UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na
caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e
Tayassu pecari (queixada)**

ADRIANA GONELA

Orientadora: Dra. Eucleia Primo Betioli Contel

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área de concentração Genética.

Ribeirão Preto

2003

FICHA CATALOGRÁFICA

Adriana Gonela

Aplicação de marcadores microssatélites de *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de populações de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada).

82p.: il; 3,0 cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - 2003

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Dra. Eucleia Primo Betioli Contel

1. microssatélites 2. amplificação heteróloga 3. queixada 4. porco-Monteiro

capa: Pantanal Matogrossense

À minha querida mãe

Nair do Nascimento Gonela,

pelo amor, carinho e incentivo...minha eterna gratidão

Dedico

HOMENAGEM ESPECIAL

À

Querida professora **Dra. Eucleia Primo Betioli Contel**, pela paciência, amizade,
estímulo e segura orientação na elaboração deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

- À **Deus**, sempre presente em nossas vidas nos ajudando sem que percebamos;
- À Universidade de São Paulo;
- À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto;
- À CAPES, pelo auxílio financeiro;
- Aos professores do Departamento de Genética;
- Ao **prof. Dr. Moacyr Mestriner**, pela amizade;
- À **Dra. Maria Nazaré Klautau Guimarães Grisólia**, UnB, pelas amostras de queixada;
- À **Dra. Maria Aparecida C. Lara**, IZ, Nova Odessa, pelas amostras de porco-Monteiro;
- Às queridas funcionárias **Maria Aparecida Elias, Susie Nalon, Cleuza Mazzucato** por estarem sempre dispostas a nos ajudar;
- À querida amiga **Maria do Carmo**, pela amizade sincera, carinho, pelas dicas e orientação prática pois sem elas, com certeza, este trabalho demoraria muito mais tempo para ser executado;
- À minha queridíssima **Elisabete Maria da Silveira Barreto Beira**, uma grande amiga que conquistei, nunca esquecerei seu alto astral, seu carinho, seus conselhos sempre muito inteligentes, e sua disposição e rapidez na solução dos problemas;
- Aos amigos do laboratório, **Regina, Lenicy, Eddy, Eliana, Fernanda, Lilian, Rogério, Marcos Miretti, Malu, Breno e José Eduardo**, pela força, carinho, amizade, pelas horas de descontração e divertimento e por terem agüentado meu mau humor nos momentos finais, sempre com um sorriso e uma palavra amiga....muito obrigada;
- Aos amigos do Bloco B: **Claudia, Sandra, Ana Lúcia, Edna, Celso, Yara, Marcelo, Talita, Ana Silvia, Ricardo, Renata Simões, Renata Camacho, Jeanne, Luzitano, Rosana, Mônica, Lenize, Juliana e Débora**, pela amizade sincera e momentos agradáveis que passamos nestes quatro anos;
- À **Rubiani Pagotto**, pela amizade e incentivo;
- e à todos os amigos que conquistei nestes quatro anos de doutorado que, direta ou indiretamente me ajudaram seja profissionalmente ou na vida pessoal.

MEU MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	01
1.1 Espécie <i>Sus scrofa</i> sp (porco-Monteiro)	03
1.2 Espécie <i>Tayassu pecari</i> (Queixada)	05
1.3 Uso de marcadores moleculares na análise de populações	10
1.4 Microsatélites	11
CAPÍTULO II - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	15
CAPÍTULO III - AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE PORCO DOMÉSTICO EM QUEIXADA	18
Resumo	19
Abstract	20
1. Introdução	21
2. Material e métodos	23
3. Resultados	25
4. Discussão	26
5. Conclusão	28
6. Agradecimentos	29
7. Referências	30

CAPÍTULO IV - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PORCO-MONTEIRO (<i>Sus scrofa</i> sp) E QUEIXADA (<i>Tayassu pecari</i>) ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES	40
Resumo	41
Abstract	42
1. Introdução	43
2. Material e métodos	45
3. Resultados	48
4. Discussão	52
5. Agradecimentos	55
6. Referências	56
CAPÍTULO V - COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES	65
CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO VII - ANEXOS ..	72
1. Protocolo para extração de DNA (Higuchi, 1989)	73
2. Quantificação do DNA	74
3. Eletroforese	74
4. Preparo das amostras para aplicação em gel de poliacrilamida desnaturante	76
5. Coloração com solução de nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994)	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - <i>Sus scrofa</i> sp (porco-Monteiro).....	03
Figura 2 - <i>Tayassu pecari</i> (Queixada ou pecari do lábio branco)	05
Figura 3 - Distribuição geográfica das subespécies de <i>Tayassu pecari</i> no Novo Mundo	08

CAPÍTULO III

Figura 1 - Localização da Ilha Beira Rio (52°27'48", 48W 52°24'01", 28W; 22°05'18", 09S 22°09'16", 63S), rio Paraná, extremo oeste do estado de São Paulo - Brasil, onde foram coletadas as amostras de <i>Tayassu pecari</i>	38
---	----

Figura 2 - Região de amplificação observada nos locos microssatélites analisados em <i>Tayassu pecari</i> com iniciadores de <i>Sus scrofa domestica</i> . O polimorfismo foi observado em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante e corado com nitrato de prata. Foi utilizado um marcador de peso molecular 25 bp. Loco ACTG2 foi observada amplificação em <i>S. s. domestica</i> (A-B) em 137 bp, em <i>T. pecari</i> (C-J), 122-137 bp. Loco ALOX12A em <i>S. s. domestica</i> (A-D), 179-184 bp e <i>T. pecari</i> (E-I), 149-156bp. Loco CGA, em <i>S. s. domestica</i> (A-D), 334-394 bp, e em <i>T. pecari</i> (E-H), 160-164 bp. Loco IGF1 em <i>S. s. domestica</i> (A-D), 235-239 bp, e <i>T. pecari</i> (E-H), 247-252 bp. Loco SW444 em <i>S. s. domestica</i> (A-D), 102-128 bp, <i>T. pecari</i> (E-H), 99-126 bp. Loco TNFB em <i>S. s. domestica</i> (A-D), 175-180 bp, e <i>T. pecari</i> (E-G), 148 bp	39
---	----

CAPÍTULO IV

Figura 1 - Localização das duas regiões de coleta. Sub-região de Nhecolândia (Pantanal Matogrossense), onde foram coletadas as amostras de <i>Sus scrofa</i> sp e Ilha Beira Rio (extremo oeste do estado de São Paulo), onde foram coletadas as amostras de <i>Tayassu pecari</i>	64
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Lista dos pares de iniciadores de <i>Sus scrofa domestica</i> testados em <i>Tayassu pecari</i> para verificação da amplificação heteróloga	35
Tabela 2 - Condições padronizadas da PCR para amplificação dos locos microssatélites em <i>Tayassu pecari</i>	36
Tabela 3 - Comparação entre temperatura de pareamento, amplitude de tamanho das bandas e número de alelos em <i>Sus scrofa domestica</i> (literatura) e <i>Tayassu pecari</i> nos seis locos microssatélites analisados	37

CAPÍTULO IV

Tabela 1 - Características dos locos microssatélites de <i>Sus scrofa domestica</i> analisados em <i>Sus scrofa</i> sp e <i>Tayassu pecari</i>	60
Tabela 2 - Frequência alélica, frequência de alelos nulos (θ), heterozigose observada ($\overline{H}_o$), heterozigose esperada (H_e), conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) e Fis, nos seis locos microssatélites analisados em <i>T. pecari</i> e <i>S. scrofa</i> sp	61
Tabela 3 - Número médio de alelos por loco (N_a), proporção de locos polimórficos (P), heterozigose média observada ($\overline{H}_o$), heterozigose média esperada (H_e), Fis e índice de fixação de Wright (F) em <i>Tayassu pecari</i> e <i>Sus scrofa</i> sp	63

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A variabilidade genética existente dentro de uma população é condição fundamental para que haja evolução adaptativa. Para se estimar esta variabilidade os pesquisadores utilizam-se de métodos de detecção e de análise da diversidade genética, de análises estatísticas da variação quantitativa e ensaios bioquímicos e moleculares.

Atualmente têm-se utilizado a combinação de métodos tradicionais da genética com as novas técnicas da biologia molecular para se caracterizar geneticamente populações de animais domésticos e selvagens através da determinação de suas frequências alélicas em locos marcadores, permitindo gerar uma grande quantidade de informações sobre a diversidade genética e relacionamentos filogenéticos no material genético a ser utilizado (Torggler et al., 1995; Ferreira e Grattapaglia, 1996).

Dentre as técnicas mais utilizadas atualmente para a análise de populações, encontramos os microssatélites, que são seqüências moderadamente repetitivas dispersas pelo genoma de eucariotos, formadas de repetições em tandem, altamente polimórficos, codominantes e analisados pela técnica da PCR.

Os microssatélites são considerados marcadores ideais e sua utilização na análise de populações naturais fornece dados importantes sobre a diversidade genética e estrutura dessas populações, proporcionando dessa forma uma base para o entendimento das adaptações ambientais e a estrutura teórica para o melhoramento genético.

1.1 Espécie *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro)

Figura 1 *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro)

Os suínos são membros da ordem *Artiodactyla*, subordem *Suiformes*, e família *Suidae*.

Entre os suínos encontramos uma espécie exótica feral, o porco-Monteiro (*Sus scrofa* sp) ($2n = 38$), que é um animal descendente dos porcos domésticos trazidos para o Brasil pelos colonizadores que fundaram Albuquerque (atual Corumbá), em 1778. Estes espécimes são encontrados na maior parte do território brasileiro e principalmente em abundância na região do Pantanal.

No Pantanal, estes animais escaparam ao manejo tradicional exercido pelo homem e encontraram condições propícias para se reproduzirem, transformando-se em animais selvagens cuja carne é altamente apreciada na região. Num ambiente diverso do original, o

porco-Monteiro foi se modificando ao longo de mais de um século, os dentes tornaram-se mais fortes e atualmente as presas tendem a aparecer fora da boca.

Fisicamente os porcos-monteiros assemelham-se aos javalis, ou seja, apresentam perfil afilado, membros fortes e ágeis e focinho longo com no mínimo 22 centímetros, conformação do corpo e cabeça em forma de cunha, coloração preta-acinzentada ou marrom sem manchas claras, orelhas pequenas e eretas e cauda reta e tempo de vida de aproximadamente 20 anos. As cerdas são bem assentadas e de médio comprimento, eriçáveis na parte superior do corpo ao longo do pescoço e linha dorso-lombar. O perfil craniano é côncavo e ultracôncavo e o pescoço é curto e musculoso. Apresenta comportamento agressivo quando localizado em seu habitat natural, sendo encontrado sempre em grupos (Herrera, 1995).

O ciclo reprodutivo do porco-Monteiro ocorre a cada 21 dias com um período de gestação que dura de 110 a 121 dias, nascendo de quatro a seis filhotes (Herrera, 1995).

Os porcos-Monteiro são geralmente onívoros e normalmente encontrados em florestas. Alimentam-se de folhas, sementes, raízes, frutos, insetos, ovos de pássaros, lagartos e pequenos mamíferos. São mais ativos à noite e apresentam um olfato extremamente sensível facilitando a localização de alimentos escondidos sob a vegetação, utilizando o focinho e as presas para cavar e cortar raízes (Oliver, 1993).

No pantanal matogrossense o porco-Monteiro tem disputado o mesmo nicho ecológico onde vivem a queixada (*Tayassu pecari*) e o cateto (*Tayassu tajacu*), animais cada vez mais raros e que hoje são preservados. Por este motivo, a caça deste porco exótico é permitida e bastante freqüente.

Dentre os animais exóticos, o porco-Monteiro possui uma carne fácil de preparar, sendo extremamente leve e saborosa, mas sendo conhecida somente nas regiões

circunvizinhas ao Pantanal. Análises que avaliaram a palatabilidade da carne determinaram que ela contém menos gordura e pouco colesterol, diferenciando-a dos porcos domésticos e equiparando-a com a carne de javali. Porém, além destas análises ainda não foram realizadas análises genéticas de populações desta espécie.

Atualmente, existem trabalhos de cruzamentos do porco-Monteiro com o javali do Pantanal, cujo produto denomina-se javonteiro, animais que já possuem mercado próprio, sendo na sua maioria restaurantes especializados em caça. O uso potencial destes animais em programas de cruzamentos com raças exóticas ainda é incerto e será objetivo de estudos futuros, já que constituem mais uma alternativa de produção para o Pantanal.

1.2 Espécie *Tayassu pecari* (Queixada)

Figura 2 *Tayassu pecari* (Queixada ou pecari do lábio branco)

Assim como os suínos, os taiassuídeos são membros da ordem *Artiodactyla*, subordem *Suiformes*, e divergiram do seu ancestral comum no início do Oligoceno, cerca de 37 milhões de anos atrás (Theimer e Keim, 1998). Por apresentarem importantes diferenças anatômicas e genéticas foram separados em duas famílias distintas, os taiassuídeos na família *Tayassuidae* e os suínos na família *Suidae*.

Os taiassuídeos apresentam os caninos superiores pequenos voltados para baixo, três dedos e estômago com três câmaras. Originalmente são restritos ao Novo Mundo (Oliver, 1993).

Geralmente onívoros e normalmente encontrados em florestas, alimentam-se de

folhas, sementes, raízes, frutos, insetos, ovos de pássaros, lagartos e pequenos mamíferos. São mais ativos à noite e apresentam também um olfato extremamente sensível facilitando a localização de alimentos escondidos sob a vegetação, utilizando o focinho e as presas para cavar e cortar raízes (Oliver, 1993).

Entre os taiassuídeos encontramos a queixada (*Tayassu pecari*), uma espécie difundida desde o sul do México (25°N) até o norte da Argentina e sul do Brasil (35°S) (Figura 3) (Zijlstra et al., 1997). No entanto, a distribuição dessa espécie tem sido reduzida devido ao desmatamento, pressão de caça e doenças (Oliver, 1993).

Fonte: Oliver, 1993

Figura 3 Distribuição geográfica das subespécies de *Tayassu pecari* no Novo Mundo.

O *T. pecari* É considerado o maior e mais agressivo dos porcos selvagens sul-americanos, chegando a atingir 1,10 m de comprimento e possuindo um número total de cromossomos $2n = 26$. Apresenta pelagem das costas muito longa e com uma coloração negro-pardacenta, possuindo uma grande quantidade de pêlos brancos na mandíbula e focinho, característica que lhe confere o apelido de pecari do lábio branco e que o diferencia de outro pecari também comum na América do Sul, o cateto (*Tayassu tajacu*). Outra característica é a presença de glândulas nas costas que servem para identificar cada indivíduo e marcar seu território (Giannoni et al., 1982; Oliver, 1993; Bodmer et al., 1997).

Vive em grandes grupos, geralmente de 50 a 100 indivíduos, compostos por fêmeas e machos de todas as idades e em uma grande variedade de habitats, desde regiões de clima árido a florestas tropicais úmidas (seu habitat preferido), especialmente em áreas bem conservadas onde atinge sua grande abundância pois sua tolerância a áreas desmatadas parece ser mínima, sendo facilmente caçado. Em florestas tropicais úmidas são predominantemente frugívoros (Oliver, 1993).

O período de gestação de uma fêmea dura de 140 a 148 dias, nascendo de 1 a 4 filhotes, e o intervalo entre as gestações é de 250 dias (Gottdenker e Bodmer, 1998).

O *T. pecari* apresenta algumas características comportamentais muito parecidas às do *T. tajacu* mas a forma como este repertório é revelado difere muito. Pode-se diferenciar a queixada do cateto por seu comportamento mais expansivo (em intensidade de exibição), geralmente executado por todos os indivíduos, pela necessidade de marcação territorial e também pela grande agressividade. Quando acuado, bate forte o queixo e é valentíssimo (Dubost, 1997).

O *T. pecari* tem um papel muito importante no desenvolvimento econômico e cultural de muitas populações indígenas nos neotrópicos e constituem uma importante fonte

de alimento e renda para diversas tribos e populações rurais (Oliver, 1993).

Dentre as espécies de mamíferos encontradas em florestas neotropicais, o *T. pecari*, juntamente com o *T. tajacu* são candidatas ao aproveitamento sustentável, mas uma das barreiras encontrada é a pouca informação sobre o comportamento, ecologia, habitat e biologia da população. Outro fator é a falta de dados sobre a genética populacional. Como a espécie necessita de uma vasta área para sobreviver (100 km² para um grupo de aproximadamente 100 animais) provavelmente ocorram problemas de consangüinidade (Fragoso, 1998).

O *T. pecari* está entre os animais em perigo de extinção devido à caça extensiva, problemas de saúde (especialmente doenças infecciosas) e desaparecimento das florestas onde vivem (Oliver, 1993).

A conservação do *T. pecari* e dos taiassuídeos em geral deve ser considerada prioritária pois, a redução dos níveis populacionais pode resultar em uma perda da fonte de proteína para comunidades rurais e a um desequilíbrio sobre o ecossistema das florestas. Para tanto, é necessário uma caracterização genética das populações, o que permitirá gerar informações sobre a diversidade genética.

1.3 Uso de marcadores moleculares na análise de populações

A “impressão digital genética” de cada indivíduo é determinada por uma sequência característica de nucleotídeos que compõem o seu DNA. Diferenças entre estas sequências podem ser determinadas através de polimorfismos de fragmentos de DNA ou polimorfismos isoenzimáticos, revelando um padrão único para cada indivíduo.

Com a implementação das técnicas bioquímicas e moleculares para análise de

polimorfismos de DNA e isoenzimas houve uma rápida proliferação do uso de marcadores moleculares no estudo dos aspectos básicos da genética, sendo sugeridas várias aplicações tais como, uso imediato em introgressão gênica, o rápido desenvolvimento e saturação de mapas genéticos com múltiplas aplicações em genética e melhoramento, ou a associação de marcadores com regiões do genoma que controlam caracteres quantitativos (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

As análises de DNA em estudos de população têm várias vantagens significativas: (1) o genótipo é melhor analisado diretamente; (2) uma ou mais seqüências apropriadas a uma questão específica podem ser selecionadas; (3) muitos métodos são gerais para algum tipo de DNA; (4) o DNA pode ser extraído de pequenas quantidades de tecido e é relativamente estável.

Os sistemas de marcadores normalmente utilizados na análise populacional são polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), DNA mitocondrial, DNAs polimórficos amplificados ao acaso (RAPDs) e microssatélites (SSR). Logo que se obtem uma quantidade adequada de marcadores genéticos para uma determinada espécie pode-se estimar com aspectos da estrutura populacional tais como subdivisões de populações, dispersão, fluxo gênico, tamanho populacional efetivo, estratégia de melhoramento e história evolutiva (Engel et al., 1996; Roed, 1998).

1.4 Microssatélites

Estudos realizados em genomas de eucariotos demonstraram uma alta freqüência de classes de seqüências simples repetidas (SSR) que foram denominadas de microssatélites (Chambers e MacAvoy, 2000; Balloux e Lugon-Moulin, 2002), consistindo de pequenas

seqüências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidos em tandem, e apresentando uma alta taxa de mutação, variando de 10^{-6} a 10^{-2} por geração, sendo significativamente mais altas que as taxas de substituição de bases (10^{-9} a 10^{-10}). Estes locos altamente polimórficos, amplificados via PCR (Reação da Polimerase em Cadeia) também foram denominados “STMS – Sítios de Microssatélites Marcados por Seqüências” e constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares disponíveis hoje, podendo ser rapidamente isolados em bibliotecas genômicas (Ferreira e Grattapaglia, 1996).

As elevadas taxas de mutação são causadas primariamente por alterações no número das unidades de repetição, sendo que a maioria dessas alterações resulta de mudanças no número integral de cópias das unidades de repetição (Eisen, 1999).

Existem dois modelos que podem explicar as elevadas taxas de mutação nos microssatélites: *crossing-over* desigual entre as moléculas de DNA, resultando da recombinação entre cromossomos homólogos que não foram alinhados corretamente e o mecanismo do *slippage* durante a replicação do DNA, que é o mais aceito atualmente, ocorrendo em regiões do DNA que contêm seqüências curtas repetidas em tandem, ocasionado por uma elevada taxa de erros de pareamento decorrentes do escorregamento da fita durante a replicação do DNA (Eisen, 1999).

Os microssatélites são geralmente mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeos repetidos em um loco simples. Muitos locos de microssatélite estão localizados entre genes ou dentro de íntrons, sendo extremamente abundantes (Engel et al., 1996). Entretanto, apesar de muito raros nas regiões codificadoras, no genoma humano são encontrados alguns tipos de repetições trinucleotídeas nestas regiões, sendo a causa de algumas doenças (Hancock, 1999).

Devido a esta distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o que os torna um marcador

seletivamente neutro muito útil para estudos da genética de populações naturais.

Apesar dos microssatélites ocorrerem preferencialmente nas regiões não codificadoras, alguns estudos demonstram que eles podem apresentar papel funcional com elementos codificares ou reguladores, mostrando que a utilidade dos microssatélites vai além do papel de marcadores para estudos de genética de populações, relações evolutivas e mapeamento gênico. Deste modo, um loco poderia mostrar um desvio da neutralidade se o microssatélite estivesse ligado a uma região genômica a qual é alvo da seleção natural (Machado, 2003).

A fonte de variação dos microssatélites é o número de repetições dentro de um bloco de repetições em tandem. Este número pode variar grandemente e, conseqüentemente, alguns locos podem apresentar uma maior quantidade de alelos (Engel et al., 1996).

Por serem considerados marcadores ideais (altamente polimórficos, codominantes, abundantes no genoma e analisados pela técnica da PCR), os microssatélites são indicados para aplicações forenses, estudos genéticos de populações, mapeamento genético e físico de genomas e, conseqüentemente, têm se tornado o suporte principal de análises genômicas em diferentes organismos como em seres humanos (Chambers e MacAvoy, 2000; Balloux e Lugon-Moulin, 2002), bovinos e caprinos (Moore et al., 1991), suínos (Ellegren et al., 1994) e roedores (Lima-Rosa et al., 2000), entre outros.

Devido a sua expressão codominante e ao multialelismo, os microssatélites são os marcadores que apresentam o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e, por isso, qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento, não sendo mais necessário fazer a escolha da população com base na maximização da distância genética, e sim visando a população mais informativa do ponto de vista das características biológicas ou econômicas de interesse (Ferreira e

Grattapaglia, 1996).

A descoberta de que locos de microssatélites dinucleotídeos são conservados através dos genomas de mamíferos (Moore et al., 1991) indicou que iniciadores desenvolvidos para amplificar repetições em uma espécie podem amplificar locos em outras espécies. A utilização de iniciadores heterólogos (amplificam dentro de um mesmo gênero, família ou ordem) pode eliminar tempo e despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para cada espécie de interesse tais como, construção de biblioteca genômica de DNA, seqüenciamento do DNA e determinação dos iniciadores (Engel et al., 1996).

Dentro da ordem *Artiodactyla* existem exemplos da utilização de iniciadores heterólogos amplificando em outros artiodáctilos, assim como em outras taxa como primatas (Coote e Bruford, 1996) e tartarugas (Fitzsimmons et al., 1995).

Portanto, os marcadores moleculares, mais recentemente os microssatélites, têm se tornado ferramentas fundamentais na construção de mapas genéticos de genomas eucariotos, e têm permitido a clonagem de genes que podem ser utilizados no melhoramento genético via transformação gênica.

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos:

- (a) verificar a possibilidade da utilização de iniciadores microssatélites desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (porcos domésticos) na amplificação de DNA microssatélite em *Tayassu pecari* (queixada);
- (b) utilizar estes mesmos iniciadores na análise de populações naturais de uma espécie selvagem de *Sus scrofa* sp (porco-Monteiro) e *Tayassu pecari* (queixada).

A apresentação da tese em capítulos organizados na forma de manuscritos deveu-se a dois motivos: a) abordagens teóricas distintas referentes à organização e interpretação dos dados; b) trabalhar com os resultados já em formato de publicação em revista especializada. Neste sentido, os resultados apresentados no Capítulo III foram submetidos à *Pesquisa Agropecuária Brasileira*.

O Capítulo III é resultante de toda a padronização realizada com os iniciadores de porcos domésticos para que estes amplificassem em queixada. Inicialmente foram utilizadas as condições padronizadas para o genoma do porco doméstico; a partir destes dados, que envolviam desde as condições ideais da PCR até os programas utilizados, foram realizados os ajustes para verificar se, apesar do tempo de divergência existente entre as duas espécies (37 Myr), era possível a utilização dos mesmos iniciadores em queixada, o que eliminaria tempo e despesas envolvidos no isolamento de marcadores específicos. Existem na literatura muitos trabalhos sobre este tópico, principalmente com macacos e roedores, entretanto, com queixada não existe nenhum.

No Capítulo IV estão descritas as análises realizadas com estes iniciadores, em populações de porco-Monteiro e queixada. O porco-Monteiro é outra espécie de porco

selvagem que tem despertado muito o interesse de pesquisadores e criadores. Assim como em queixada, não existem trabalhos que avaliando suas características genéticas.

CAPÍTULO III

AMPLIFICAÇÃO HETERÓLOGA DE LOCOS MICROSSATÉLITES DE PORCO DOMÉSTICO EM QUEIXADA

Resumo

Tayassu pecari está difundida em sua maior parte nas Américas Central e do Sul, distribuindo-se desde o sul do México até o norte da Argentina e sul do Brasil. É uma espécie adequada para o aproveitamento sustentável principalmente pela carne, que é consumida pelas pessoas que vivem próximo a seu habitat, que a consideram muito saborosa. Considerando aspectos da conservação da diversidade biológica x uso sustentável desses componentes, e considerando também a possibilidade de uso comercial desta espécie, é importante conhecer sua estrutura genética assim como a variação geográfica, visando fornecer um modelo para sua futura exploração. Este artigo investigou seis SSR (seqüências simples repetidas em tandem; ACTG2; ALOX12A; CGA; IGF1; SW444; TNFB) desenvolvidos para *Sus s. domestica* com o objetivo de examinar se esses iniciadores microssatélites podem ser usados para amplificar marcadores microssatélites em queixada. Quatro deles (ACTG2, CGA, IGF1 e SW444) foram polimórficos e foram usados para estimar o número de alelos em uma população coletada no estado de São Paulo.

Termos para indexação: Artiodactyla, *Tayassuidae*, *Tayassu pecari*, iniciador heterólogo, porco selvagem.

Heterologous amplification of microsatellite loci from swine in white-lipped peccary**Abstract**

Tayassu pecari is confined to the Neotropical Region, from southern Mexico in the north, through Central America and South America, as far as in northern Argentina. It is a species suitable for sustainable development for meat, which is consumed by people living in the neighborhood of its habitat, and is also considered very tasteful. Regarding aspects of conservation of biological diversity x sustainable use of its components, and considering the possibility of commercial use of this species, it is important to know about the genetics and geographical variation to enable a proper model for its future exploitation. This paper investigated six STRs (short tandem repeats; ACTG2; ALOX12A; CGA; IGF1; SW444; TNFB) developed for *Sus scrofa domestica* with the aim to examine whether these microsatellite primers could be used to amplify microsatellite markers in peccaries. Four of them (ACTG2, CGA, IGF1 and SW444) gave polymorphic markers and were used to estimate the number of alleles in a population of *T. pecari*.

Index terms: Artiodactyla, *Tayassuidae*, *Tayassu pecari*, heterologous primers, wild pig.

1. Introdução

Tayassu pecari (queixada ou pecari do lábio branco) é uma espécie difundida em sua maior parte nas Américas Central e do Sul, distribuindo-se desde o sul do México até o norte da Argentina e sul do Brasil, sendo considerado o maior e mais agressivo dos porcos selvagens, chegando a atingir 1,10 m de comprimento. É muito importante para a subsistência de populações rurais e indígenas, sendo utilizado como fonte de alimento e fornecimento de pele, além de atuar na disseminação de sementes, principalmente palmeiras (Oliver, 1993).

Juntamente com *Tayassu tajacu* (cateto ou pecari de coleira) *T. pecari* é uma espécie adequada para o aproveitamento sustentável, e vem despertando nos últimos anos o interesse de muitos criadores, devido à crescente demanda mundial por carnes de animais selvagens e exóticos, sendo que no Brasil já existem cerca de 200 criadores.

Entretanto, existe falta de informações sobre a genética populacional. Como a espécie necessita de uma vasta área para sobreviver (100 km² para um grupo de aproximadamente 100 animais) provavelmente ocorram problemas de consangüinidade.

O *T. pecari* está entre os animais sob perigo de extinção devido à caça extensiva, problemas de saúde (especialmente doenças infecciosas) e desaparecimento das florestas onde vivem (Bodmer et al., 1997). A conservação do *T. pecari* e dos taiassuídeos em geral deve ser considerada prioritária pois a redução dos níveis populacionais pode resultar em uma perda de fonte de proteína para comunidades rurais e em um desequilíbrio sobre o ecossistema das florestas. Para tanto, é necessário uma caracterização genética das populações, o que permitirá gerar informações sobre a diversidade genética, que poderá ser utilizada não só para fins de conservação como também para o melhoramento genético.

Entre todos os marcadores disponíveis para a análise da estrutura genética de uma população, os microssatélites (SSR - seqüências simples repetidas em tandem) são

considerados marcadores ideais por serem altamente polimórficos, codominantes, abundantes no genoma e analisados pela técnica da PCR. Conseqüentemente, têm se tornado o suporte principal para análises genômicas em diferentes organismos tais como seres humanos (Litt & Luty, 1989), suínos e gado (Ellegren et al., 1994; Ellegren et al., 1997), entre outros.

A fonte de variação dos microssatélites é o número de repetições dentro de um bloco de repetições em tandem (Weber & May, 1989). Este número pode variar grandemente e, conseqüentemente, alguns locos podem apresentar uma maior quantidade de alelos (Engel et al., 1996).

Entretanto, esta técnica apresenta uma desvantagem, que é a necessidade do desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos, mas este problema está sendo solucionado com a descoberta de que locos microssatélites são conservados através dos genomas de mamíferos (Moore et al., 1991) indicando que iniciadores desenvolvidos para amplificar repetições em uma espécie podem amplificar locos em outras espécies, eliminando tempo e despesas envolvidos no isolamento de marcadores microssatélites para cada espécie de interesse (Engel et al., 1996). A hibridação heteróloga já foi observada entre espécies de roedores (Kondo et al., 1993), em diversos gêneros e famílias de artiodáctilos (Barker et al., 1997; Ellegren et al., 1997; Flagstad et al., 1999), e principalmente entre macacos do Velho Mundo e humanos (Coote & Bruford, 1996).

Tendo por base estas informações e devido à falta de informações sobre a genética populacional do *T. pecari*, a presente pesquisa teve como objetivo determinar a viabilidade da utilização de iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (suínos domésticos) na amplificação de DNA microssatélite em *T. pecari* e posteriormente a utilização destas informações para a análise de populações naturais.

2. Material e Métodos

Os animais foram capturados em 1998, com o término das obras da Usina Hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta, na ilha Beira Rio, no rio Paraná, extremo oeste do estado de São Paulo (Figura 1). Durante a captura foram coletadas amostras de sangue de cada indivíduo, perfazendo um total de 84, que foram processadas, o anel leucocitário retirado e armazenado a -12°C para análises posteriores.

O DNA foi extraído de acordo com protocolo de Higuchi (1989). Seis pares de iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (Tabela 1), escolhidos ao acaso no genoma (www.genome.iastate.edu/pig), foram testados para verificar a possibilidade de amplificação heteróloga de locos microssatélites em *T. pecari*. Deve-se ressaltar que dos seis pares testados, somente um (SW444) não está associado a produto gênico conhecido, enquanto os outros cinco estão associados a uma actina da musculatura lisa (ACTG2), a uma lipoxigenase do ácido araquidônico (ALOX12A), a um hormônio glicoprotéico hipofisário (CGA), a um fator de crescimento (IGF1) e a um fator de necrose tumoral (TNFB).

As condições da PCR, ou seja, temperatura de pareamento, concentrações de cloreto de magnésio, dNTPs e *Taq* DNA polimerase, assim como os programas utilizados foram padronizados para cada iniciador analisado. As amplificações ocorreram em um termociclador (*PCR Machine Robocycler, Stratagene*).

Os produtos de amplificação foram separados sob condições não desnaturantes, em gel contendo 10% de poliacrilamida, glicerol e 1X TBE por cerca de 2 horas a 200 V. Os fragmentos obtidos foram detectados em coloração com nitrato de prata segundo protocolo de Sanguinetti et al. (1994). A amplitude de variação do tamanho de cada produto de PCR de cada loco foi estimada através de marcador de peso molecular 25 bp (*Life Technologies-Gibco BRL*), e posteriormente analisada através do programa de documentação de foto Kodak 1K

(*Scientific Imaging Systems*) versão 3.5.4.

As amplificações foram consideradas positivas quando o gel apresentava uma ou duas bandas, com tamanhos (bp) relacionados à espécie *Sus scrofa domestica*, e foram consideradas negativas quando os géis apresentavam somente bandas da espécie original. Quando três ou mais bandas secundárias de diferentes tamanhos apareciam no gel, eram consideradas artefatos (Primmer et al., 1996).

Por se tratar de amplificação heteróloga, tomou-se o cuidado de repetir no mínimo três vezes todos os passos envolvidos na amplificação e também utilizou-se sempre amostras de *S. scrofa domestica* em todos os géis analisados.

3. Resultados

Após vários testes foram padronizadas as condições ideais e os programas específicos para que ocorresse a amplificação heteróloga dos iniciadores analisados em *T. pecari* (Tabela 2).

Os seis locos microssatélites testados amplificaram (100% de sucesso) e, pela análise em gel de poliacrilamida não desnaturante, utilizando-se marcador de peso molecular 25 bp foram determinadas as regiões de amplificação (bp) para os seis locos analisados em *T. pecari* (Figura 2). Em seguida esses resultados foram comparados aos de *S. scrofa domestica* obtidos na literatura (Tabela 3).

Todos os iniciadores apresentaram produtos amplificados bem claros e definidos em todos os indivíduos testados (N=84). No total, foram encontradas 21 bandas diferentes, variando de 99 bp (SW444) a 252 bp (IGF1). Uma característica interessante observada foi que em todos os locos testados em *T. pecari* encontrou-se uma amplitude (bp) inferior à da espécie de origem (Tabela 3), como por exemplo, no loco ACTG2, no qual a amplitude foi de 33 bp na espécie de origem e 13 bp em *T. pecari*.

Para que ocorresse a amplificação houve a necessidade de se reduzir as temperaturas de pareamento tornando-as mais apropriadas para a espécie em estudo. Maiores reduções foram necessárias nos locos ALOX12A com uma redução de 23°C e CGA, com uma diminuição de 15°C e as menores nos locos SW444 e TNFB com uma redução de 5°C cada. Já para o loco IGF1 não houve necessidade de redução da temperatura.

Quanto às amplitudes de tamanho, houve uma coincidência entre a espécie de origem e o *T. pecari* nos locos ACTG2, ALOX12A e SW444. Nos locos CGA e TNFB houve uma redução de 162 bp e 26 bp, respectivamente, entre *T. pecari* e *S. scrofa*, e no loco IGF1 houve um aumento de 10 bp.

4. Discussão

Desde a descoberta de Moore et al. (1991) sobre a existência de níveis moderados de conservação em locos microsatélites dinucleotídeos em grupos de mamíferos pertencentes às ordens Artiodactyla e Primata, e que iniciadores desenvolvidos para amplificar seqüências em um táxon são freqüentemente conservados em espécies mais relacionadas evolutivamente (como por exemplo cabra e bovino; representando um tempo de divergência de 15-25 Myr), do que em espécies evolutivamente mais distantes (como bovino e homem, 80-100 Myr), várias pesquisas vêm sendo realizadas visando repetir estas observações em outras espécies e ordens (Stallings et al., 1991; Coote & Bruford, 1996; Lima-Rosa et al., 2000; Gongora et al., 2002).

Foi constatado que pode-se conseguir uma eficiência superior a 50% em espécies que apresentam um tempo de divergência entre 15-25 Myr, comparada a 6,2% em um tempo de divergência entre 80-100 Myr, mas a eficiência na utilização está mais fortemente relacionada à taxa de evolução molecular do que ao tempo de divergência. Isto foi observado entre espécies de tartarugas que apresentam um tempo de divergência de aproximadamente 300 Myr, mas uma taxa de evolução molecular muito baixa, o que proporcionou uma alta eficiência na utilização de iniciadores heterólogos (Fitzsimmons et al., 1995).

Provavelmente o tempo de divergência entre *T. pecari* e *S. scrofa* (37Myr, segundo Theimer & Keim, 1998) permitiu a utilização de iniciadores desenvolvidos para essa última com bons resultados, pois observou-se uma eficiência de 100% de amplificação heteróloga em todos os locos e entre todos os indivíduos analisados. Esses valores foram semelhantes a outros obtidos quando iniciadores heterólogos amplificaram em outras ordens de mamíferos.

Na ordem Artiodactyla foram obtidos de 40-100% de sucesso em amplificações cruzadas quando iniciadores desenvolvidos para a família *Bovidae* foram testados na família

Cervidae (Engel et al. 1996, Ellegren et al., 1997; Slate et al., 1998; Goodman et al., 1999), 75% de amplificação cruzada quando iniciadores de ovinos e bovinos foram utilizados na sub-família *Alcelaphinae* (Flagstad et al., 1999) e 100% de sucesso quando iniciadores desenvolvidos para suínos foram analisados em *Tayassu tajacu*, o cateto (Gongora et al., 2002; Lowden et al., 2002).

Resultados semelhantes foram obtidos na ordem Carnivora, quando 56% dos locos das espécies da família *Phocidae* amplificaram na família *Otaridae* (Gemmell et al., 1997). Nos primatas, foram obtidas praticamente 100% de amplificações heterólogas quando iniciadores humanos foram utilizados nas espécies das famílias *Cercopithecidae* e *Pongidae* (Coote & Bruford, 1996).

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 (ALOX12A, CGA, IGF1, SW444 e TNFB) foi observada uma redução drástica (mais de 50%) no número de alelos, sendo que a única exceção foi observada no loco ACTG2, no qual houve redução de apenas um alelo. Entre os seis locos analisados, cinco foram polimórficos (83,3%) e um (TNFB) monomórfico.

A princípio existem duas explicações possíveis para estes fatos. 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). Os alelos nulos podem ocorrer devido à mutação em uma posição do iniciador ou pela deleção de um microssatélite inteiro. Quando se utilizam iniciadores heterólogos aumenta-se a probabilidade de que isto aconteça. 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 frequências alélicas (Engel et al., 1996; Lima-Rosa et al., 2000).

Suspeita-se da ocorrência de alelos nulos quando durante a análise indivíduos que apresentam problemas para amplificar um loco, amplificam facilmente todos os outros locos marcadores, ou quando ocorre uma deficiência de heterozigotos na população (Engel et al., 1996); uma maior confiança é obtida quando é feita uma genotipagem de indivíduos relacionados de origem conhecida (Flagstad et al., 1999).

Apesar das limitações observadas como, tempo de divergência entre as espécies, taxa de evolução e presença de alelos nulos, a utilização de iniciadores heterólogos tem se mostrado muito eficiente na análise de populações de uma grande quantidade de espécies que não estão envolvidas diretamente nos projetos genomas. Estima-se que a partir dos dados obtidos nestes projetos seja possível estudar mais de 30% das espécies de mamíferos (Engel, 1996).

5. Conclusão

De acordo com o observado neste trabalho, conclui-se 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.

6. Agradecimentos

À CAPES e FAEPA, pelo apoio financeiro recebido; à Prof^a. Dr^a. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia, Universidade de Brasília, pelas amostras de *T. pecari* e ao Prof. Dr. Rodolfo Nascimento Kronka, FCAV, UNESP, Jaboticabal, pelas amostras de *Sus s. domestica*.

7. Referências

- BARKER, J.S.F.; MOORE S.S.; HETZEL D.J.S.; EVANS, D.; BYRNE, K.; TAN, S.G. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. **Animal Genetics**, Oxford, v. 28, p. 103-115, 1997.
- BODMER, R.E.; EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. Hunting and the likelihood of extinction of Amazonian mammals. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 11, n. 2, p. 460-466, 1997.
- COOTE, T.; BRUFORD, M.W. Human microsatellites applicable for analysis of genetic variation in apes and Old World monkeys. **The Journal of Heredity**, Washington, v. 87, p. 406-410, 1996.
- ELLEGREN, H.; CHOWDHARY, B.P.; JOHANSSON, M.; MARKLUND, L.; FREDHOLM M.; GUSTAVSSON, I.; ANDERSSON, L. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. **Genetics**, Bethesda, v. 137, p. 1089-1100, 1994.
- ELLEGREN, H.; MOORE, S.; ROBINSON, N.; BYRNE, K.; WARD, W.; SHELDON, B.C. (1997) Microsatellite evolution – a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 14, p. 854-860, 1997.
- 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**, Baltimore, v. 77, n. 2, p. 504-518, 1996.
- FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 12, p. 432-440, 1995.
- FLAGSTAD, O.; OLSAKER, I.; ROED, K.H. (1999) The use of heterologous primers for analysing microsatellite variation in hartebeest *Alcelaphus buselaphus*. **Hereditas**, Lund, v. 130, p. 337-340, 1999.
- GEMMELL, N.J.; ALLEN, P.J.; GOODMAN, S.J.; REED, J.Z. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 661-666, 1997.
- GONGORA, J.; CHEN, Y.; BERNAL, J.E.; NICHOLAS, F.W.; MORAN, C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal Genetics**, Oxford, v. 33, p. 312-314, 2002.
- GOODMAN, S.J.; BARTON, N.H.; SWANSON, G.; ABERNETHY, K.; PEMBERTON, J.M. Introgression through rare hybridization: a genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (Genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. **Genetics**, Bethesda, v. 152, p. 355-371, 1999.
- HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR In: Erlich, H.A. (eds) **PCR technology – principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton,

- Press, 1989. p. 36-60.
- 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.
- KONDO, Y.; MORI, M.; KURAMOTO, T. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. **Mammalian Genome**, New York, v. 4, p. 571-575, 1993.
- LIMA-ROSA, C.A.V.; HUTZ, M.H.; OLIVEIRA, L.F.B.; MIRANDA, A.; MATTEVI, M.S. Heterologous amplification of microsatellite loci from mouse and rat in *Oryzomyine* and *Thomasomyine* south american rodents. **Biochemical Genetics**, New York, v. 38, p. 97-108, 2000.
- 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**, Baltimore, v. 44, p.397-401, 1989.
- LOWDEN, S.; FINLAYSON, H.A.; MACDONALD, A.A.; DOWNING, A.C.; GOODMAN, S.J.; LEUS, K.; KASPE, I.; WAHYUNI, E.; ARCHIBALD, A.I. The application of *Sus scrofa* microsatellite markers to wild suiformer. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 3, p. 347-350, 2002.
- MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL,

- D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, Orlando, v. 10, p. 654-660, 1991.
- OLIVER, W.L.R. **Pigs, peccaries and hippos**. IUCN, Gland, Switzerland. 1993, 202p.
- PRIMMER, C.R.; MOLLER, A.P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, p. 365-378, 1996.
- SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 914-921, 1994.
- SLATE, J.; COLTMAN, D.W.; GOODMAN, S.J.; MACLEAN, I.; PEMBERTON, J.M.; WILLIAMS, J.L. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, Oxford, v. 29, p. 307-315, 1998.
- STALLINGS, R.L.; FORD, A.F.; NELSON, D.; TORNEY, D.C.; HILDEBRAND, C.E.; MOYZIS, R.K. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics**, Orlando, v. 10, p.807-815, 1991.
- THEIMER, T.C.; KEIM, P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. **Journal Mammalogy**, Baltimore, v. 79, n. 2, p. 566-572, 1998.

WEBER, J.L.; MAY, P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms wich can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 44, p. 388-396, 1989.

Tabela 1 Lista dos pares de iniciadores de *Sus scrofa domestica* testados em *Tayassu pecari* para verificação da amplificação heteróloga.

Loco	Cromossomo	Seqüência dos iniciadores	Tamanho da repetição
ACTG2	3	5'CATCTTCCTCTTCCCTTCCC3' 5'TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC3'	Dinucleotídeo
ALOX12A	12	5'CTTCAATGGTGCAGTGGGTTG3' 5'ACTTTAATCAGATACAGAAGTTGG3'	Mononucleotídeo
CGA	1	5'GTCACAGTGGATGGCATTG3' 5'ACATCCCTAAGGTCGTGGC3'	Dinucleotídeo
IGF-1	5	5'GCTTGGATGGACCATGTTG3' 5'CACTTGAGGGGCAAATGATT3'	Dinucleotídeo
SW444	8	5'ATAGTTTCGGTTGGCCCAG3' 5'CTTAAGCCTCAAGCTAACAGGC3'	Dinucleotídeo
TNFB	7	5'CTGGTCAGCCACCAAGATT3' 5'GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC3'	Dinucleotídeo

Tabela 2 Condições padronizadas da PCR para amplificação dos locos microssatélites em *Tayassu pecari*.

		Loco					
		ACTG2	ALOX12A	CGA	IGF-1	SW444	TNFB
Solução							
Temperatura de pareamento		51°C	35°C	50°C	58°C	55°C	55°C
DNA		100 ng	100 ng	80 ng	100 ng	100 ng	60 ng
MgCl ₂		3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM	3,0 mM
dNTPs		200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM	200 µM
Iniciador		0,20 mM	0,20 mM	0,20 mM	0,20 mM	0,20 mM	0,20 mM
Taq DNA		0,4 U	0,3 U	0,5 U	0,5 U	0,6 U	0,5 U
Volume final		25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
Amplificação							
Desnaturação inicial		3'-94°C	3'-94°C	3'-94°C	3'-94°C	3'-94°C	3'-94°C
Pareamento inicial		1'-56°C	1'-40°C	1'-55°C	1'-63°C	1'-60°C	-
Extensão inicial		1'-72°C	1'-72°C	1'-72°C	1'-72°C	1'-72°C	-
Desnaturação		1'-92°C	30"-92°C	1'-92°C	1'-94°C	1'-92°C	1'-94°C
Pareamento		1' - 51°C	30"-35°C	1'-50°C	1'-58°C	1'-55°C	1'-55°C
Extensão		1' - 72°C	30"- 72°C	1'-72°C	1'-72°C	1'-72°C	1'-72°C
Extensão final		10'-72°C	10'-72°C	10'-72°C	10'-72°C	10'-72°C	10'-72°C

Tabela 3 Comparação entre temperatura de pareamento, amplitude de tamanho das bandas e número de alelos em *Sus scrofa domestica* (literatura) e *Tayassu pecari* nos seis locos microsatélites analisados.

Loco			Espécie	
			<i>Sus s. domestica</i>	<i>Tayassu pecari</i>
ACTG2	Temperatura de pareamento (°C)	de	58	51
	Amplitude de tamanho (bp)	de	109-142	122-134
	Número de alelos		9	8
ALOX12A	Temperatura de pareamento (°C)	de	58	35
	Amplitude de tamanho (bp)	de	143-155	149
	Número de alelos		6	1
CGA	Temperatura de pareamento (°C)	de	65	50
	Amplitude de tamanho (bp)	de	322-366	160-164
	Número de alelos		7	3
IGF1	Temperatura de pareamento (°C)	de	58	58
	Amplitude de tamanho (bp)	de	223-237	247-252
	Número de alelos		12	3
SW444	Temperatura de pareamento (°C)	de	60	55
	Amplitude de tamanho (bp)	de	92-120	99-106
	Número de alelos		7	3
TNFB	Temperatura de pareamento (°C)	de	60	55
	Amplitude de tamanho (bp)	de	174-213	148
	Número de alelos		10	1

Figura 1 Localização da ilha Beira Rio ($52^{\circ}27'48''$, $48^{\circ}52'24'01''$, $28^{\circ}W$; $22^{\circ}05'18''$, $09^{\circ}S$ $22^{\circ}09'16''$, $63^{\circ}S$), rio Paraná, extremo oeste do estado de São Paulo - Brasil, onde foram coletadas as amostras de *Tayassu pecari*.

Figura 2 Região de amplificação observada nos locos microssatélites analisados em *Tayassu pecari* com primers de *Sus scrofa domestica*. O polimorfismo foi observado em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante e corado com nitrato de prata. Foi utilizado um marcador de peso molecular 25 bp. Loco ACTG2 foi observada amplificação em *S. s. domestica* (A-B) em 137 bp, em *T. pecari* (C-J), 122-137 bp. Loco ALOX12A em *S. s. domestica* (A-D), 179-184 bp e *T. pecari* (E-I), 149-156bp. Loco CGA, em *S. s. domestica* (A-D), 334-394 bp, e em *T. pecari* (E-H), 160-164 bp. Loco IGF1 em *S. s. domestica* (A-D), 235-239 bp, e *T. pecari* (E-H), 247-252 bp. Loco SW444 em *S. s. domestica* (A-D), 102-128 bp, *T. pecari* (E-H), 99-126 bp. Loco TNFB em *S. s. domestica* (A-D), 175-180 bp, e *T. pecari* (E-G), 148 bp.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE PORCO-MONTEIRO (*Sus scrofa*) E QUEIXADA (*Tayassu pecari*) ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Resumo

Os microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) por serem considerados os marcadores moleculares ideais, têm se tornado o suporte principal nas análises genômicas em diferentes organismos. Neste estudo, as frequências alélicas de seis locos microssatélites desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (ACTG2, ALOX12A, CGA, IGF1, SW444 e TNFB) foram estimadas em duas espécies de Suiformes, *Sus scrofa* sp e *Tayassu pecari*. Foi utilizada uma amostra representativa de 99 indivíduos (85% de *T. pecari* e 15% de *S. scrofa* sp). Os marcadores foram altamente variáveis, mostrando entre 4 e 15 alelos. A heterozigose observada variou de 0,13 a 1,00 e o conteúdo de polimorfismo informativo de 0,18 a 0,84. Estes resultados indicaram a conservação entre as espécies de suínos e demonstraram a viabilidade da utilização de iniciadores desenvolvidos para *S. s. domestica* na análise de outras espécies de Suiformes.

Palavras-chave: Suiformes, *Tayassuidae*, iniciador heterólogo, polimorfismo, microssatélite.

Abstract

Microsatellites have been considered a superior class of genetic markers over earlier ones and became the most useful for genomic population analysis in a great variety of organisms. In this paper we had estimated genetic frequencies of six STRs (ACTG2, ALOX12A, CGA, IGF1, SW444 and TNFB) developed for *Sus scrofa domestica* that were used to amplify markers in two natural populations of a neotropical feral Suidae (*Sus scrofa* sp) and a neotropical species of peccary (*Tayassu pecari*). High degree of polymorphisms was observed and the number of alleles varied from 4 to 15 for the six analyzed loci. The observed heterozygosity was between 0.13 to 1.00 and PIC values varied from 0.18 to 0.84. The study also showed that these markers are evolutionary conserved, allowing the possibility of heterologous amplification.

1. Introdução

Um dos desafios dos geneticistas que estudam ecologia e genética populacional de animais silvestres é a identificação de locos altamente variáveis que apresentem informações homólogas a outras espécies relacionadas. Os microssatélites são ideais para este tipo de estudo por terem uma natureza altamente polimórfica, amplificação e tipagem relativamente simples (Coote e Bruford, 1996).

Atualmente, mamíferos da subordem Suiformes, e famílias *Suidae* (porcos verdadeiros) e *Tayassuidae* (pecaries), têm despertado o interesse dos pesquisadores devido à crescente demanda mundial por carnes de animais selvagens e exóticos, e também porque algumas espécies estão passando por um processo de extinção local, devido ao desmatamento, caça e doenças (Oliver, 1993).

Originalmente, os suínos viviam na Europa, norte da África, Ásia e arquipélago Malaio e por serem utilizados como objetos de troca, foram se dispersando pelos continentes, sendo domesticados e passando por um processo de melhoramento genético para obtenção de linhagens comerciais (Oliver, 1993).

Quando foram trazidos ao Brasil pelos colonizadores portugueses (séc. 18), muitos escaparam e embrenharam-se pelas matas, encontrando condições propícias para se reproduzirem, transformando-se em animais selvagens. Em um ambiente diverso do original, estes animais foram se modificando ao longo de mais de dois séculos, os dentes tornaram-se mais fortes e atualmente as presas tendem a aparecer fora da boca, como nos javalis (*Sus scrofa scrofa*) (Herrera, 1995).

Os porcos domésticos feralizados são conhecidos na região do Pantanal Matogrossense como porco-Monteiro (*Sus scrofa sp*), existindo aos milhares e geralmente encontrados em bandos. Dentre os animais exóticos, o *Sus scrofa sp* possui uma carne fácil de

preparar, sendo extremamente leve e saborosa, mas sendo conhecida somente nas regiões circunvizinhas ao pantanal matogrossense.

No pantanal matogrossense o porco-Monteiro (*S. scrofa* sp) tem disputado o mesmo nicho ecológico de dois taiassuídeos, a queixada (*Tayassu pecari*) e o cateto (*Tayassu tajacu*), animais silvestres cada vez mais raros e que hoje são preservados.

O *T. pecari* tem sua distribuição geográfica desde o sul do México (25°N) até o norte da Argentina e sul do Brasil (35°S). No entanto, a distribuição dessa espécie tem sido reduzida devido ao desmatamento, pressão de caça e doenças (Oliver, 1993).

É uma espécie muito importante no desenvolvimento econômico e cultural de muitas populações indígenas nos neotrópicos e constitui uma importante fonte de alimento e renda para diversas tribos e populações rurais.

Assim como para o *Sus scrofa* sp, há uma escassez de informações sobre o *T. pecari*, especialmente dados relacionados à genética populacional.

O objetivo deste estudo foi verificar a viabilidade da utilização de iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* na caracterização genética de uma pequena população de porco-Monteiro (*Sus scrofa* sp) natural do pantanal de Mato Grosso do Sul e de uma população de *Tayassu pecari*, originária do extremo oeste do estado de São Paulo.

2. Material e métodos

Material genético e extração do DNA

A coleta do material utilizado neste estudo foi realizada em duas regiões. As amostras de *Sus scrofa* sp foram obtidas em duas fazendas localizadas na sub-região da Nhecolândia, pantanal de Mato Grosso do Sul (Figura 1), perfazendo um total de 15 amostras de sangue. Já as amostras de *T. pecari* foram obtidas de uma população originária da ilha Beira Rio, no rio Paraná, extremo oeste do estado de São Paulo (Figura 1). Estes animais foram capturados, em 1998, com o término das obras da usina hidrelétrica Engenheiro Sérgio Motta e durante a captura foram coletadas 84 amostras de sangue.

O DNA foi extraído de acordo com o protocolo de Higuchi (1989).

Locos microsatélites

Seis pares de iniciadores utilizados para a amplificação de locos microsatélites identificados em *Sus s. domestica* (Tabela 1) foram utilizados na análise de amplificação de produtos e polimorfismo em *Sus scrofa* sp e *T. pecari*. A variação microsatélite foi analisada através de PCR em um volume total de 25 µL, contendo de 60-100 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada iniciador 3' e 5', 200 µM de cada dNTP e 1X a solução tampão de PCR contendo 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8,9 e 0,3-0,6 unidades de *Taq* DNA polimerase. As amplificações ocorreram em um termociclador *Robocycler* marca *Stratagene* programado para iniciar em 3 minutos a 94°C, 1 minuto 40-63°C, 1 minuto a 72°C seguidos por 30 ciclos com 1 minuto 92-94°C (desnaturação), de 30 segundos a 1 minuto 35-60°C (pareamento) e 10 minutos a 72°C (extensão), sendo finalizado com um ciclo de 10 minutos a 72°C para extensão final.

Os produtos da amplificação foram separados sob condições desnaturantes em gel

contendo de 10 a 15% de poliacrilamida, 8 M de uréia e 1 X TBE, por 4:30h a 18:30h, 20 mA ou 320 V, dependendo do loco e da espécie a ser analisada. Os fragmentos obtidos foram detectados em coloração com nitrato de prata segundo protocolo de Sanguineti et al. (1990). Fragmentos de diferentes mobilidades foram considerados alelos diferentes.

O tamanho dos alelos, em pares de bases (bp), foi obtido utilizando-se dois métodos diferentes. No primeiro método, os alelos foram separados sob condições não desnaturantes, em gel contendo 8% de poliacrilamida, glicerol e 1 X TBE por aproximadamente 4:00 h, a 320 V. Os fragmentos obtidos foram detectados em coloração com nitrato de prata (10%). O tamanho dos alelos, em cada loco, foi estimado através de marcador de peso molecular 10 bp (*Life Technologies - Gibco BRL*), e posteriormente analisado através do programa de documentação de foto Kodak 1K (*Scientific Imaging Systems*) versão 3.5.4.

No segundo método, iniciadores *forward* foram marcados com Fluoresceína. Os produtos foram separados por meio de gel de poliacrilamida 6% desnaturante usando um seqüenciador automático ALF-Blue (*Amersham Biotech Inc*). O tamanho das bandas amplificadas foi calculado através do *software* Allelelink do mesmo fornecedor do aparelho de seqüenciamento e usando um plasmídeo PGEM amplificado com iniciadores específicos que produzem fragmentos que foram seqüenciados e cujos tamanhos foram definidos em 60, 176, 302, 398 bp.

Para que não houvesse dúvidas sobre os resultados obtidos, tomou-se o cuidado de repetir no mínimo três vezes todos os passos envolvidos na amplificação e utilizou-se sempre amostras de *Sus s. domestica* como padrão.

Análises estatísticas

As frequências gênicas e genóticas, heterozigose observada (H_o), heterozigose esperada (H_e), conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) e frequência de alelos nulos em cada loco foram estimados pelo programa Cervus 2.0 (Marshall et al., 1998).

3. Resultados

Todos os seis locos microsatélites analisados amplificaram nas duas espécies. Em *T. pecari*, apesar do sucesso na amplificação (100%) somente os locos ACTG2, CGA, IGF1 e SW444 (67%) foram polimórficos (Tabela 2). Entre estes, CGA, IGF1 e SW444 apresentaram três alelos, e o loco ACTG2, 8 alelos.

No loco IGF1, observou-se uma tendência à fixação do alelo 4, com frequência de 0,89. Este loco foi o que apresentou os menores valores de divergência gênica, heterozigose e PIC dentro desta espécie, com 20%, 17%, e 18%, respectivamente. Quando a frequência de alelos nulos foi analisada, observou-se um valor positivo, $\theta = +0,07$, o que indicou um excesso de homozigotos na população, ou seja, a população de *T. pecari* está muito endocruzada considerando este loco. O valor do Fis também confirmou este resultado (+0,16). Este excesso de homozigotos pode estar relacionado à presença de alelos nulos; entretanto, além do cálculo da frequência, é necessário o conhecimento a respeito do parentesco dos animais envolvidos na análise, o que infelizmente não possuímos, por se tratar de uma população natural que não estava sendo monitorada.

O loco ACTG2 apresentou a maior diversidade genética entre todos os locos polimórficos analisados em *T. pecari*, com valores de H_o , H_e e PIC de 84%, 79% e 75%, respectivamente, e a melhor distribuição das frequências na população, não havendo tendência à fixação de nenhum alelo.

O loco CGA, apesar de possuir somente três alelos, apresentou diversidade genética tão elevada quanto o loco ACTG2, com valores de H_o , H_e e PIC iguais a 67%, 66% e 58%, respectivamente, e assim como no loco ACTG2, não houve tendência à fixação de nenhum alelo. Já no loco SW444 observou-se um comportamento intermediário, não sendo tão informativo quanto os locos ACTG2 e CGA, mas mais informativo do que o loco IGF1.

Neste, observou-se uma tendência à fixação do alelo 98 bp, com frequência de 0,77 e valores de H_o , H_e e PIC de 39%, 38% e 35%, respectivamente.

Quanto às análises das frequências de alelos nulos e Fis, os locos ACTG2, CGA e SW444 apresentaram valores negativos, indicando um excesso de heterozigotos na população.

Quando analisamos a espécie *Sus scrofa* sp, observamos que todos os locos foram polimórficos.

No loco ACTG2, observou-se dois alelos, com tendência à fixação do alelo 120 bp, com frequência 0,93. Este loco foi o que apresentou os menores valores de divergência gênica, heterozigose e PIC, com 13%, 0% e 12%, respectivamente. Quando a frequência de alelos nulos foi analisada, observou-se um valor positivo, relativamente elevado, $\theta = 0,81$, o que indicou um excesso de homozigotos na população, ou seja, a população de *Sus scrofa* sp está muito endocruzada considerando este loco. O valor do Fis (+ 1,00) também confirmou este resultado.

Nos locos ALOX12A, IGF1 e SW444 foram observados três alelos, com as maiores frequências para os alelos 156 bp (0,53), 6 (0,67) e 172 bp (0,57), respectivamente, indicando uma tendência à fixação dos mesmos na população.

Estes locos apresentaram uma diversidade genética moderada, com valores de H_o , H_e e PIC variando de 27-67%, 35-54% e 31-42%, respectivamente.

O loco CGA apresentou um total de 12 alelos além da maior diversidade genética, com valores de H_o , H_e e PIC, iguais a 100%, 88% e 84%, respectivamente, e a melhor distribuição das frequências na população, não havendo tendência à fixação de nenhum alelo.

Assim como no loco CGA, o loco TNFB também foi extremamente informativo, apresentando cinco alelos e valores de H_o , H_e e PIC iguais a 60%, 62% e 50%, respectivamente.

Os locos SW444 e TNFB apresentaram valores positivos tanto para a frequência de

alelos nulos ($\theta = +0,10$ e $\theta = +0,03$, respectivamente) quanto para Fis (+0,24 e +0,03, respectivamente), o que indicou a existência de um excesso de homozigotos na população e a possível presença de alelos nulos. Já os locos ALOX12A, CGA e IGF1 demonstraram uma tendência contrária, ou seja, um excesso de heterozigotos.

Na comparação entre as duas espécies, observou-se que apesar de amplificarem na mesma região, exceção para o loco CGA, que possui uma diferença de 175 bp, nos outros cinco locos analisados só houve compartilhamento de alelos nos locos ACTG2 e SW444 (Tabela 2). No loco ACTG2 houve compartilhamento dos alelos 120 bp e 122 bp, com frequências 0,05 e 0,13, respectivamente, em *T. pecari* e 0,93 e 0,07, respectivamente em *Sus scrofa* sp; e no loco SW444, as duas espécies compartilham o alelo 104 bp, com frequência igual a 0,10 em ambas espécies. Os outros locos definiram alelos específicos para cada espécie.

Quando comparou-se o número de alelos encontrados em *T. pecari* e *S. scrofa* sp, verificou-se que, com exceção dos locos ACTG2 (queixada) e CGA (porco-Monteiro), no geral, o número de alelos foi bem inferior ao encontrado nos locos de *S. s. domestica* para os mesmos locos (Tabela 2).

No loco IGF1 ocorreu um fato interessante, os três alelos de *T. pecari* estão inseridos na região de amplificação de *Sus scrofa* sp, entre os alelos 2 e 6, não ocorrendo compartilhamento.

Os valores de heterozigose média observada ($\bar{H}_o$) e de heterozigose média esperada ($\bar{H}_e$), indicaram um alto grau de diversidade nas espécies, considerando os marcadores utilizados (Tabela 3).

Na população de *T. pecari*, a heterozigose média observada foi de 35% e a divergência gênica de 34%. Já em *Sus scrofa* sp os valores encontrados foram 60% e 54%,

respectivamente.

Entretanto, foram observados altos valores de erro padrão para $\bar{H}_o$ e $\bar{H}_e$ (9%) em *Sus scrofa* sp, o que sugeriu uma grande heterogeneidade entre os locos. Em *T. pecari*, este valor foi bem inferior (4%), o que indicou a existência de uma menor heterogeneidade entre os locos.

O índice de fixação de Wright (F) (Tabela 3), tanto para *T. pecari* quanto para *Sus scrofa* sp, assim como os valores totais do Fis, foram negativos, indicando uma acentuada heterozigose nestas duas espécies.

4. Discussão

Os locos microssatélites de *S. s. domestica* analisados mostraram-se tão conservados em *T. pecari* e *S. scrofa* sp, com 100% de amplificação, quanto em outros estudos com artiodáctilos, tais como, bovinos, cervídeos, cabra e *Tayassu tajacu*, os quais apresentaram de 40-100% de sucesso em amplificações heterólogas (Engel et al., 1996; Ellegren et al., 1997; Lowden et al., 2002; Gongora et al., 2002). Esta elevada taxa de sucesso na amplificação heteróloga obtida neste estudo pode estar relacionada à otimização das condições da PCR, tais como temperatura de pareamento e concentrações de $MgCl_2$, realizadas principalmente em *T. pecari* (Gonela e Contel, submetido).

Dos seis locos analisados em *T. pecari*, ALOX12A e TNFB foram monomórficos (32%). A presença de locos monomórficos é o resultado da perda de repetições microssatélites devido a uma única ou múltiplas mutações que ocorreriam nas regiões flangeadoras e impediriam a ligação dos iniciadores nas reações de amplificação por PCR. Este processo resulta em alelos nulos, que podem, com o tempo, se fixar na população. Outra explicação seria a amplificação de regiões não homólogas do genoma de *T. pecari*.

A possibilidade de que esses resultados sejam artefatos da PCR é pouco provável devido à natureza consistente de nossos resultados pois o experimento foi repetido várias vezes, nas mesmas condições e em condições diferentes de temperatura de pareamento (29°-65°C), $MgCl_2$ (1,0-5,0 mM) e concentrações de *Taq* DNA polimerase (0,4-1,0 U), com todos os artefatos desaparecendo e permanecendo somente a região alvo. Também foram utilizadas amostras de *S. s. domestica* como controle.

Entretanto, apesar de todo este cuidado, só poderemos dizer com certeza que estes locos são monomórficos, ou seja, que o que observamos foi o microssatélite alvo após o sequenciamento do DNA comparando-se as duas espécies. Contudo, em outros estudos com

artiodáctilos foram observadas freqüentes perdas de polimorfismos com 28-50% de locos monomórficos quando se utilizou iniciadores interespecíficos (Ellegren et al., 1997; Morin et al., 1998; Gongora et al., 2002).

Entre os seis locos microssatélites analisados, quatro em *T. pecari* (67%) e seis em *Sus scrofa* sp (100%) apresentaram polimorfismo. Valores tão elevados também foram observados em porco ibérico (100% de polimorfismo) (Martínez et al., 2000) e em *Tayassu tajacu*, o cateto (69% de polimorfismo) (Gongora et al., 2002), quando analisados com iniciadores de *S. s. domestica*. Em outros artiodáctilos, tais como, *Cervus elaphus*, *Cervus nippon* e *Ovis aries*, quando analisados com iniciadores de bovinos, foram observados 42,5%, 55,8% e 37,3% de polimorfismo, respectivamente (Slate et al., 1998).

O número de alelos em uma dada amostra é determinado pelo tamanho populacional efetivo e pela taxa mutacional. No caso dos artiodáctilos, estima-se que a taxa de substituição esteja em torno de $0,30\% \text{ Myr}^{-1}$ (Brohede e Ellegren, 1999). Como as espécies *S. s. domestica* e *T. pecari* divergiram há pelo menos 37 Myr, esta taxa de substituição explicaria a menor quantidade de alelos presentes em alguns locos quando comparados com *S. s. domestica*.

No caso da espécie *Sus scrofa* sp, além do pequeno tamanho amostral ($N = 15$) outro fator que pode estar interferindo no número de alelos é o efeito do fundador, ou seja, os animais que foram trazidos para o Brasil pelos colonizadores provavelmente não apresentavam toda a diversidade genética da espécie.

Uma considerável variação na distribuição das frequências alélicas foi observada entre os locos microssatélites analisados. As distribuições das frequências de cada microssatélite em cada espécie foi significativamente diferente. Em quatro locos (ALOX12A, CGA, IGF1 e TNFB), os alelos observados foram típicos para cada espécie, ou seja, eles identificaram claramente as duas espécies.

Este comportamento foi mais marcante no loco CGA, que apresentou uma diferença

aproximada de 175 bp entre as duas espécies, indicando que pode ter ocorrido, durante o tempo de divergência (37 Myr) (Theimer e Keim, 1998) um evento de deleção/inserção. Isto só poderá ser comprovado com o seqüenciamento deste loco. Entretanto, não é raro observar uma diferença tão alta dentro de um loco microssatélite quando este é analisado em espécies diferentes. Coote e Bruford (1996) observaram diferenças de até 100 bp dentro de um loco quando utilizaram iniciadores de humanos em macacos do Velho Mundo e 84 bp de diferença quando Gemmell et al. (1997) analisaram populações de pinípedes com iniciadores de três outras espécies de pinípedes.

A deficiência de heterozigotos não foi significativa nos locos polimórficos analisados, indicando que as populações estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Desse modo, pode-se dizer então que nenhum loco está sob o efeito de Wahlund.

Os locos mais informativos dentro da população de *T. pecari* foram ACTG2 e CGA e em *S. scrofa* sp foram CGA e TNFB. Entretanto, não se deve descartar a utilização dos demais locos em análises futuras pois só foi analisada uma população de cada espécie. O ideal, em estudos futuros, será aumentar o número de populações e de marcadores para se fazer um levantamento dos melhores iniciadores a serem utilizados.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que iniciadores desenvolvidos para *S. s. domestica* podem ser utilizados com sucesso em outras espécies de Suiformes, sendo altamente informativos e podendo ser úteis nas análises populacionais e posteriormente em estudos filogenéticos.

5. Agradecimentos

À CAPES e FAEPA, pelo apoio financeiro recebido; à Prof^a. Dr^a. Maria de Nazaré Klautau Guimarães Grisólia, Universidade de Brasília, pelas amostras de *T. pecari*, ao Prof. Dr. Rodolfo Nascimento Kronka, FCAV, UNESP, Jaboticabal, pelas amostras de *Sus s. domestica* e à Dr^a. Maria Aparecida C. Lara, Instituto de Zootecnia, Nova Odessa, pelas amostras de *Sus scrofa* sp.

6. Referências

- BROHEDE, J.; ELLEGREN, H. Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. **Proceedings Royal Society of London**, v. 266, p. 825-833, 1999.
- COOTE, T.; BRUFORD, M.W. Human microsatellites applicate for analysis of genetic variation in apes and old world monkeys. **The Journal of Heredity**, v. 87, n. 5, p. 406-410, 1996.
- ELLEGREN, H.; CHOWDHARY, B.P.; JOHANSSON, M.; MARKLUND, L.; FREDHOLM, M.; GUSTAVSSON, I.; ANDERSSON, L. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. **Genetics**, v. 137, p.1089-1100, 1994.
- ELLEGREN, H.; MOORE, S.; ROBINSON, N.; BYRNE, K.; WARD, W.; SHELDON, B.C. Microsatellite evolution – a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. **Molecular Biology Evolution**, v. 14, p. 854-860, 1997.
- ENGEL, S.R.; LINN, R.A.; TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, v. 77, n. 2, p. 504-518, 1996.
- GEMMELL, N.J.; ALLEN, P.J.; GOODMAN, S.J.; REED, J.Z. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 6, p. 661-

666, 1997.

GONELA, A.; CONTEL, E.P.B. Amplificação heteróloga de locos microssatélites de porco doméstico em queixada. **Revista Agropecuária Brasileira**, 2003. (Submetido)

GONGORA, J.; CHEN, Y.; BERNAL, J.E.; NICHOLAS, F.W.; MORAN, C. Interspecific amplification of peccary microsatellite markers using porcine primers. **Animal Genetics**, v. 33, p. 312-327, 2002.

HERRERA, R.C. Estudo dos hábitos alimentares do porco-Monteiro no Pantanal da Nhecolândia. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo – ES, 1995.

HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich HA (Ed) **PCR technology – principles and applications for DNA amplification**. New York: Stockton, Press, 1989. p. 36-60.

LOWDEN, S.; FINLAYSON, H.A.; MACDONALD, A.A.; DOWNING, A.C.; GOODMAN, S.J.; LEUS, K.; KASPE, I.; WAHYUNI, E.; ARCHIBALD, A.I. The application of *Sus scrofa* microsatellite markers to wild suiformer. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 3, p. 347-350, 2002.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUUK, L.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 639-655, 1998.

MARTINEZ, A.M.; DELGADO, J.V.; RODERO, A.; VEJA-PLA, J.L. Genetic structure of the Iberian pig breed using microsatellites. **Animal Genetics**, v. 31, p. 295-301, 2000.

MORIN, P.A.; MAHBOUHI, P.; WEDEL, S.; ROGERS, J. Rapid screening and comparison of human microsatellite markers in baboons: allele size is conserved, but allele number is not. **Genomics**, v. 53, p. 12-20, 1998.

OLIVER, W.L.R. **Pigs, peccaries and hippos**. IUCN, Gland, Switzerland, 1993. 202p.

ROHRER, G.A.; ALEXANDER, L.J.; KEELE, J.W.; SMITH, T.P.; BEATTIE, C.W. A microsatellite linkage map of the porcine genome. **Genetics**, v. 136, p. 231-245, 1994.

SANGUINETTI, C.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. RAPD silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, Natick, v. 17, p. 914-921, 1994.

SLATE, J.; COLTMAN, D.W.; GOODMAN, S.J.; MACLEAN, I.; PEMBERTON, J.M.; WILLIAMS, J.L. Bovine microsatellite loci are highly conserved in red deer (*Cervus elaphus*), sika deer (*Cervus nippon*) and Soay sheep (*Ovis aries*). **Animal Genetics**, v. 29, p. 307-315, 1998.

SUN, H.; KIRKPATRICK, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellite conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 128-132, 1996.

THEIMER, T.C.; KEIM, P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. **Journal of Mammalogy**, v. 79, n. 2, p. 566-572, 1998.

TROYER, D.L.; GOAD, D.W.; XIE, H.; ROHRER, G.A.; ALEXANDER, L.J.; BEATTIE, C.W. Use of direct *in situ* single-copy (DISC) PCR to physically map five porcine microsatellites. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 67, p. 199-204, 1994.

Tabela 1 Características dos locos microssatélites de *Sus scrofa domestica* analisados em *Sus scrofa* sp e *Tayassu pecari*.

Loco	<i>Sus s. domestica</i>		MgCl ₂ (mM)	Temperatura de pareamento (°C)	Referências
	Cromossomo	Número de alelos			
ACTG2	3	9	3,0	51	Sun e Kirkpatrick, 1996
ALOX12A	12	6	2,5	35	Ellegren et al., 1994
CGA	1	7	3,0	50	Troyer et al., 1994
IGF1	5	12	3,0	58	Rohrer et al., 1994
SW444	8	7	3,0	55	Rohrer et al., 1994
TNFB	7	10	3,0	55-57	Rohrer et al., 1994

Tabela 2 Frequência alélica, frequência de alelos nulos (θ), heterozigose observada ($\bar{H}_o$), heterozigose esperada (H_e), conteúdo de informação do polimorfismo (PIC) e Fis, nos seis locos microssatélites analisados em *T. pecari* e *S. scrofa* sp.

Loco (nº. alelos/loco)	Alelo	Frequência alélica	
		<i>T. pecari</i> (n = 84)	<i>S. scrofa</i> sp (n = 15)
ACTG2 (8)	116 bp	0,12 ± 0,03	-
	118 bp	0,26 ± 0,03	-
	120 bp	0,05 ± 0,02	0,93 ± 0,05
	122 bp	0,13 ± 0,03	0,07 ± 0,05
	124 bp	0,01 ± 0,01	-
	126 bp	0,09 ± 0,02	-
	128 bp	0,01 ± 0,01	-
	130 bp	0,33 ± 0,04	-
	θ	-0,04	+0,81
	H_o	0,84	0,00
	H_e	0,79	0,13
	PIC	0,75	0,12
	Fis	-0,07	+1,00
ALOX12A (4)	140 bp	1,00 ± 0,00	-
	146 bp	-	0,03 ± 0,03
	148 bp	-	0,43 ± 0,09
	156 bp	-	0,53 ± 0,09
	θ	-	-0,12
	H_o	0,00	0,67
	H_e	0,00	0,54
	PIC	0,00	0,42
	Fis	0,00	-0,28
CGA (15)	160 bp	0,42 ± 0,04	-
	162 bp	0,31 ± 0,04	-
	164 bp	0,27 ± 0,03	-
	304 bp	-	0,10 ± 0,05
	318 bp	-	0,17 ± 0,07
	322 bp	-	0,07 ± 0,05
	324 bp	-	0,03 ± 0,03
	330 bp	-	0,03 ± 0,03
	332 bp	-	0,03 ± 0,03
	340 bp	-	0,17 ± 0,07
	344 bp	-	0,03 ± 0,03
	346 bp	-	0,03 ± 0,03
	360 bp	-	0,03 ± 0,03
	362 bp	-	0,03 ± 0,03
	366 bp	-	0,27 ± 0,08
	θ	-0,01	-0,10
	H_o	0,67	1,00

Tabela 2 Continuação

	H _e	0,66	0,88
	PIC	0,58	0,84
	Fis	-0,01	-0,07
IGF1 (6)	1	-	0,03 ± 0,03
	2	-	0,30 ± 0,08
	3	0,03 ± 0,01	-
	4	0,89 ± 0,02	-
	5	0,08 ± 0,02	-
	6	-	0,67 ± 0,09
	θ	+0,07	-0,11
	H _o	0,17	0,60
	H _e	0,20	0,48
	PIC	0,18	0,38
	Fis	+0,16	-0,26
SW444 (5)	96 bp	-	0,80 ± 0,07
	98 bp	0,77 ± 0,03	
	102 bp	0,13 ± 0,03	-
	104 bp	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,05
	108 bp	-	0,13 ± 0,06
	θ	-0,04	+0,10
	H _o	0,39	0,27
	H _e	0,38	0,35
	PIC	0,35	0,31
	Fis	-0,02	+0,24
TNFB (6)	147 bp	1,00 ± 0,00	-
	170 bp	-	0,07 ± 0,05
	172 bp	-	0,57 ± 0,09
	176 bp	-	0,03 ± 0,03
	178 bp	-	0,27 ± 0,08
	196 bp	-	0,07 ± 0,05
	θ	-	+0,03
	H _o	0,00	0,60
	H _e	0,00	0,62
	PIC	0,00	0,54
	Fis	0,00	+0,03

Tabela 3 Número médio de alelos por loco (Na), proporção de locos polimórficos (P), heterozigose média observada ($\bar{H}_o$), heterozigose média esperada ($\bar{H}_e$), Fis e índice de fixação de Wright (F) em *Tayassu pecari* e *Sus scrofa* sp.

	<i>T. pecari</i>	<i>Sus scrofa</i> sp
Na	3,17	4,67
P	0,67	1,00
$\bar{H}_o$	0,35 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,09
$\bar{H}_e$	0,34 $\pm$ 0,04	0,50 $\pm$ 0,09
Fis	-0,02	-0,04
F	-0,03	-0,11

Figura 1 Localização das duas regiões de coleta. Sub-região de Nhecolândia (Pantanal Matogrossense), onde foram coletadas as amostras de *Sus scrofa* sp e Ilha Beira Rio (extremo oeste do estado de São Paulo), onde foram coletadas as amostras de *Tayassu pecari*.

CAPÍTULO V

COMENTÁRIOS FINAIS E CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pôde-se constatar que:

- (a) apesar do tempo de divergência existente entre as duas espécies é possível a utilização de iniciadores do porco doméstico em queixada, obtendo-se 100% de amplificação heteróloga, não sendo necessário, portanto, investir no desenvolvimento de iniciadores específicos para a espécie;
- (b) os iniciadores de porco doméstico podem ser utilizados com sucesso na análise das duas espécies de Suiformes estudadas, sendo altamente informativos, principalmente os locos ACTG2, CGA e TNFB, podendo futuramente ser utilizados em análises filogenéticas e também como base para programas de melhoramento genético e conservacionistas.
- (c) apesar dos outros locos analisados não serem tão informativos quanto os três citados acima, sua utilização não deve ser descartada pois deve-se levar em consideração que só foi analisada uma população de cada espécie, e no caso do porco-Monteiro, a amostra só possuía 15 animais.
- (d) marcadores microssatélites de porco doméstico apresentaram-se altamente eficientes nas análises populacionais de porco-Monteiro e queixada. Assim sendo, o ideal é que a partir de agora outros locos sejam analisados para futuramente se escolher os mais informativos para as análises populacionais destas duas espécies.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 155-165, 2002.

BODMER, R.E.; EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. Hunting and the likelihood of extinction of Amazonian mammals. **Conservation Biology**, v. 11, n. 2, p. 460-466, 1997.

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. **Microsatellites: consensus and controversy. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 126**, p. 455-476, 2000.

COOTE, T.; BRUFORD, M.W. Human microsatellites applicable for analysis of genetic variation in apes and Old World monkeys. **The Journal of Heredity**, v. 87, p. 406-410, 1996.

COULSON, T.N.; ALBON, S.D.; PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; GUINNESS, F.E.; CLUTTON-BROCK, T.H. Genotype by environment interactions in winter survival in red deer. **Journal of Animal Ecology**, v. 67, p. 434-445, 1998.

DUBOST, G. Comportements comparés du pécarí à lèvres blanches, *Tayassu pecari*, et du pécarí à collier, *T. tajacu* (Artiodactyles, *Tayassuidés*). **Journal of Mammalogy**, v. 61, n. 3, p. 313-343, 1997.

EISEN, J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. (eds), **Microsatellites - evolution and applications**, Oxford University Press, Oxford, UK, cap. 4, p. 34-48, 1999.

- ELLEGREN, H.; CHOWDHARY, B.P.; JOHANSSON, M.; MARKLUND, L.; FREDHOLM M.; GUSTAVSSON, I.; ANDERSSON, L. A primary linkage map of the porcine genome reveals a low rate of genetic recombination. **Genetics**, v. 137, p. 1089-1100, 1994.
- ENGEL, S.R.; LINN, R.A.; TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite loci 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 moleculares em análise genética**. Brasília, Embrapa, 1996. 220p.
- FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 432-440, 1995.
- FRAGOSO, J.M.V. Home range and movement patterns of white-lipped peccary (*Tayassu pecari*) herds in the northern Brazilian Amazon. **Biotropica**, v. 30, n. 3, p. 458-469, 1998.
- GIANONNI, M.A.; GIANONNI, M.L.; FERRARI, I. Karyotype evolution in the *Suidae* family. II. Chromosomal similarities among *Tayassu* species. **5th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals**, Milan, p.298-311, 1982.
- GOTTDENKER, N.; BODMER, R.E. Reproduction and productivity of white-lipped and collared peccaries in the Peruvian Amazon. **Journal of Zoology**, v. 245, p. 423-430,

1998.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. In: Goldstein, D.B.; Schlötterer, C. (eds), **Microsatellites - evolution and applications**, Oxford University Press, Oxford, UK, cap. 4, p. 1-9, 1999.

HERRERA, R.C. **Estudo dos hábitos alimentares do porco-Monteiro no Pantanal da Nhecolândia**. Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Espírito Santo, ES. 1995.

LIMA-ROSA, C.A.V.; HUTZ, M.H.; OLIVEIRA, L.F.B.; MIRANDA, A.; MATTEVI, M.S. Heterologous amplification of microsatellite loci from mouse and rat in *Oryzomyine* and *Thomasomyine* South American rodents. **Biochemical Genetics**, v. 38, p. 97-108, 2000.

MACHADO, L.P.B. **Descrição e análise de loci de microssatélites em populações naturais da espécie Cactofílica *Drosophila antioniette* (Díptera; *Drosophilidae*)**. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. 2003. 105p.

MOORE, S.S.; SARGEANT, L.L.; KING, T.J.; MATTICK, J.S.; GEORGES, M.; HETZEL, D.J.S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, p. 654-660, 1991.

OLIVER, W.L.R. **Pigs, peccaries and hippos**. IUCN, Gland, Switzerland, 1993. 202 p.

ROED, K.H. Microsatellite variation in Scandinavian *Cervidae* using primers derived from *Bovidae*. **Hereditas**, v. 129, p. 19-25, 1998.

THEIMER, T.C.; KEIM, P. Phylogenetic relationships of peccaries based on mitochondrial cytochrome *b* DNA sequences. **Journal of Mammalogy**, v. 79, n. 2, p. 566-572, 1998.

TORGGLER, M.G.F.; CONTEL, E.P.B.; TORGGLER, S.P. **Isoenzimas - variabilidade genética em plantas**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. 175p.

ZIJLSTRA, C.; MELLINK, C.H.M.; HAAN, N.A. de; BOSNA, A.A. Localization of the 18S, 5,8S and 28S rRNA genes and the 5SrRNA genes in the barbirusa and the white-lipped peccary. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 77, p. 273-277, 1997.

CAPÍTULO VII

ANEXOS

1. Protocolo para extração de DNA (Higuchi, 1989)

(a) Lise I (Lise de eritrócitos)

0,01 M Tris/HCl pH 7,6

0,32 M sacarose

5 mM MgCl₂

1% Triton X-100

(b) Lise II (Lise de leucócitos)

0,01 M Tris/HCl pH 8,5

50 mM MgCl₂

0,45% NP-40

0,45% Tween 20 (ou 80)

(c) Proteinase K (10 mg/mL)

Uma alíquota de 50 µL do anel leucocitário foi acondicionada em um eppendorf de 1,5 mL, passando a seguir por três lavagens sucessivas com Lise I. Cada lavagem foi realizada adicionando-se 1 mL de Lise I, homogeneização e centrifugação a 6000 g por 1 minuto, com subsequente descarte do sobrenadante através de aspiração. A seguir, foram adicionados ao *pellet* 300 µL de Lise II + 5 µL de proteinase K (10 mg/mL), e as amostras foram transferidas para estufa a 65°C por no mínimo 1 hora para que a proteinase K agisse. Após este período, as

amostras foram transferidas para uma outra estufa a 37°C permanecendo *overnight*. Para que a proteinase K fosse completamente desativa, as amostras foram submetidas a uma temperatura de 94°C por 10 minutos em termociclador Robocycler, marca Stratagene.

2. Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi estimada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% a 3 V/cm de distância entre os eletrodos. O tampão utilizado no preparo do gel, bem como na cuba foi o TBE 10X (0,89 M Tris; 0,89 M ácido bórico; 0,08 M EDTA pH 8,3), diluído no momento do uso para obter uma concentração de 1X (1:10, v:v). A quantificação foi realizada através da comparação de 10 µL DNA de cada indivíduo, no qual foi adicionado 3 µL de tampão de amostra (0,25 g de azul de bromofenol, 15 g de ficoll 400 em 100 mL de água destilada), com o DNA do fago λ de fonte comercial nas concentrações de 2,4; 5,0; 10,0 e 20,0 ng/µL. Após 2 cm de migração eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e observado em transiluminador de luz ultravioleta.

3. Eletroforese

(a) Solução de Acri/bis (29:1)

29 g de acrilamida

1 g de bis-acrilamida

Completar o volume para 100 mL. Filtrar

(b) TBE 10X

108 g de Tris

4 mL de EDTA 0,5M pH 8,0

53 g de ácido bórico

Completar o volume para 1 litro.

(c) EDTA 0,5M pH 8,0

18,6 g de EDTA

100 mL de água

(d) Gel de poliacrilamida, não desnaturante (10%)

Acri/bis (29:1)	-	10,00 mL
Glicerol	-	2,10 mL
H ₂ O	-	14,57 mL
TBE 10X	-	2,00 mL
Temed	-	22,50 µL
Persulfato de potássio (650mg/6,5mL)	-	450,00 µL
Volume total:	-	20,00 mL

(e) Gel de poliacrilamida desnaturante

	Concentração			
	8%	10%	12%	15%
Acrid/bis (29:1) (mL)	8,00	10,00	12,00	15,00
Uréia (g)	14,40	14,40	14,40	14,40
H ₂ O (mL)	16,58	14,57	12,57	9,57
TBE 10X (mL)	3,00	3,00	3,00	3,00
Temed (μL)	22,50	22,50	22,50	22,50
Persulfato de potássio (μL)	450,00	450,00	450,00	450,00

Volume total: 30 mL

4. Preparo das amostras para aplicação em gel de poliacrilamida desnaturante

(a) Loading buffer

900 μL bromophenol 2,5%

900 μL xileno cyanol 2,5%

900 μL TBE 10X

4,5 mL ficoll 30%

1,8 mL EDTA 0,5M pH 8,0

3,6 g sacarose

(b) Solução de formamida a 75%

300 µL de loading buffer

900 µL de formamida

As amostras aplicadas em gel desnaturante foram preparadas da seguinte forma: 5 µL da PCR + 7 µL de formamida a 75%. A seguir, as amostras foram aquecidas a 94°C por 10 minutos. Após este período, foram retiradas, colocadas no gelo e aplicadas imediatamente no gel.

(c) Diluição do Ladder

5 µL do ladder

50 µL de loading buffer (sem formamida)

150 µL de água autoclavada

Usar 5 µL no gel

5. Coloração com solução de nitrato de prata (Sanguinetti *et al.*, 1994)

(a) Solução fixadora

144 mL de etanol

6 mL de ácido acético

750 mL de água destilada

(b) Solução reveladora

22 g de NaOH

1000 mL de água

(c) Solução de nitrato de prata (20%)

2 g de nitrato de prata

10 mL de água