195/sumario.htm>

BINNS, M.M.H.; HOLMES, N.G.; HOLLIMAN, A.; SCOTT, A.M. The identification polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. **British Veterinary Journal**, v151, v1, p.9-15, 1995.

BLOTT, S.; ANDERSSON, L.; GROENEN, M.; SANCRISTOBAL, M.; CHEVALET, C.; CARDELLINO, R.; LI, N.; HUANG, L.; LI, K.; PLASTOW, G.; HALEY, C. Characterisation of genetic variation in the pig breeds of china and europe - the pigbiodiv2 project. **Archivos de Zootecnia**, v. 52, p. 207-217, 2003.

BOSMA, A. A.; HAAN, N. A. de; MELLINK, C. H. M.; YERLE, M.; ZIJLSTRA, C. 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, p. 32-35, 1996.

BOWLING, A.T.; EGGLESTON-STOTT, M.L.; BYRNS, G.; CLARK, R.S.; DILEANIS, S.; WICTUM, E. Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. **Animal Genetics**, n.28, p. 247-252, 1997.

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

BRISSAC, C.; PROPATO, V. Sabores raros. Revista Istoé. 15 de maio de 1996. Acesso em 21 de outubro de 2005. Disponível em <http://www.zaz.com.br/istoe/comport/138907.htm>.

CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellites markers. **American Journal of Human Genetics**, n.52, p.922- 927, 1993.

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

COLUMBIA ELECTRONIC ENCYCLOPEDIA, **The. Swine**. 2003. Acesso em 04 de março de 2006. Disponível em <http://reference.allrefer.com/encyclopedia/S/swine.html>

CRAIGHEAD, L.; PAETKAU, D.; REYNOLDS, H.V.; VYSE, E.R.; STROBEK, C. Microsatellite analysis of paternity and reproduction in Arctic Grizzly Bears. **Journal of Heredity**, v.86, p.255-261, 1995.

DARRÉ, R.; BERLAND, H.M.; GOUSTAT, P. Chromosomal status of free-ranging and farmed wild boar populations in France. **Reveu de Medicine – Veterinarie**, v. 3, p. 225-232, 1992.

EFRON, B. Bootstrap confidence intervals for a class of parametric problems. **Biometrika**, v. 72, p. 45-58, 1985.

EGITO, A. A; MARIANTE A. da S.; ALBUQUERQUE, M. do S. M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, p. 39-52, 2002.

ENGEL, S.R.; LINN, R.A.; TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite locos across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, v.77, n.2, p.504-518, 1996.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa - Cenargem, 1995, 220p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. 2.ed. Brasília: Embrapa - Cenargem, 1996, 220p. (Documentos,20).

FREDHOLM, M.; WINTERO, A.K. Efficient resolution parentage in dogs by amplication pf microsatellite. **Animal Genetics**, v.27, p.19-23, 1996.

GAMA L. T. Manutenção da variabilidade genética em programas de seleção. In: I Simpósio internacional de conservação de recursos genéticos (Raças nativas para o semi-árido) Recife, PE, **Anais...** p. 38-44, 2004.

GANDINI, G. C.; OLLIVIER, L.; DANELL, B; DISTL, O.; GEORGOUDIS, A.; GROENEVELD, E; MARTYNIUK, E.; VAN ARENDONK, J. A. M.; WOOLLIAMS, J. A. Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breeds in Europe. **Livestock Production Science**, v. 91, p. 173-182, 2004.

GARCIA-MORENO, J.; MATOCQ, M.D.; ROY, M.S.; GEFFEN, E.; WAYNE, R.K. Relationships and genetic purity of endangered Mexican Wolf based on analysis of microsatellite loci. **Conservation Biology**, v.2, n.10, p.376-389, 1996.

GARZA, J.C; WILLIAMSON, E.G. Detection of resuction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p. 305-318, 2001.

GERCHMAN, L. **Javalis viram praga e dão prejuízo a agricultores gaúchos**. Folha de São Paulo Online. 07 de outubro de 2003. Acesso 19 de outubro de 2005. Disponível em <http://www1.folha.uol.com.Br/folha/dinheiro/ult91u74730.shtml>

GIMENEZ D. L.; MOTA L. S. L. S.; CURI R. A.; ROSA G. J. M.; GIMENES M. A.; LOPES C. R.; LUCCA E. J. Análise cromossômica e molecular do javali europeu *Sus scrofa scrofa* e do suíno doméstico *Sus scrofa domesticus*. **Braz J vet Res anim Sci.**, v. 40, n. 2, 2003.

GIUFFRA, E.; KIJAS, J.; AMARGER, V.; CARLBORG, O.; JEON, J.; ANDERSSON, L. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, Bethesda, v. 154, p. 1785-1791, 2000.

GONELA, A. **Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada)**. Ribeirão Preto, 2003, 82f. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

GOUDET, J. **FSTAT Version 2.9.3.2 for windows: a computer program to calculate F-statistics**, 2002.

GUIMARÃES, CT. E MOREIRA, MA. **Genética molecular aplicada ao melhoramento de plantas**. In: BORÉM, A. (Ed.). Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: Editora UFV, 1999. p. 715-740.

HERSON, E. L. Insituconservation of livestock and poultry. **FAO-UNEP**. Animal Production and Health Paper, p. 99-112. 1992.

HOULDEN, B.A.; ENGLAND, P.; SHERWIN, W.B. Paternity exclusion in Koalas using hypervariable microsatellites. **Journal of Heredity**, v.87, n.2, p.149-152, 1996.

HUCKLE, J. **Invasive Alien Terrestrial Animal Species: *Sus scrofa***. In: The Invasive Alien Species Project. UK: University of Liverpool, p.1-4, 2002.

IBAMA - **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Ministério do Meio Ambiente. Núcleo de Fauna. Lista de Criadouros Comerciais de Animais Silvestres. 2004. Acesso em 03 de janeiro de 2006. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/fauna/criadouros/comerciais.pdf>

IBAMA – **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº102 de 15 de julho de 1998.

JONES, A.G.; STOCKWELL, C.A.; WALKER, D.; AVISE, J.C. The molecular basis of a microsatellite null allele from the White sands pupfish. **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 89, p. 339-365, 1998.

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. p.305-312, 2000.

LIFJELD, J.T.; SLAGSVOLD, T.; ELLEGREN, H. Experimental mate switching in Pied Flycatchers, male copulatory access and fertilization success. **Animal Behaviour**, v.53, p.1225-1232, 1997.

LITT, M.; LUTY, J.A. Hiperavariável microsatellite revealable by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v.44, p. 398-401, 1990.

MARCHIORI FILHO, M.; GIRIO, R.J.S.; MATHIAS, L.A. & BRASIL, A.T.R. Estudo Sorológico para Leptospirose em Populações de Diferentes Grupos Genéticos de Javalis (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758) dos Estados de São Paulo e Paraná. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.3, p.9-15, 2002.

MARIANO, N. **Javalis estão a 25 quilômetros da Capital**. Movimento Nacional dos Produtores (MNP). 02 de outubro de 2003. Acesso em 19 de outubro de 2005. Disponível em http://www.mnp.org.br/materiais.php?mat_id=16685

MARTÍNEZ , J. M. et al., **Inmunogenética Animal**. Editora Científico – Técnica, Ciudad de la Habana, Cuba, 245 p.,1985.

MIRANDA, L.L.; LUI, J.F. Citogenética do javali em criatórios comerciais das regiões Sul e Sudeste do Brasil. **Pesq. Agropec. Bras.** v.38, n.11, p.1289-1295, nov., 2003.

MIRANDA L. L. **Caracterização genética de javalis (*Sus scrofa scrofa*) através de marcadores microssatélites – STRs**. Riberão Preto: Universidade de São Paulo – Faculdade de medicina de Riberão Preto, 2005. 1,15,51 p. Tese (Doutorado em genética) – Faculdade de Medicina de Riberão Preto.

MOORHEAD, P. S.; HOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNDGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, New York, v. 20, p. 613-616, 1960.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a Polymerase catalysed chain reation. **Methods of Enzymology**, v.55, p.335-350, 1987

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal of Molecular Evolution**, 19, 153-170, 1983.

NOWAK, R. M. **Walker's mammals of the world**. 6th ed. Baltimore: John Hopkins University Press, v. 2, 1999.

OLLIVIER, T. L.; FOULLEY, J-L. Aggregate diversity: New approach combining within- and between-breed genetic diversity. **Livestock Production Science**, v. 95, p. 247-254, 2005.

ORIGINAL PIG, The. **The Wild Boar (*Sus scrofa*)**. 2002. Acesso em 13 de dezembro de 2005. Disponível em <http://www.theoriginalpig.com>.

OTA T. DISPAN, genetic distance and phylogenetic analysis. **Institute of Molecular Evolutionary Genetics**, The Pennsylvania State University, 1993.

PAIVA, R. **Javali, O Porco de Sangue Azul**. Revista Globo Rural. Outubro de 1996. p.38-44.

PARK, S. D. E, **Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection**. University of Dublin, 2001. [Ph.D. thesis (in prep.)].

PIHKANEN, S.; VÄINÖLÄ, R.; VARVIO, S. Characterizing dog breed differentiation with microsatellite markers. **Animal Genetics**, v.27, p.343-346, 1996.

PRADA, J.C. (ed.) **Javali Selvagem** 36. 2000. Acesso em 25 de setembro de 2005. Disponível em <http://www.javali36.com.br>.

RAYMOND, M. L. & ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280-1283, 1995.

RATIANI, D. P. On the problem of remote hybridization of wild and domestic pigs. **Soobshcheniya Akademii Nauk Gruzinskoi Ssr**, v.138, n.2, pp.377-380, 1990.

REGITANO, L.C.A. **Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim**. Piracicaba, 1996. 132p. Tese (Doutorado) – Escola Superior “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RON, M. ; BLANC, Y. ; BAND, M.; EZRA, E.; WELLER, J. I. Misidentification rate in Israeli dairy cattle population and its implications for genetic improvement. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 676-681, 1996.

ROSA, A.J.M. **Caracterização de raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares**. 1997. 114f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ROSSITIER, S.J.; JONES, G.; RANSOME, R.D.; BARRATT, E.M. Genetic variation and population structure in the endangered great horseshoes bat *Rhinolophus ferrumequinum*. **Molecular Ecology**, v.9, p.1131-1135, 2000.

ROTHSCHILD, M. F. Approaches and Challenges in Measuring Genetic Diversity in Pig. **Archivos de Zootecnia**, v. 52, p. 129-135, 2003.

ROTSCHILD, M. F. **Pig Genome Coordinator's Annual Update**. Brief summary of the pig genome coordination program for 2005. (January 14, 2006). Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/pigs/community/NRSP8/2005/CoordinatorReport.htm>> Acesso em: 20 ago. 2006.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., EHRLICH, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239, 487-491.

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

SAINO, N.; PRIMMER, C.R.; ELLEGREN, H.; MOLLER, A.P. Na experimental study of paternity and tail ornamentation in the Barn Swallow (*Hirunda rustica*). **Evolution**, v.2, n.51, p.562-570, 1997.

SAITBEKOVA, N. GAILLARD, C.; OBEXER-RUFF, G.; DOLF, G. Genetic diversity in Swiss goats breeds based on microsatellite analysis. **Animal Genetics**, v. 30, p. 36-41, 1999.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4, 406-425, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2ª Edição. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. p. 63.

SANTOS, A. S. R. A Biodiversidade da Terra e o desenvolvimento sustentável (Programa Ambiental: A ultima arca de Noé). **A Tribuna de Santos**, Santos-São Paulo, 03 out. 1994. Disponível em <http://www.aultimaarcadenoe.com/artigo41.htm>. Acesso em: 15 agos. 2005.

SARUBBI, J. **Javali**: Qualquer semelhança com o porco doméstico não é mera coincidência. Associação Paulista dos Criadores de Suínos – APCS. Dicas Técnicas. 2004. Acesso em 6 de janeiro de 2006. Disponível em <http://www.apcs.com.br/7,1,26,6837.asp>

SBALQUEIRO I. J.; FREITAS T. R. Avaliação da variabilidade genética em suínos não domesticados da Europa e da América do Sul. Plano Sul de Pesquisa e Pós-Graduação (PSPPG) - Genética e Produção Animal – CNPq. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/cnpq/psgpa/003.html>. Acesso em: 16.07.2006.

SEABRIGHT, M. The use of proteolytic enzymes for mapping of structural rearrangement in the chromosome of man. **Chromosoma**, v.36, p.204-10, 1972.

SILVA, R. W. **Avaliação da variabilidade genética em *Tayassu tajacu* (Cateto) e *Tayassu pecari* (Queixada) por meio da utilização de marcadores microssatélites**. Curitiba, 2006, 76f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal do Paraná.

SOLLERO, B. P. **Diversidade genética das raças naturalizadas de suínos no Brasil por meio de marcadores microssatélites**. Brasília, 2006. 89f. Dissertação (Mestrado)- Universidade de Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

SPRITZE, A., EGITO, A.A. de, MARIANTE, A. da S., McMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina crioula Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesc. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 38, n. 10, p. 1157-1164. 2003.

STEIERNAGEL, L. Carne de Javali na Mira do Gaúcho: Criação do Animal Exótico Atrai Investidores que Apostam no Potencial Econômico deste Curioso Negócio. Caderno Rural. **Correio do Povo** (Porto Alegre), v. 103, n.26, p.14, 1997

STUDART, M.T. **Caracterização molecular de bovinos da raça simental com base em microssatélites e RFLPs**. 2001. 151f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Paulo, UFSCar, São Carlos.

TAUZ, D. Hypervariability of simple sequence as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.**, v.17, p.6463-6471, 1989.

TELO DA GAMA, L. Atividades de conservação e utilização sustentável dos recursos genéticos animais em Portugal. **Archivos de Zootecnia**, v. 5, p. 29-31, 2002.

TROSHINA, A.I. & TIKHONOV, V.N. Cytogenetics of Five Generations of Hybrids Between Wild and Domestic Pigs Differing in Karyotype Morphology. **Genetica**, v. 52-53, p. 317-326, 1980.

VIARD, F.; BREMOND, P.; LABBO, R.; JUSTY, F.; DELAY, B.; JARNE, P. Microsatellite and the genetics of highly selfing populations in the Freshwater Snail *Bulinus truncatus*. **Genetics**, v.142, p.1237-1247, 1996.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F – statistics for the analysis of the population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.**, v. 15, p. 323-354, 1951.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. – The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theor. Appl. Genetic**, v.80, p.631-634, 1990.