

**USP - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FMRP - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE JAVALIS (*Sus scrofa scrofa* L.)
ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES - STRs**

LENÍCY LUCAS DE MIRANDA

Ribeirão Preto

2005

**USP - UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FMRP - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE JAVALIS (*Sus scrofa scrofa* L.)
ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES - STRs**

LENÍCY LUCAS DE MIRANDA

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas – área de concentração Genética.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. EUCLEIA P. B. CONTEL

Ribeirão Preto
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Lenicy Lucas de Miranda

Caracterização genética de javalis (*Sus scrofa scrofa* L.) através de marcadores microssatélites.

87p.: il; 3,0 cm

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – 2005

Área de Concentração: Genética

Orientadora: Dra. Eucleia Primo Betioli Contel

1. javali 2. marcadores microssatélites 3. iniciadores heterólogos

capa: mapa de distribuição do javali europeu

**À minha querida família,
pais, sobrinhos,
irmãos, cunhados e
a Fred,
com todo meu amor**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À **Profa. Dra. Eucleia Primo Betioli Contel**, pela orientação, dedicação e sobretudo a amizade;
- Aos professores membros da banca examinadora pelas sugestões e contribuições;
- Ao **Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui e Selma Grossi**, pelas amostras de animais híbridos;
- Ao Sr. **Adhemar Motta**, presidente da Federação Brasileira dos Criadores de Javali, pelas amostras de javalis;
- Às funcionárias do Departamento de Genética **Maria Aparecida Elias, Susie Nalon e Cleuza Mazzucato**, pela boa vontade e gentileza.
- À **Maria do Carmo e Ana Lúcia**, pela atenção com suas importantes contribuições práticas e também pelo carinho.
- À **Elisabete M. S. B. Beira**, pelas facilidades que ofereceu na realização do trabalho no laboratório e nas correções finais da tese, além de sua companhia alegre e amiga.
- À **Cláudia Wiesel**, pela preciosa ajuda nas análises estatísticas e seqüenciamento e também pela amizade.
- À **Adriana Gonela**, amiga com que sempre pude contar para a realização deste trabalho.
- Aos amigos do laboratório: **Eddy, Eliana, Rosana, Jeanne, Geuza, Regina, Sandra, Joelintom, Edna, Ana Paula, Celso, Lilian, Fernanda, Juliana, Luzitano, Marcelo, Ricardo, Yara e Débora**.

- A todos os professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-Graduação em Genética, pelos ensinamentos e convivência, enfim, a todos que participaram na construção deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!!!!

ÍNDICE GERAL

	Página
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Marcadores de DNA.....	01
1.1.1. Marcadores microssatélites.....	01
1.2. Considerações sobre a espécie.....	06
2. JUSTIFICATIVA.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Caracterização da amostra.....	18
4.2. Extração do DNA de pêlos.....	18
4.3. Coleta e processamento das amostras de sangue.....	19
4.4. Extração do DNA de sangue.....	19
4.5. Teste para eficiência das extrações.....	20
4.6. Iniciadores utilizados para amplificação dos microssatélites.....	20
4.7. Amplificação por PCR.....	21
4.8. Padronização da análise do produto de PCR.....	23
4.9. Seqüenciamento.....	25
4.10. Análises estatísticas.....	25
4.10.1. Estimativa das freqüências alélicas e genotípicas.....	25
4.10.2. Aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	26

4.10.3. Diferenciação genética das populações	26
4.10.4. Diversidade gênica e estrutura populacional	26
4.10.5. Distância genética	27
5. RESULTADOS	29
5.1. Seqüenciamento	33
5.2. Freqüências alélicas e equilíbrio de Hardy-Weinberg	35
5.3. Diversidade gênica e estrutura populacional.....	38
5.4. Diferenciação genética	39
5.5. Distâncias genéticas	40
6. DISCUSSÃO	41
6.1. Freqüências alélicas	41
6.2. Equilíbrio de Hardy-Weinberg	45
6.3. Diversidade gênica e intrapopulacional	47
6.4. Diferenciação genética e estrutura populacional	48
6.5. Distância genética	49
7. CONCLUSÕES	51
8. BIBLIOGRAFIA	52
9. ABSTRACT	65
10. ANEXOS	66

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Pares de iniciadores para amplificação de <i>loci</i> de microssatélites do porco doméstico	20
2	Soluções para reações de amplificação	22
3	Programas para reações de amplificação	23
4	Condições para eletroforese de cada <i>locus</i> estudado	24
5	Comparação da temperatura de pareamento, amplitude de tamanho das bandas e número de alelos encontrados em <i>Sus scrofa domestica</i> (na literatura) e <i>Sus scrofa scrofa</i> nos seis <i>loci</i> microssatélites analisados	29
6	Freqüências dos alelos dos <i>loci</i> SW44, IGF1, ACTG2, LOX12A, TNFB e CGA nos dois grupos genéticos estudados (<i>Sus scrofa scrofa</i> com $2n= 36$ e $2n= 37$ ou 38 comossomos)	36
7	Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg em dois grupos genéticos de javalis	38
8	Diversidade gênica (H_S) para cada <i>locus</i> nos dois grupos genéticos	39
9	Estimadores de variabilidade segundo a metodologia de Nei (1973, 1975) para os dois grupos genéticos	39
10	Teste de diferenciação genética em dois grupos genéticos de Javalis	40
11	Valores de F_{ST} para os dois grupos genéticos	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Distribuição anterior e atual do porco selvagem da Eurásia (<i>Sus scrofa ssp</i>) (Modificado de Oliver, 1993)	08
2 Javali macho (<i>Sus scrofa scrofa</i>)	09
3 Região de amplificação observada no <i>locus</i> SW444 (região estimada: 95-130 pb) Marcador de peso molecular de 10 pb	30
4 Região de amplificação observada no <i>locus</i> IGF1 (região estimada: 230-250 pb) Marcador de peso molecular de 10 pb	30
5 Região de amplificação observada no <i>locus</i> ACTG2 (região estimada: 110-140 pb) Marcador de peso molecular de 10 pb	31
6 Região de amplificação observada no <i>locus</i> ALOX12A (região estimada: 150-170 pb) Marcador de peso molecular de 50 pb	31
7 Região de amplificação observada no <i>locus</i> TNFB (região estimada: 175-210 pb) Marcador de peso molecular de 50 pb	32
8 Região de amplificação observada no <i>locus</i> CGA (região estimada: 325-370 pb) Marcador de peso molecular de 25 pb	32
9 Gel de poliacrilamida 12% desnaturante mostrando a mobilidade dos alelos do <i>locus</i> SW444	33
10 Gel de poliacrilamida 10% desnaturante mostrando a mobilidade dos alelos do <i>locus</i> TNFB	33

RESUMO

No início do século XX, foram trazidos alguns javalis para a Argentina, que acabaram escapando e se espalhando pelo norte da Argentina, Uruguai e Sul do Brasil. Na década de 90 começaram a ser importados alguns animais puros, para fins de criação comercial, principalmente da França e Canadá. Ocorrem no Brasil também animais híbridos com $2n= 37$ ou 38 cromossomos, descendentes do cruzamento do javali ($2n= 36$) com o porco doméstico ($2n= 38$).

O objetivo deste trabalho foi a caracterização genética dos javalis considerados puros, originários da Europa, criados em cativeiros no país, através de marcadores microssatélites, com o intuito de contribuir com o monitoramento da variabilidade genética e sendo assim, auxiliar no manejo e gerenciamento de programas de melhoramento genético.

Para estudar a pureza das linhagens de javalis, assim como estimar a variabilidade genética dentro de alguns grupos, o DNA genômico foi extraído e posteriormente amplificado pela técnica de PCR para análise de microssatélites (IGF1, SW444, ACTG2, LOX12A, CGA e TNFB), os quais foram desenvolvidos para a subespécie *Sus scrofa domestica* (suíno doméstico). As condições de amplificação foram padronizadas para o javali (*Sus scrofa scrofa*). Todos os seis *loci* foram polimórficos, apresentando um total de 36 alelos nos dois grupos genéticos (indivíduos com $2n= 36$ e $2n= 37$ ou 38 cromossomos).

A utilização de iniciadores heterólogos é importante, pois, elimina a necessidade do desenvolvimento de biblioteca genômica, tornando-se um método mais rápido e de menor custo.

Termos para indexação: javali; marcadores microssatélites; iniciadores heterólogos.

1 INTRODUÇÃO

1.1 - MARCADORES DE DNA

Os marcadores de DNA são características do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são transmitidas geneticamente. Os distintos tipos de marcadores hoje disponíveis diferenciam-se pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade no DNA, e variam quanto à habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e repetibilidade (Milach, 1998).

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

Marcadores genéticos considerados seletivamente neutros, como aloenzimas, RFLPs e microssatélites, são freqüentemente usados para quantificar o grau de estruturação populacional.

1.1.1 - Marcadores Microssatélites

Os microssatélites (STRs - *Short Tandem Repeats*) são compostos de repetições em tandem de 2, 4 ou 6 pares de bases (como CA, CAAC ou GGAACC) previamente identificados por triagem de bibliotecas genômicas, com sondas de oligonucleotídeos repetidos em tandem. São extremamente úteis para estudos populacionais por serem altamente polimórficos (Parker *et al.*, 1998).

Um dos primeiros trabalhos com microssatélites sobre diferenciação interpopulacional foi feito em ursos (*Ursus americanus*) em três parques nacionais no Canadá (Paetkaw & Strobek, 1994).

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 histórias de vida (p. ex. sistemas de acasalamentos) 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 freqüentemente geneticamente diferenciadas através do isolamento por distância (i.e. populações mais próximas são geneticamente mais similares que populações mais distantes) (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Como a estruturação genética reflete o número de alelos trocados entre populações, esse fato tem grandes conseqüências na composição genética dos próprios indivíduos. O entendimento do fluxo gênico e seu efeito é central para muitos campos de pesquisa, incluindo a genética de populações, ecologia de populações e biologia da conservação. A troca de genes entre populações homogeniza a freqüência de alelos entre populações e determina os efeitos relativos de seleção e deriva genética. Fluxo gênico alto impede a adaptação local (i.e., a fixação de alelos, que são favoráveis sob as condições locais) e, portanto, também impedirá o processo de especiação (Barton & Hewitt, 1985). Por outro lado, o fluxo gênico gera variabilidade nas populações, e aumenta o tamanho efetivo da população local (a habilidade para resistir a mudanças casuais na freqüência

alélica), gerando novas combinações gênicas onde a seleção pode potencialmente agir (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

O conhecimento da estruturação da população pode resultar em importantes encaminhamentos para estratégias de conservação e manejo (Rossiter *et al.*, 2000).

Devido a sua alta taxa de mutação (10^{-2} a 10^{-6} eventos por *locus* por geração; You-Chu *et al.* 2002) e de serem considerados seletivamente neutros (Schlötterer, 2000), estes marcadores geralmente apresentam grande quantidade de variação. Estas características aliadas ao fato de serem marcadores codominantes espalhados de forma abundante no genoma e geralmente em regiões não transcritas tornam o microssatélite muito útil em estudos populacionais (Schlötterer, 2000).

O mecanismo mais provável de mutação em microssatélites é a replicação "slippage". Este tipo de replicação ocorre em regiões do genoma que contêm as seqüências repetidas de forma contínua. Durante a replicação o mecanismo "slippage" pode ocorrer devido a erros de pareamento em regiões de DNA repetitivo, podendo resultar em deleção ou inserção de unidades repetitivas (Li & Grauer, 1991).

São considerados vários modelos de mutação nos marcadores microssatélites, cada qual relacionado ao modo em que o mecanismo de mutação produz novos alelos. O entendimento do modelo de mutação subjacente a evolução do microssatélite é de grande importância para o desenvolvimento da estatística que reflita exatamente a estruturação genética. Três desses modelos são: o chamado de "alelos infinitos" (IAM; Kimura & Crow, 1964); o "stepwise" (SMM; Kimura & Ohta, 1978) e o "two phase model" (TPM; Di Rienzo *et al.*, 1994).

No IAM, um evento mutacional produz um novo alelo com qualquer número de repetições, sempre resultando em um alelo não encontrado na população. O

modelo SMM implica que um alelo se modifica somente pelo ganho ou perda de uma seqüência repetida e, portanto, criando um alelo possivelmente já existente na população. O TPM é uma ramificação do SMM, desenvolvido para considerar uma proporção de eventos mutacionais maiores (isto é, adição ou deleção de algumas unidades), podendo ou não resultar em alelos já existentes na população. Nesse modelo, a probabilidade de mutação por mudança de apenas uma unidade de repetição é maior, mas não igual a 1 como no SMM. A maioria dos estudos indica que o TPM é o modelo de mutação mais compatível com o padrão de variação em *loci* microssatélites (Ellegren, 2000; Schlötterer, 2000).

Com exceção do IAM, fica explícito nestes modelos que um alelo pode mudar para um novo estado já existente na população e, portanto, gerando homoplasia em tamanho. A homoplasia em tamanho implica que dois alelos idênticos por estado não são necessariamente idênticos por descendência devido a mutações convergentes.

Em 1984, um grupo de cientistas da *Cetus Corporation* desenvolveu um procedimento de amplificação do DNA *in vitro*. Conhecido como reação em cadeia da polimerase (PCR), este método pode produzir grande quantidade de um fragmento de DNA específico de um complexo de DNA molde (*template*) em uma reação enzimática simples (Arnheim & Erlich, 1992).

Desde o advento da PCR nos anos 80, o uso dos microssatélites tem sido extremamente difundido em Biologia. Os *loci* de microssatélites são analisados por amplificação da região alvo usando PCR, seguida por eletroforese em gel de acrilamida para permitir a detecção de alelos que podem diferir em tamanho por apenas duas bases (Parker *et al.*, 1998).

Além da importância na construção de mapas genéticos e análise de ligação (Echard *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1994; Ellegren *et al.*, 1994; Robic *et al.*, 1995; Peelman *et al.*, 1996; Tornsten *et al.*, 1998; Lopez-Corrales *et al.*, 1999), os microssatélites também têm sido utilizados no estudo da estrutura populacional, distância genética de populações e para identificação de indivíduos (Yue *et al.*, 1999). Vários trabalhos aplicam o conhecimento destes polimorfismos para estimar distância genética entre animais domésticos, tais como foram feitos em bovinos (Ciampolini *et al.*, 1995), ovinos (Buchanan *et al.*, 1994; Forbes *et al.*, 1995) e caprinos (Saitbekova *et al.*, 1999).

Como a maioria dos microssatélites 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 *taxa*, através da utilização de iniciadores heterólogos. Marcadores heterólogos de microssatélites têm sido muito empregados em espécies de interesse econômico. Arens *et al.* (2004) isolaram treze *loci* microssatélites na espécie *Geum urbanum* da família Rosaceae e testaram-os em outras 19 espécies de rosas do mesmo gênero. Em alguns casos foram obtidos padrões de muitas bandas, provavelmente devido à amplificação heteróloga. Di Fiore *et al.* (2004) identificaram sete *loci* microssatélites em macacos do gênero *Lagothrix* e testaram sua amplificação em outros 13 gêneros de primatas do Novo Mundo. As temperaturas de anelamento foram diminuídas em 1° C. Os autores concluíram que estes marcadores podem ser úteis para estudos de sistemas de acasalamentos e estrutura genética das populações em muitos primatas neotropicais.

Mas, para que os STRs possam ter tais aplicações, é necessário que algumas análises sejam realizadas, entre estas o estudo da distribuição de suas frequências 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 interesse na estrutura genética das populações naturais surgiu com as sínteses sobre genética de populações publicadas por Fisher (1930) e Wright (1931) e foi estimulado com o desenvolvimento da estatística - F por Wright (1951), a qual é um conjunto de parâmetros usados para quantificar os efeitos genéticos da estrutura populacional.

Para estimar a conectividade e padrões de fluxo gênico entre populações, é utilizado o índice F_{ST} da estatística - F (Wright 1951), o qual foi originalmente definido como a probabilidade de dois alelos idênticos por descendência (provenientes de uma mesma população) serem combinados em um zigoto. De acordo com Balloux & Lugon-Moulin (2002), a estimativa F_{ST} é a mais acurada para populações pequenas que divergiram recentemente.

Assumindo que os marcadores genéticos são seletivamente neutros, o valor de F_{ST} é determinado pelo balanço entre deriva genética e fluxo gênico (Kimura 1983). A deriva genética é causada por flutuações aleatórias nas frequências gênicas devido ao tamanho reduzido da população, fazendo com que dentro das populações a variação genética diminua e entre elas aumente.

1.2 - CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE

Evidências paleontológicas indicam que os porcos originaram-se há cerca de 40 milhões de anos. Atualmente existem porcos selvagens na África (warthog), Ásia

(babirusa) e Europa (javali da Eurásia) (McGlone & Pond, 2003). Evidências de exploração humana dos suiformes datam de 10 mil anos atrás (Oliver, 1993). A classificação filogenética do javali europeu (Oliver, 1993) segue a seguinte ordenação:

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Classe	Mammalia
Ordem	Artiodactyla
Subordem	Suiformes
Família	Suidae
Subfamília	Suinae
Gênero	<i>Sus</i>
Espécie	<i>scrofa</i> (javali europeu e asiático; porco doméstico)

Existem outros dois gêneros na subfamília Suinae, além do *Sus*, que podem ser chamados de "porcos verdadeiros". São eles: *Potamochoerus* e *Hylochoerus*. O gênero *Sus* selvagem habita grandes áreas da Europa e Ásia (Bosma *et al.*, 1996) e apareceu no Velho Mundo no período quaternário, isto é, há aproximadamente 2 milhões de anos (Cavalcanti, 1998).

De acordo com Nowak (1999), o gênero *Sus* compreende apenas cinco espécies vivas atualmente, entre elas a *Sus scrofa* L., uma espécie comum na Eurásia e que ocorre também no noroeste da África; acredita-se na existência de no mínimo 16 (Giuffra *et al.*, 2000) ou 17 subespécies diferentes (Oliver, 1993), como por exemplo, o javali europeu (*Sus scrofa scrofa*), o porco doméstico (*Sus scrofa domestica*) e o javali da Malásia e Indonésia (*Sus scrofa vittatus*), entre outras (Chen & Leibenguth, 1995; Figura 1).



Figura 1 – Distribuição anterior e atual do porco selvagem da Eurásia (*Sus scrofa* ssp.) (Modificado de Oliver, 1993).

Existem várias diferenças morfológicas entre o javali e o porco doméstico (efeitos da seleção artificial). No javali a cauda é sempre reta, o focinho e as patas são escuros, os pêlos do corpo são longos e eles possuem uma crina. A altura dos membros torácicos é ligeiramente maior que dos pélvicos, além de ser um animal mais alto e mais curto que o porco doméstico (Nowak, 1999; Figura 2).



Figura 2 – Javali macho (*Sus scrofa scrofa*)

Na fase adulta chega a medir até um metro de altura e dois metros de comprimento. Os machos podem pesar até 280 kg. A gestação dura aproximadamente 120 dias e cada fêmea tem, por ninhada, de três a seis filhotes. Em média, um javali vive 20 anos. Possui hábitos noturnos e faro muito aguçado.

Em todo o continente americano o javali é considerado um animal exótico. De acordo com a definição do IBAMA, as espécies ou subespécies introduzidas pelo homem, inclusive domésticas, em estado selvagem, ou que tenham entrado espontaneamente em território brasileiro, são consideradas exóticas. Já animais domésticos são aqueles que através de processos tradicionais e sistematizados de manejo e melhoramento zootécnico tornaram-se domesticados, possuindo características biológicas e comportamentais em estreita dependência do homem, podendo inclusive apresentar aparência diferente da espécie silvestre que os originou.

Muito difundidas na maior parte da península da Itália em tempos históricos, populações de javalis sofreram extrema redução durante os séculos XVIII e XIX, devido principalmente à perseguição humana. Recentemente, reduções no tamanho populacional e distribuição geográfica de espécies de caça na Europa como, por exemplo, o javali, foram contrabalançadas por reintroduções descontroladas pelas autoridades locais, sem atenção particular às possíveis conseqüências aos grupos autóctones e à estrutura ecológica em geral (Vernesi *et al.*, 2003). Assim, a densidade populacional desta espécie alcançou níveis tão elevados que os danos agrícolas foram freqüentemente relatados, assim como o distúrbio à fauna nativa (especialmente cervos e predação de ovos de pássaros) e à flora (Vernesi *et al.*, 2003).

No final do século XIX ocorriam duas subespécies de javalis na Bulgária (*Sus scrofa attila* e *Sus scrofa lybicus*). Como conseqüência de guerra local e da I Guerra Mundial (1914 – 1918), a espécie desapareceu de muitas regiões e o número decresceu devido ao grande acréscimo na atividade de caça. No final dos anos 50 houve um aumento gradual da população de javalis como resultado de medidas legais empreendidas para proteger a espécie, e também por causa da reintrodução de animais criados em fazendas da parte nordeste do país (Genov *et al.*, 1991).

Javalis vivendo livres foram extintos na Grã-Bretanha há 700 anos. Recentemente, duas populações estabeleceram-se por conta própria no Sul da Inglaterra (em Kent e East Sussex) após escaparem do cativeiro. A reintrodução do javali na Grã-Bretanha para restabelecer uma espécie cuja extinção foi certamente devida ao homem foi bastante discutida. Diretrizes para a reintrodução de uma espécie (IUCN, 1993), dita que esta requer indivíduos de uma subespécie o mais próxima possível ao genótipo local original (Goulding, 2001).

De um modo geral, os intercruzamentos entre subespécies selvagens e porcos domésticos, assim como a plasticidade geográfica tornam confusa a taxonomia das diferentes subespécies de javalis. A subespécie da população extinta da Grã-Bretanha é desconhecida, mas provavelmente, era mais similar a *Sus scrofa scrofa*, a subespécie cuja dispersão abrange toda a Europa Ocidental (Genov, 1999).

O *status* genético das populações britânicas de *Sus scrofa* vivendo livres é desconhecido, isto é, se são realmente javalis ou híbridos de javalis com porcos domésticos. Alguns fazendeiros que criam javalis na Grã-Bretanha cruzam javalis machos de raça pura com fêmeas de porco doméstico para obter ninhadas maiores e aumentar a taxa de crescimento dos leitões. Se o javali de vida livre do Sul da Inglaterra escapou de algum criatório, o escape pode ter sido de javalis puros, híbridos, ou uma mistura de ambos (Goulding, 2001).

Os animais das populações de Kent e East Sussex têm a aparência de javali, entretanto, animais híbridos contendo até 25% de sangue de porco doméstico ainda seriam fenotipicamente muito similares ao javali puro (Goulding, 2001).

A função da imprensa na formação da opinião pública divulgando material relacionado à vida selvagem tem se tornado uma fonte de apoio importante para conscientização da necessidade de manutenção da vida selvagem. No caso da reintrodução ou programa de recuperação para espécies ameaçadas, uma resposta positiva pode ser importante se o suporte público é ganho. Ao contrário, uma cobertura desfavorável da imprensa pode ser uma séria desvantagem, especialmente para programas envolvendo grandes animais (Goulding & Roper, 2002).

A notícia mais freqüentemente divulgada em relação aos javalis é o medo de que eles ataquem humanos. No entanto, não há qualquer notícia confirmada de javalis atacando humanos sem serem provocados. O tamanho da população é grande, sobretudo na Europa Continental, sem constituir um sério risco à segurança humana (Goulding & Roper, 2002). Entretanto, a ênfase da imprensa do Reino Unido sobre a suposta agressividade do javali em direção ao homem pode ser um exemplo do que Soulé (1990) chamou de “Biofobia”, isto é, um medo irracional por poder ser atacado, ou contrair doenças da vida selvagem. Soulé (1990) teme que a biofobia possa prejudicar tentativas de conservar e reintroduzir a vida selvagem.

Há uma preocupação real no sentido de que o javali cause dano significativo a uma variedade de produtos agrícolas no continente europeu, e também no Brasil, e que abrigue doenças que possam ser transmitidas aos animais domésticos com conseqüências econômicas potencialmente sérias.

Na França, o estabelecimento de um esquema de compensação nos anos 70 mudou dramaticamente as atitudes públicas com o javali, que era considerado como uma peste para a agricultura que deveria ser erradicada, mas é agora considerado uma valiosa espécie de caça. Os efeitos ecológicos positivos e negativos do javali são um assunto sobre o qual a evidência científica relevante é inconclusiva (Goulding & Roper, 2002).

Na América do Sul, os primeiros javalis foram introduzidos da Europa pelo Sr. Pedro Luro, proprietário do rancho *San Huberto*, próximo à cidade de Santa Rosa, província de La Pampa, Argentina, durante o período de 1904-1906. Esses javalis foram mantidos em um cercado de 800ha, mas alguns conseguiram escapar tornando-se selvagens pouco tempo depois (Daciuk, 1978). Os javalis podem ser encontrados hoje, em estado selvagem, na Argentina, Uruguai e Sul do Brasil.

O maior interesse sobre as conseqüências de invasões de vertebrados dá ênfase em perdas econômicas e impactos ambientais (ou ecológicos). O javali (*Sus scrofa*) e o cervo vermelho (*Cervus elaphus*) estão entre os ungulados mais invasivos no Chile e na Argentina. O javali é considerado prejudicial no Chile e na Argentina ele é considerado uma praga não só porque destrói lavoura, mas também porque preda cordeiros, cabras e alguns animais pequenos da fauna nativa (Jaksic, 2002).

No Brasil, na década de 90, começaram a ser importados alguns animais considerados puros ($2n = 36$ cromossomos, de acordo com Darré *et al.*, 1992), principalmente da França e Canadá. Ocorrem no país também animais híbridos férteis com $2n = 37$ ou 38 cromossomos resultantes do cruzamento do javali com o porco doméstico ($2n = 38$ cromossomos). O híbrido é de difícil constatação morfológica, uma vez que apresenta fenótipo semelhante ao javali; sua identificação só pode ser feita com segurança através de exame citogenético. McFee & Banner (1969) não registraram nenhuma evidência de fertilidade reduzida associada com estes diferentes números cromossômicos.

Segundo Vernesi *et al.* (2003) a integridade genética e, conseqüentemente, a existência dos diversos grupos nativos, é ameaçada pela hibridação. A hibridação introgressiva entre taxa proximamente relacionados pode ter sérias implicações conservacionistas, políticas e econômicas, porque isto pode levar a conseqüências positivas (aumento da diversidade genética e da adaptação) e negativas (perda da diversidade genética, assimilação genética, depressão *outbreeding*) para a viabilidade da população. De qualquer maneira, o desenvolvimento de novas técnicas moleculares tem permitido verificar a introgressão, a taxa de parentesco taxonômico e a história do fluxo gênico (Haig, 1998).

O interesse pela criação comercial do javali deve-se à sua carne de excelente sabor e ótima qualidade nutricional (Vitic & Stevanovic, 1993; Wolkers *et al.*, 1993; Andersson-Eklund *et al.*, 1998). Além da carne, são de interesse seus derivados, como presuntos de pernil, paleta, defumados de lombo, patês, embutidos como salames e lingüiças. O couro pode servir para confecção de casacos, luvas e, finalmente, as cerdas são utilizadas na Europa na fabricação de pincéis e escovas de cabelo, por exemplo. Os javalis são também caçados por esporte em algumas partes do mundo.

Considerando que essa espécie exótica já foi introduzida no Brasil, algumas iniciativas poderiam (e deveriam) ser tomadas: 1) Prevenir (ou impedir) a fuga dos indivíduos em cativeiro; 2) Monitorar as populações; 3) Promover a educação pública em relação ao impacto dessa espécie; 4) Avaliar o seu uso econômico potencial; 5) Firmar acordos a respeito dessa espécie, com países que fazem fronteira com o país.

2 JUSTIFICATIVA

A agrobiodiversidade é um componente crítico da biodiversidade global. Mais de 75% da produção mundial de alimentos provêm de por pouco mais de 25 espécies domésticas de plantas e animais (Abreu *et al.*, 1998). Sabe-se que o aumento da população humana deverá ocorrer principalmente nos países em desenvolvimento, que serão, inevitavelmente, obrigados a aumentar a produção de alimentos.

O desenvolvimento da genômica combinado com novas técnicas de reprodução poderão mudar e melhorar a maneira como o criador faz e orienta o melhoramento genético (Rothschild & Plastow, 1999).

O javali (*Sus scrofa scrofa* L.), suíno que foi introduzido no Brasil através de importações recentes, enquadra-se perfeitamente nas tendências alimentares de nossos dias que têm seu foco direcionado para produtos orgânicos/naturais. O desenvolvimento da criação de javalis em nosso país esbarra muitas vezes em algumas dificuldades como a obtenção de animais puros, isto é, que não sejam descendentes do cruzamento do javali com o porco doméstico, quer sejam capturados vivos nos seus ambientes naturais ou oriundos de criatórios comerciais. Os javalis que vêm se adaptando às condições típicas brasileiras, não possuem até o momento nenhuma análise molecular com microssatélites.

A identificação de marcadores genéticos estáveis pode contribuir para discriminar linhagens e indivíduos, auxiliando no monitoramento de estoques e no desenvolvimento de programas de melhoramento genético. Nos criatórios, em geral, utilizam-se poucos reprodutores, o que ocasiona uma diminuição da variabilidade genética da progênie, especialmente pela perda de alelos raros em diferentes *loci*.

Outro problema comum é o emprego de animais nascidos em cativeiro como progenitores das próximas gerações, conduzindo à redução da heterozigose média e, às vezes, à exposição de genes recessivos prejudiciais.

A domesticação dos animais selvagens é um importante evento na história da humanidade. Tem sido intrigante identificar os ancestrais selvagens dos animais domésticos, inferir a difusão de uma civilização à outra e a evolução dos animais sob domesticação (Huang *et al.*, 1999).

O presente trabalho tem o intuito de contribuir com o monitoramento da variabilidade genética e sendo assim, auxiliar no manejo e gerenciamento de programas de melhoramento genético.

3 OBJETIVO

O presente trabalho objetiva:

- Caracterizar geneticamente javalis (*Sus scrofa scrofa*) puros e híbridos criados no Brasil, originários da Europa, através de *loci* de microssatélites (STRs) do porco doméstico (*Sus scrofa domestica*)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1- CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

No presente trabalho foram utilizadas amostras de sangue e testada a utilização de amostras de pêlo, de javalis puros $2n= 36$ cromossomos (*Sus scrofa scrofa* L.) e híbridos de javalis com o porco doméstico ($2n= 37$ ou 38 cromossomos) de ambos os sexos, de criatórios comerciais dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, originários da Europa e Canadá. As procedências dos animais foram, em geral, atestadas por certificados de pureza racial; no entanto, em algumas propriedades não existe tal controle.

De todos os animais tentou-se obter o máximo de informações que pudessem auxiliar no desenvolvimento deste trabalho, conforme ficha de coleta (Anexo I).

4.2- EXTRAÇÃO DO DNA DE PÊLOS

O DNA foi isolado das células dos pêlos através da digestão pela proteinase K, baseado na metodologia de Higuchi (1989) com modificações, de acordo com os seguintes passos: Foram selecionados cerca de cinco pêlos com bulbo e cortados 3-5 mm de cada pêlo incluindo o bulbo e colocados em microtubos de polipropileno de 0,5 ml. Posteriormente foram acrescentados o tampão de lise contendo 100 μ l de tampão estoque (Anexo II) e 5 μ l de Proteinase K (PTK) (20 mg/ml). Em seguida as amostras foram incubadas em um termociclador a 60° C por 45 min e, para inativar a PTK, aquecidas a 95° C por 45 min e armazenadas a -20° C.

4.3- COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE SANGUE

O sangue foi obtido por punção na veia jugular dos animais através de seringas descartáveis de 5,0 ml e agulhas descartáveis de 1,2 x 40 mm e depois transferido e armazenado em tubos a vácuo contendo EDTA como anticoagulante. As amostras de sangue total depois de alguns dias na geladeira, formaram duas fases, hemácias, com o anel de leucócitos imediatamente acima, e plasma. O plasma foi transferido para microtubos de 1,5 ml e estocado a -20° C. O sangue total então, foi homogeneizado e procedeu-se a coleta de 50 µl deste e armazenado em microtubos de 1,5 ml para o procedimento posterior de extração do DNA. No sangue total restante foi acrescentado 1,0 ml de tampão de estocagem de eritrócitos contendo glicerol a 40% (Anexo II), homogeneizado e estocado a -20° C.

4.4- EXTRAÇÃO DO DNA DE SANGUE

O DNA foi extraído segundo a metodologia de Higuchi (1989), com modificações, a partir da alíquota de 50 µl de sangue total do item anterior ao qual foi adicionado 1,0 ml de tampão de lise de eritrócitos (vide Lise I em Anexo II). Após homogeneização seguiu-se centrifugação por dois minutos a 6000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O procedimento de lavagem com Lise I foi repetido até que o precipitado ficasse claro, indicando ausência de hemoglobina. Logo após, o precipitado foi ressuspensão em um *mix* contendo 300 µl de tampão de lise de leucócitos (vide Lise II em Anexo II) e 5 µl de proteinase K (10 mg/ml) e deixado em estufa *overnight* a 67° C. A seguir as amostras foram transferidas para microtubos menores de 0,5 ml e colocadas em um termociclador a 94° C por 10 minutos para inativar a proteinase K e, então, estocadas a -20° C até o momento da análise.

4.5- TESTE PARA EFICIÊNCIA DAS EXTRAÇÕES

Foi verificada a presença de DNA nas amostras através de eletroforese em gel de agarose 0.8 % a 3 V/cm de distância entre os eletrodos e posteriormente corado com Brometo de Etídio. Após a coloração, o gel foi visualizado sob luz ultravioleta em um transiluminador.

4.6- INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES

A reação em cadeia da polimerase é um método de amplificação *in vitro* do ácido nucléico. Para que uma seqüência de DNA-alvo seja amplificada, é primordial que se conheçam, ao menos, pequenas seqüências flanqueadoras de ambos os lados. Através destas seqüências flanqueadoras serão sintetizados dois oligonucleotídeos denominados *primers* (iniciadores).

Foram utilizados seis pares de iniciadores (Tabela 1) para amplificação dos *loci* de microssatélites selecionados do projeto genoma do porco (Rothschild, 2001). Dos seis *loci* estudados, apenas o ALOX12A apresentou o tamanho da repetição do tipo mononucleotídeo, todos os outros foram dinucleotídeos.

Tabela 1 - Pares de iniciadores para amplificação de *loci* de microssatélites do porco doméstico

Locus	Seqüência dos iniciadores (5' - 3')	Produto Gênico	Cromossomo	Referências
SW444	ATAGTTTCGGTTGGCCCAG CTTAAGCCTCAAGCTAACAGGC	-	8	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CACTTGAGGGGCAAATGATT	Insuline-like growth factor 1	5	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
ACTG2	CATCTTCCTCTTCCCTTCCC TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC	Gamma Actin	3	Sun & Kirkpatrick, 1996
ALOX12A	CTTCAATGGTGCAAGTGGGTTG	Arachidonate 12-lipoxygenase	12	Ellegren <i>et al.</i> , 1994

	ACTTTAATCAGATACAGAAGTTGG			
TNFB	CTGGTCAGCCACCAAGATTT GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC	Tumor necrosis factor β	7	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
CGA	GTCACAGTGGATGGCATTG ACATCCCTAAGGTCGTGGC	Pituitary glycoprotein hormone	1	Troyer <i>et al.</i> , 1994

4.7- AMPLIFICAÇÃO POR PCR

A reação compreende ciclos térmicos repetidos. Cada ciclo de PCR compreende uma série de incubações controladas de tempo e temperatura. A função de cada incubação é: 1) desnaturar o ácido nucléico alvo em uma temperatura em torno de 94° C; 2) *primers* (iniciadores) anelam em uma temperatura de anelamento calculada (usualmente variando de 30 - 60° C); 3) o iniciador é percorrido pela DNA polimerase termoestável que catalisa a adição de nucleotídeos no final 3' de cada iniciador a uma temperatura de cerca de 72° C (Newton, 1995). Uma das formas mais simples de calcular a temperatura de anelamento (T_m), e que, portanto, vale mais como uma aproximação, é de acrescentar 2° C para cada A ou T e 4° C para cada C ou G do iniciador (Sambrook *et al.*, 1989).

A DNA polimerase catalisa a síntese de uma longa cadeia polinucleotídica de monômeros dNTP (desoxiribonucleosídeos fosfatos), usando uma das cadeias originais (mãe) como molde para a síntese de uma cadeia complementar nova. A síntese de DNA ocorre na direção 5' para 3' visto que a polimerização é do 5' α - fosfato do dNTP para o 3' hidroxila terminal da cadeia de DNA. Os dNTPs usados na síntese do DNA compreendem dATP, dCTP, dGTP e dTTP. Esses dNTPs são covalentemente ligados ao grupo hidroxila livre do iniciador e formam uma cadeia complementar sintetizada (Newton, 1995).

Em cada microtubo (rotulados com o número da PCR mais o número de ordem) foram pipetados o DNA genômico (quantidade padronizada para cada *locus*, de acordo com a Tabela 2) mais uma gota de óleo mineral e, posteriormente, os microtubos foram colocados em um termociclador por 10 minutos a 94°C, para a pré-desnaturação do DNA genômico.

Em uma bancada livre de contaminação foi preparada a mistura do DNA com o mix da PCR (Tabela 2).

Tabela 2 – Soluções para reações de amplificação

<i>Locus</i>	DNA	Tampão Taq 10x	DNTPs 30 µM	Iniciador 0,25 µM	MgCl ₂	Taq DNA polimerase (1U/µl)
SW444	6,0 µl	2,5 µl	0,25 µl	2,0 µl	1,0 µl	0,6 µl
IGF1	5,0 µl	2,5 µl	0,25 µl	2,0 µl	1,5 µl	0,5 µl
ACTG2	5,0 µl	2,5 µl	0,25 µl	3,0 µl	1,5 µl	0,5 µl
ALOX12A	4,0 µl	2,5 µl	0,25 µl	3,0 µl	1,5 µl	0,5 µl
TNFB	3,0 µl	2,5 µl	0,25 µl	2,0 µl	1,5 µl	0,5 µl
CGA	5,0 µl	2,5 µl	0,25 µl	2,0 µl	1,5 µl	0,5 µl

*Foi acrescentado H₂O suficiente para completar o volume final de 25 µl

Após acondicionar cada microtubo em um termociclador Stratagene Robocycler 40, seguiu-se à amplificação em programas padronizados para cada *locus* (Tabela 3).

Tabela 3 – Programas para reações de amplificação

Locus	Programa
SW444	94°C por 3'; 60°C por 1'; 72°C por 1' (1 ciclo) 92°C por 1'; 55°C por 1'; 72°C por 1' (30 ciclos) 72°C por 10' (1 ciclo)
IGF1	94°C por 3'; 58°C por 1'; 72°C por 1' (1 ciclo) 94°C por 1'; 53°C por 1'; 72°C por 1' (30 ciclos) 72°C por 10' (1 ciclo)
ACTG2	94°C por 3'; 55°C por 1'; 72°C por 1' (1 ciclo) 92°C por 1'; 50°C por 1'; 72°C por 1' (27 ciclos) 72°C por 10' (1 ciclo)
ALOX12	94°C por 3'; 40°C por 1'; 72°C por 1' (1 ciclo) 92°C por 30"; 35°C por 30"; 72°C por 30" (25 ciclos) 72°C por 10' (1 ciclo)
TNFB	94°C por 3'; 67°C por 1'; 72°C por 1' (1 ciclo) 94°C por 1'; 57°C por 1'; 72°C por 1' (24 ciclos) 72°C por 10' (1 ciclo)
CGA	94°C por 3'; 55°C por 1'; 72°C por 1' (1 ciclo) 92°C por 1'; 50°C por 1'; 72°C por 1' (24 ciclos) 72°C por 10' (1 ciclo)

4.8- PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DO PRODUTO DE PCR

Depois da amplificação, as amostras foram aplicadas em um gel de poliacrilamida não desnaturante a 10% (Anexo II), submetido a 200 V por aproximadamente duas horas. O gel foi colocado na cuba de eletroforese vertical contendo TBE 10X (Anexo II) na parte superior e inferior e preso com grampos. Cada amostra continha 5 µl de cada produto de PCR misturados a 5 µl de tampão de corrida ("loading buffer") (Anexo II), para testar a eficiência da reação de

amplificação e estimar o tamanho dos fragmentos (região de amplificação) com o auxílio de marcadores de peso molecular de 10 pb, 25 pb (*Life Technologies-Gibco BRL*) e 50 pb (*Amersham Pharmacia Biotech*).

As amplificações foram consideradas positivas quando o gel apresentava uma ou duas bandas, com tamanho (pb) relacionado ao da espécie original (através do marcador de peso molecular) para a qual o iniciador foi desenvolvido. Por se tratar de amplificação heteróloga, tomou-se o cuidado de repetir no mínimo três vezes todos os passos envolvidos na amplificação.

Posteriormente, 5 μ l do produto da PCR misturados com 7 μ l de tampão de corrida contendo formamida a 75% foram desnaturados por aquecimento a 94°C por 10 minutos e imediatamente colocados em um banho com gelo. A seguir foram analisados eletroforéticamente em gel desnaturante (uréia) de poliacrilamida (Anexo II), com a concentração do gel e o tempo de corrida padronizados de acordo com cada *locus* (Tabela 4).

Tabela 4 – Condições para eletroforese de cada *locus* estudado

<i>Locus</i>	Concentração do Gel	Tamanho do Gel	Voltagem/ Amperagem	Tempo de Corrida (horas)
SW444	12%	20 cm	15 mA	4:30
IGF1	15%	20 cm	320 V	18:30
ACTG2	10%	20 cm	20 mA	3:30
ALOX12	10%	20 cm	20 mA	5:00
TNFB	10%	20 cm	20 mA	4:30
CGA	10%	20 cm	20 mA	7:30

A visualização das bandas no gel foi realizada diretamente através de coloração com nitrato de prata (20%) descrita por Sanguinetti *et al.* (1994).

Depois de realizada a leitura do gel, este foi secado para ser guardado. A secagem foi feita retirando-se o gel da solução fixadora e em seguida embalando-o entre duas folhas de papel celofane embebido em água, sendo que a primeira folha envolvia uma placa de vidro. A secagem completa se efetuava deixando-se o gel à temperatura ambiente por alguns dias.

4.9- SEQÜENCIAMENTO

Para o seqüenciamento foi realizada a amplificação do fragmento de DNA numa reação de PCR contendo: 4,0 µl do DNA purificado, 4,0 µl do iniciador (50 µM) e 7,0 µl do Kit Dyenamic (*Amersham Biosciences*).

Para a purificação do DNA foi utilizado 8,0 µl do DNA amplificado mais 4,0 µl do Kit de purificação Exosap (*Eppendorf*) e posteriormente procedeu-se de acordo com o programa padrão do Kit de purificação (15' a 37° C; 15' a 80° C).

Na reação de seqüenciamento foi utilizado o programa padrão do Kit Dyenamic (95° C – 5'; 95° C – 20"; 50° C – 15"; 60° C – 1' por 25 a 30 ciclos).

4.10- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.10.1- Estimativa das Frequências Alélicas e Genotípicas

Com base nos dados gerados, foram estimadas as frequências gênicas pelo programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995). Os sistemas analisados apresentam alelos codominantes, que permitem inferir os genótipos a partir dos respectivos fenótipos.

4.10.2- Aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A aderência das frequências genóticas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995). Com o emprego do algoritmo de Guo & Thompson (1992) que utiliza o método da cadeia de Markov, a hipótese nula (H_0) de união dos gametas foi testada como proposto por Haldane (1954). Este procedimento foi realizado para cada *locus* por amostra e a significância global para cada *locus* foi estimada para o teste exato de Fisher (1954) com probabilidade combinada.

4.10.3- Diferenciação Genética das Populações

Os testes exatos de diferenciação populacional foram realizados com o uso da opção 3 do programa GENEPOP. Este utiliza tabelas de contingência $R \times C$ geradas automaticamente para cada *locus*. O método da cadeia de Markov foi aplicado para fornecer uma melhor aproximação da probabilidade exata das diferenças. Este procedimento analisa cada *locus* para um grupo de populações, para determinar se existem diferenças nas frequências alélicas observadas, onde a hipótese nula testada (H_0) é: “a distribuição alélica é idêntica entre as populações” (Raymond & Rousset, 1995b). A diferenciação genotípica foi realizada pelo teste exato G (Goudet *et al.*, 1996), que tem o mesmo princípio e testa a hipótese H_0 : “a distribuição genotípica é idêntica entre as populações”.

4.10.4- Diversidade Gênica e Estrutura Populacional

As análises foram realizadas com o uso da estatística F de Wright (1951) que permite a partição da deficiência de heterozigotos em seus componentes intra-populacional e inter-populacional. Assim, são definidos três parâmetros: F_{IS} , que

mede o déficit de heterozigotos dentro de populações, F_{ST} , que mede o déficit de heterozigotos entre populações e F_{IT} o déficit global de heterozigotos. A estimativa destes parâmetros foi realizada segundo a metodologia de Nei (1973, 1975) e para tanto foi utilizado o programa FSTAT (Goudet,1999).

Segundo Nei (1973, 1975) são obtidos os seguintes estimadores:

H_O , é a proporção observada de heterozigotos;

H_S , é a heterozigose esperada média dentro das populações;

H_T , é a heterozigose média total, ou diversidade gênica;

D_{ST} , é a quantidade de diversidade gênica entre as populações, definida como a diferença entre $H_T - H_S$. Como esta é dependente do número de populações, é definida como D_{ST}' , a qual independe do número de populações;

G_{ST} é o coeficiente de diferenciação genética, o qual é a razão entre a diversidade entre populações e a variação genética da população como um todo, ou D_{ST}/H_T , sendo, portanto, um estimador do parâmetro F_{IS} . G_{ST}' é o estimador equivalente, independente do número de populações;

G_{IS} é o estimador de F_{IS} .

Estes parâmetros foram calculados considerando-se seis *loci* do tipo STR nos dois grupos genéticos analisados no presente estudo.

O número médio de alelos por grupo genético também foi calculado, e corresponde à soma de todos os alelos encontrados em todos os *loci* em cada grupo genético dividido pelo número de *loci* analisados.

4.10.5- Distância Genética

A distância de Reynolds *et al.* (1983) é baseada nos valores de F_{ST} e estima o tempo necessário para o surgimento de determinado nível de variância entre as

freqüências gênicas de diferentes populações. Esta medida foi utilizada para verificar a relação entre os dois grupos genéticos, baseando-se nos dados obtidos para seis *loci* do tipo STR.

5 RESULTADOS

Foram testados dois protocolos de extração de DNA, um de extração de DNA de pêlos e outro de extração de DNA de sangue. Os resultados obtidos com a utilização do protocolo I não foram satisfatórios, mas o protocolo II foi eficiente.

Para que ocorresse a amplificação houve a necessidade de se reduzir as temperaturas de pareamento tornando-as mais apropriadas para a subespécie em estudo. Maiores reduções foram necessárias nas análises dos *loci* ALOX12A (com uma redução de 23°C) e CGA (com uma diminuição de 15°C) e as menores nos *loci* TNFB e IGF1 com reduções de 3°C e 5°C, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Comparação da temperatura de pareamento, amplitude de tamanho das bandas e número de alelos encontrados em *Sus scrofa domestica* (na literatura) e *Sus scrofa scrofa* nos seis *loci* microssatélites analisados.

Locus	Temperatura de Pareamento		Amplitude de Tamanho		Número de Alelos	
	S. s. domestica	S. s. scrofa	S. s. domestica	S. s. scrofa	S. s. domestica	S. s. scrofa
SW444	60°C	55°C	92-120	95-130	7	4
IGF1	58°C	53°C	223-237	230-250	12	6
ACTG2	58°C	50°C	109-142	110-140	9	8
ALOX12A	58°C	35°C	143-155	150-170	6	3
TNFB	60°C	57°C	174-213	175-210	10	8
CGA	65°C	50°C	322-366	325-370	7	7

Quanto às regiões de amplificação observadas no gel não-desnaturante de poli-acrilamida, utilizando-se marcadores de peso molecular de 10pb, 25pb e 50pb, houve coincidência entre a subespécie de origem (*Sus s. domestica*) e *Sus s. scrofa*

em todos os seis *loci* estudados. Aumentos de cerca de 10 pb em IGF1 e ALOX12A foram observados (Tabela 5; Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

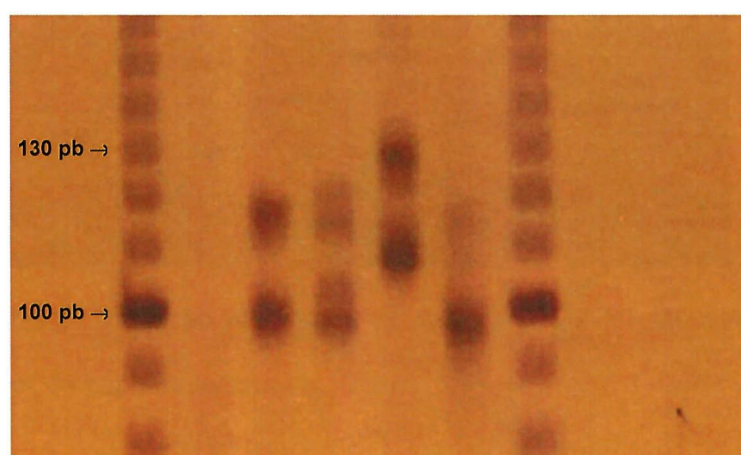


Figura 3 - Região de amplificação observada no *locus* SW444 (região estimada: 95-130 pb).
Marcador de peso molecular de 10 pb.

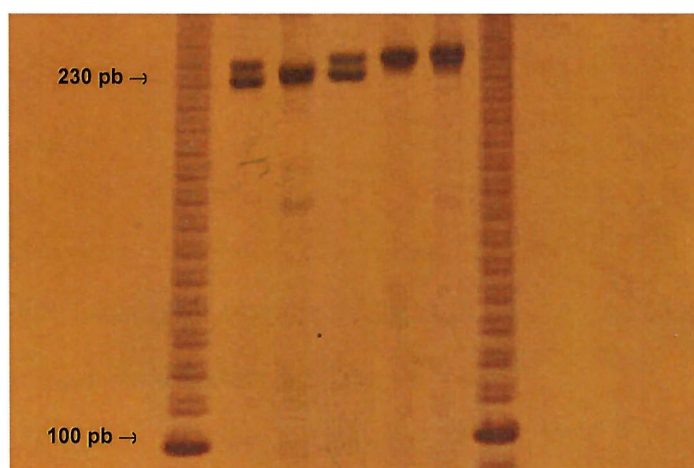


Figura 4 - Região de amplificação observada no *locus* IGF1 (região estimada: 230-250 pb).
Marcador de peso molecular de 10 pb.

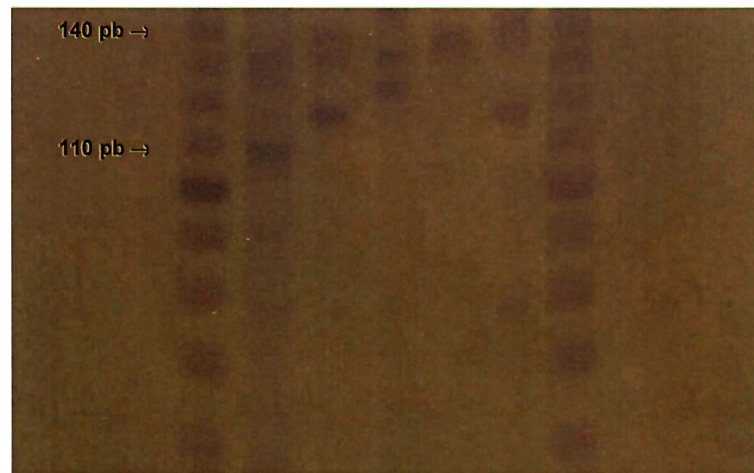


Figura 5 - Região de amplificação observada no *locus* ACTG2 (região estimada: 110-140 pb). Marcador de peso molecular de 10 pb.

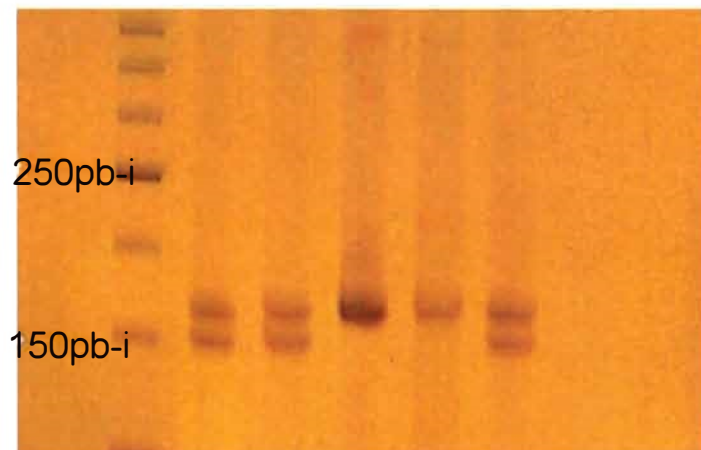


Figura 6 - Região de amplificação observada no *locus* ALOX12A (região estimada: 150-170 pb). Marcador de peso molecular de 50 pb.

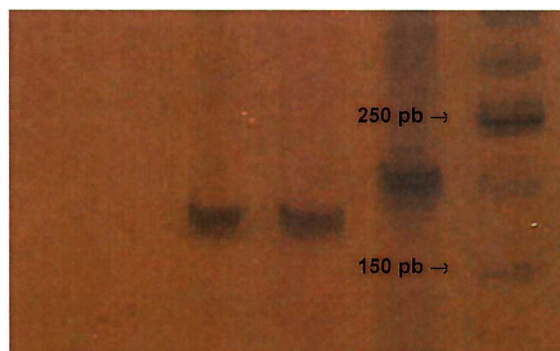


Figura 7 - Região de amplificação observada no *locus* TNFB (região estimada: 175-210 pb).

Marcador de peso molecular de 50 pb.

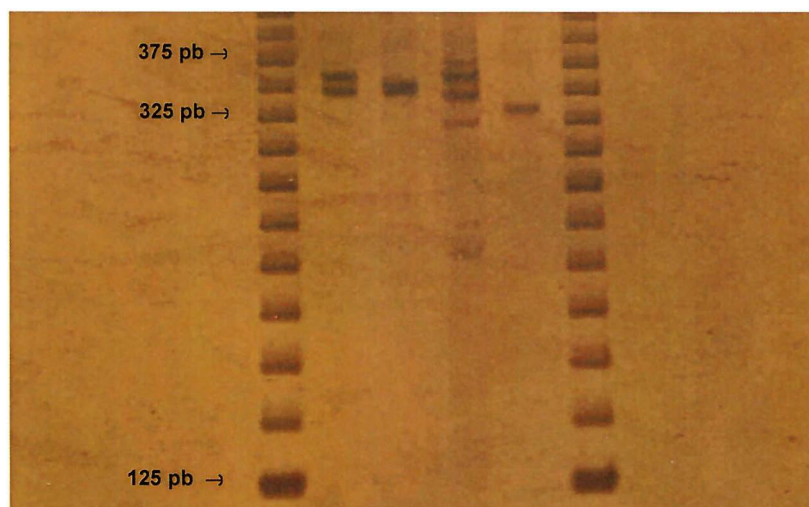


Figura 8 - Região de amplificação observada no *locus* CGA (região estimada: 325-370 pb).

Marcador de peso molecular de 25 pb.

A visualização dos alelos nos seis *loci* analisados através da técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida seguida de coloração com nitrato de prata foi considerada satisfatória. Considerando os dois grupos genéticos ($2n= 36$ e $2n= 37$ ou 38 cromossomos) analisados, foram identificados trinta e seis alelos na análise dos seis *loci* (Tabela 5), sendo quatro no *locus* SW444 (Figura 9), seis no

IGF1, oito no ACTG2, três no LOX12A, oito no TNFB (Figura 10) e sete alelos no CGA. Em se tratando de iniciadores heterólogos, é de se esperar uma redução no número de alelos observados. Todos os seis *loci* analisados foram polimórficos.

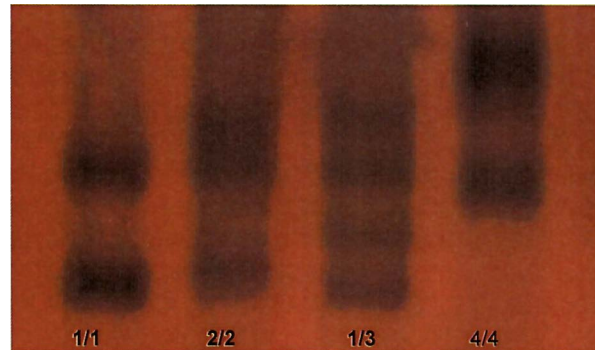


Figura 9 – Gel de poliacrilamida 12% desnaturante mostrando a mobilidade dos alelos do *locus* SW444.

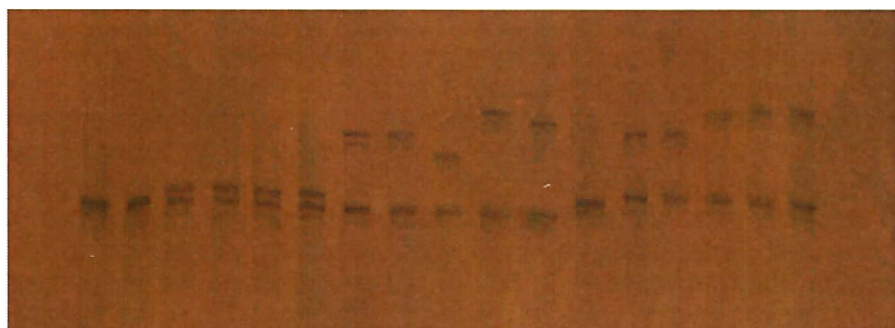


Figura 10 – Gel de poliacrilamida 10% desnaturante mostrando a mobilidade dos alelos do *locus* TNFB.

5.1- SEQÜENCIAMENTO

Foi obtida a seqüência do alelo 9 do *locus* CGA (indicada abaixo), no entanto, não foi possível distinguir os iniciadores devido à grande ocorrência de bases inespecíficas (N).

Comparando a seqüência obtida do *locus* CGA com o seqüência encontrada no GenBank (número de acesso: D00768) do porco doméstico, foi possível observar que a seqüência do microssatélite foi conservada no javali.

CGA-Javali

```
NCCNNNGNCNCTNCTTNGNAAGGGNNCCCTCNCNNGAGAANNNNCCCTTGNGAATCCNNNNNGGGGN
TCGAGANCNNNGTNGAGGAATGATCAAACCTCANGTCTNAANTTTCCCANCTCTCTGNCGTTNCTNNC
TTTNTTTCTNCTTTTCTNCTNCTNCTGNCTNCTTTCTCNCNTNCTNTCNCTCTTTCTTTCTTT
CTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
NTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TTANGGATNTACNCCTACTACCCCCNCCNACCCAANCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN
ANNCCCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN
CACACANNANNNCNCAGCACNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCT
NACCANNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCC
TCNCCANNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCN
CGTNNAACTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTNCTN
CNNNACCCCCGGGCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCCNCC
```

Motif: (CT)_{1s}

CGA – porco doméstico

```
TACACATTCTCTTTCTGCATTTACCATTGAACTGGGAGGAAGTCTGCAAAAATCTGGTCTGTGATCA
CAGGCTAAGATGTTATCTAACAGAAGCCAGAAACCAACTGCCTCCTCCAGAGATGTGTGAGGGCCTGT
CAGTATCTAATATTTCCCTCAAGACACAGTGGATGGCATTGAAAGACATTCTTTTAGTGGCTACCA
GGGATCAGGCAGAGGGGGAATAGACATTATGTAAGTTGCTGATTTTCTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTT
TCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCTTTCT
TTCTTTCTGGCCACGACCTTAGGGATGTGAAAGTTCTGGGCTGGGATGAAACCCTCACCACAGCAGT
GACCTGAGTTGCTGCAGTGACAATGCAGGATCCTTAACCTGCTGAGCCACAGGGGAAACCCTGTCATC
AGGTTTTAAATGATGCATAACTATATCTTCAAGCTGGACAGTGGTAAAGCAGCTCATCTGCTCAGCTG
AAGGACCAGATGCTTTTAATTCTTTGAGTAGATGCTCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNTTTACCTCTTTCTAAAGGGAAATTGCTTTTTTATACATGGCTTTAGAGTGTGTTGGGAGCTGTA
AGCAGAGGGTTAAGAA
```

Motif: (CT)_{1s}

As seqüências abaixo são dos outros *loci* analisados no trabalho, encontrados no GenBank. Apenas a seqüência do *locus* GACT não encontrava-se disponível para acesso.

Tabela 6 – Frequências dos alelos dos *loci* SW444, IGF1, ACTG2, LOX12A, TNFB e CGA nos dois grupos genéticos estudados (*Sus s. scrofa* com 2n= 36 e 2n= 37 ou 38 cromossomos).

<i>Locus</i>	Alelos	Frequência Alélica (%)	
		<i>Sus s. scrofa</i> (2n= 36)	<i>Sus s. scrofa</i> (2n= 37 ou 38)
SW444	1	71,40	33,30
	2	-	50,00
	3	2,90	16,70
	4	25,70	-
IGF1	1	10,00	8,30
	2	10,70	33,30
	3	22,10	50,00
	4	9,30	-
	5	25,70	8,30
	6	22,10	-
ACTG2	1	-	33,30
	7	42,10	25,00
	10	9,30	-
	15	24,30	41,70
	16	4,30	-
	18	10,00	-
	20	8,60	-
	21	1,40	-
ALOX12A	1	-	33,30
	2	43,60	50,00
	3	56,40	16,70
TNFB	1	25,00	41,70
	2	32,10	-
	7	-	25,00
	9	12,90	33,30
	10	2,10	-
	11	11,40	-
	12	12,10	-
	14	4,30	-

CGA	1	0,80	-
	4	28,80	33,30
	7	1,50	33,30
	9	47,00	8,30
	10	0,80	-
	11	6,10	-
	12	15,20	25,00

O Teste exato foi aplicado e revelou desequilíbrio entre as proporções observadas e esperadas nos *loci* IGF1, ACTG2, ALOX12A e TNFB no grupo genético 2n= 36 e no *locus* SW444 no grupo 2n= 37 ou 38 cromossomos (Tabela 7).

No teste sensível à excesso de heterozigotos os resultados dos *loci* IGF1 e ALOX12A no grupo genético 2n= 36 mostraram-se significativos, já os dos *loci* ACTG2 e TNFB deste mesmo grupo genético e o do *locus* SW444 do grupo genético 2n= 37 ou 38 não foram significativos para os testes de excesso e deficiência de heterozigotos .

Tabela 7 – Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg em dois grupos genéticos de javalis

Grupo genético	Locus	Número de Animais		H-W (P)	
		Homozigotos	Heterozigotos		
2n= 36 crom.	SW444	36 (40,17)	34 (29,81)	0,3509	(N.S.)
	IGF1	0 (13,19)	70 (56,80)	0,0000	(**)
	ACTG2	18 (18,15)	52 (51,84)	0,0479	(*)
	ALOX12A	9 (35,33)	61 (34,66)	0,0000	(**)
	TNFB	12 (14,47)	58 (55,52)	0,0117	(*)
	CGA	20 (21,47)	46 (44,52)	0,1030	(N.S.)
2n= 37 ou 38 crom.	SW444	4 (2)	2 (4)	0,0228	(*)
	IGF1	0 (1,90)	6 (4,09)	0,2099	(N.S.)
	ACTG2	4 (1,72)	2 (4,27)	0,2078	(N.S.)
	ALOX12A	0 (2)	6 (4)	0,2065	(N.S.)
	TNFB	1 (1,72)	5 (4,27)	1	(N.S.)
	CGA	2 (1,36)	4 (4,63)	0,5286	(N.S.)

Os valores entre parênteses correspondem às proporções esperadas de homozigotos e heterozigotos se a população estivesse em equilíbrio.

N.S. = Não Significativo

*Significativo $P < 0,05$

**Altamente Significativo $P < 0,01$

5.3- DIVERSIDADE GÊNICA E ESTRUTURA POPULACIONAL

Para as estimativas de diversidade gênica (heterozigose esperada) e estrutura populacional foram considerados os seis *loci* do tipo STR.

Os valores de diversidade gênica encontrados para cada *locus* em cada grupo genético variaram de 42,5% para o *locus* SW444 no grupo genético 2n= 36 a 81% para o *locus* IGF1 no grupo genético 2n= 36 (Tabela 8).

A diversidade total (H_T) foi de 73,3%, sendo o índice para subdivisão populacional (G_{ST}') estimado em 14,4% (Tabela 9).

Tabela 8 – Diversidade Gênica (H_s) para cada *locus* nos dois grupos genéticos

<i>Locus</i>	2n= 36	2n= 37 ou 38
SW444	0,425	0,700
IGF1	0,810	0,650
ACTG2	0,741	0,750
ALOX12A	0,493	0,633
TNFB	0,793	0,700
CGA	0,674	0,783

Tabela 9 – Estimadores de variabilidade segundo a metodologia de Nei (1973, 1975) para os dois grupos genéticos

<i>Locus</i>	Intra-populacional		Inter-populacional
	H_s	H_t'	G_{st}'
SW444	0,548	0,757	0,276
IGF1	0,737	0,824	0,106
ACTG2	0,736	0,793	0,072
ALOX12A	0,560	0,688	0,187
TNFB	0,750	0,853	0,120
CGA	0,724	0,822	0,120
Total	0,676	0,790	0,144

5.4- DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA

Aplicando o teste de diferenciação genética, os dois grupos genéticos diferenciaram em relação aos seis *loci* analisados (Tabela 10).

Tabela 10 – Teste de diferenciação genética em dois grupos genéticos de javalis

<i>Locus</i>	Valor de P	Desvio Padrão
SW444	0,00000	0,00000
IGF1	0,01574	0,00137
ACTG2	0,00001	0,00001
ALOX12A	0,00002	0,00002
TNFB	0,00005	0,00005
CGA	0,00104	0,00052

5.5- DISTÂNCIAS GENÉTICAS

A estimativa de distância genética possibilitou a comparação dos grupos genéticos em *Sus scrofa*, baseada nas frequências dos seis *loci* STRs. Dos valores obtidos pelas comparações realizadas entre os dois grupos genéticos, observou-se que todos os *loci* apresentaram altos valores de distância genética (Tabela 11).

Tabela 11 – Valores de F_{ST} para os dois grupos genéticos

<i>Locus</i>	F_{ST}
SW444	0,333
IGF1	0,092
ACTG2	0,080
ALOX12A	0,207
TNFB	0,112
CGA	0,131
Todos	0,150*

*(IC 95: 0,099/ 0,223)

*(IC 99: 0,092/ 0,254)

6 DISCUSSÃO

A escolha dos *loci* microssatélites foi casual. Apesar de ainda não termos feito o seqüenciamento de todos os alelos aqui observados, foi possível a utilização destes nas análises. Todas as amostras que a princípio pareceram conter o mesmo alelo foram comparadas lado a lado em outros géis e as leituras confirmadas ou corrigidas, o que permitiu diferenciar bem cada um dos alelos encontrados, favorecendo a seleção de amostras-padrão para novas análises. Além disso, padrões de peso molecular de 10, 25 e 50 pb foram utilizados para a padronização de cada *locus* durante a análise das amostras, confirmando as regiões de amplificação do porco doméstico, visto que análises evolutivas de microssatélites têm mostrado uma grande variedade de graus de conservação (Goldstein & Schlotterer, 1998).

O número médio de seis alelos por *locus* encontrado neste trabalho é considerado satisfatório, comparável ao de Takahashi *et al.* (1998) que usaram oito *loci* de DNA microssatélite para investigar a relação genética entre aves, e obtiveram um número médio de alelos de 5,6.

6.1- FREQUÊNCIAS ALÉLICAS

Para descrever a constituição genética de um grupo de indivíduos, é necessário especificar seus genótipos e saber em que frequência estão representados. Os genes encontrados em populações têm continuidade de geração a geração, o que não acontece com os genótipos nos quais eles aparecem. A constituição genética da população, com relação aos genes que ela transporta, é descrita pela relação das frequências gênicas ou alélicas.

Locus SW444

Foi observada alta frequência do alelo 1 no grupo genético com $2n= 36$ cromossomos (71,4%), mostrando uma tendência à fixação. Em comparação, o grupo genético $2n= 37$ ou 38 apresentou uma frequência de 33,3% deste alelo.

Nos animais considerados javalis puros, do grupo genético com $2n= 36$ cromossomos, não foi observado o alelo 2. Já no grupo genético com $2n= 37$ ou 38 , este alelo foi o mais frequente (50%), podendo desta forma ser considerado como característico deste grupo.

O alelo 3 apresentou baixa frequência em ambos os grupos (2,9% e 16,7% respectivamente).

A frequência de 25% do alelo 4 no grupo genético $2n= 36$ contrastou com a não ocorrência deste alelo no grupo $2n= 37$ ou 38 .

Locus IGF1

As frequências de todos os alelos do *locus* IGF1 (alelos 1 a 6) no grupo $2n= 36$ foi bem distribuída, sendo o alelo 5 o mais frequente (25,7%). No grupo genético $2n= 37$ ou 38 o alelo mais frequente foi o alelo 3 (50%), não sendo registrada a ocorrência dos alelos 4 e 6.

Locus ACTG2

No grupo $2n= 36$ o alelo 7 foi o mais frequente e o alelo 21 o menos frequente, não sendo registrada a ocorrência do alelo 1; em contrapartida, este alelo obteve uma frequência de 33,3% no grupo $2n= 37$ ou 38 , podendo desta forma, ser considerado característico deste grupo. O alelo mais frequente no grupo $2n= 37$ ou 38 foi o 15 (41,7%) não sendo observada a ocorrência neste grupo dos alelos 10, 16, 18, 20 e 21.

Locus LOX12A

Os alelos 2 e 3 apresentaram altas frequências no grupo genético $2n= 36$ (43,6% e 56,4%, respectivamente). O alelo 1 não foi observado no grupo $2n= 36$ mas teve uma alta frequência no grupo $2n= 37$ ou 38 (33,3%), podendo dessa forma ser considerado característico deste grupo.

Locus TNFB

O alelo 7 deste *locus* pode ser considerado característico do grupo $2n= 37$ ou 38 visto que apresentou alta frequência neste grupo (25%) e não foi registrada sua ocorrência no grupo $2n= 36$. Não foram observados os alelos 2, 10, 11, 12 e 14 no grupo $2n= 37$ ou 38 .

Locus CGA

O alelo 9 foi o mais freqüente (47%) no grupo com $2n = 36$ e apresentou uma baixa frequência (8,3%) no grupo $2n= 37$ ou 38 . Os alelos 1, 10 e 11 apresentaram baixas frequências no grupo $2n= 36$ (0,8%, 0,8% e 6,1%, respectivamente) e não foram registradas suas ocorrências no grupo $2n= 37$ ou 38 .

Os alelos tidos como característicos do grupo $2n= 37$ ou 38 (grupo de animais híbridos) podem representar a introgressão de alelos do porco doméstico.

Seqüências de mtDNA de alguns porcos domésticos são intimamente relacionadas às seqüências do javali europeu. A explicação mais provável para a frequência relativamente alta de haplótipos de mtDNA asiático em algumas raças de porcos domésticos europeus é devida à introdução de porcos asiáticos durante o século XVIII e início do século XIX. Os dados moleculares apresentados por Giuffra *et al.* (2000) confirmam os dados históricos e claramente indicam uma introgressão de genes de porcos domésticos asiáticos em raças européias.

É possível ignorar a taxa de mutação de marcadores genéticos porque a história de divergência entre as raças ou linhagens é relativamente curta em animais domésticos, entretanto a migração e a seleção artificial na história dos animais domésticos têm uma influência significativa sobre a frequência gênica. O conhecimento arqueológico e histórico pode ser útil na interpretação dos resultados usando marcadores genéticos (Nagamine & Higuchi, 2001).

Populações que experimentam grandes reduções no seu tamanho efetivo (como no caso de espécies introduzidas) podem estar sujeitas a uma multiplicidade de mudanças. Quando o tamanho efetivo de uma população é reduzido, a deriva genética é intensificada, o que pode ocasionar que alguns alelos sejam perdidos e outros fixados. Muitas abordagens que utilizam dados genéticos para examinar reduções no tamanho das populações observam as mudanças nas frequências alélicas ou perda de alelos (Garza & Williamson, 2001).

O monitoramento pode ser usado para estimar o tamanho efetivo da população (Waples, 1989) e determinar a origem dos indivíduos imigrantes (Nielsen *et al.*, 1997). Entretanto, métodos de monitoramento genético que usam a variação em frequências alélicas têm se mostrado mais eficazes (Luikart *et al.*, 1998).

Segundo Vernesi *et al.* (2003), a hibridação entre populações geneticamente diferenciadas pode ter conseqüências positivas para a viabilidade da população quando o aumento potencial da variabilidade genética do grupo híbrido tem efeito na heterose ou na redução da depressão da endogamia. Mais freqüentemente, entretanto, a hibridação é considerada a causa da extinção de muitas populações em muitos animais e plantas, porque a adaptação local é quebrada nos híbridos ou simplesmente porque a integridade genética de um grupo é perdida. O risco de

extinção é provavelmente mais elevado quando as populações sofrem introgressão de genes dos animais domesticados.

A variação de microssatélites tem sido utilizada para estudar a quantidade de hibridação entre espécies intimamente relacionadas (Gottelli *et al.*, 1994).

Três mudanças genéticas adversas ocorrem em cativeiro: depressão da endogamia, perda da variação genética e adaptação ao ambiente de cativeiro (Frankham, 1995). A adaptação genética ao cativeiro foi documentada em peixes, plantas e algumas espécies de *Drosophila* (Frankham & Loebel, 1992; Lachance & Mangan, 1990; Latter & Mulley, 1995).

6.2- EQUILÍBRIO DE HARDY-WEINBERG

Na maioria dos indivíduos o tipo mais comum de reprodução é aquele onde os acasalamentos são ao acaso. Neste sistema, cada indivíduo de um dos sexos tem igual probabilidade de se acasalar com qualquer indivíduo do sexo oposto. Em outras palavras, a frequência de um determinado tipo de acasalamento é ditada pelo acaso.

Uma grande população com acasalamento ao acaso é estável com relação às frequências alélicas e genotípicas na ausência dos fatores que podem mudar suas propriedades genéticas. Em populações panmíticas, o equilíbrio das frequências alélicas se mantém, enquanto não atuarem forças que o possam alterar.

Quando as proporções observadas se desviam significativamente das esperadas pelo teorema de Hardy-Weinberg, é necessário buscar por evidências de: a) acasalamento não ao acaso entre os indivíduos, ou b) mudanças nas frequências alélicas devido às forças evolutivas.

Há dois tipos de processos capazes de alterar as frequências genotípicas em decorrência de modificações das frequências alélicas: a) processos sistemáticos ou determinísticos: alteram as frequências de forma previsível, como: migração, mutação e seleção natural; b) processos dispersivos ou estocásticos: ocorrem em populações pequenas ou finitas, devido a efeitos de amostragem, sendo o mais importante fator a oscilação genética.

Desvios dos valores esperados podem ser devidos a uma variedade de causas. Um excesso de heterozigotos pode indicar a presença de seleção ou ocorrência de *outbreeding* (Murray, 1996). No presente estudo os desvios observados em relação aos valores esperados de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg podem dever-se a uma possível seleção de alelos destes *loci* direta ou indiretamente associados aos programas de seleção aplicados a características de interesse econômico. Portanto, os métodos de seleção a que os animais estão ou foram submetidos interferem no perfil das frequências alélicas dos *loci* estudados.

O efeito da flutuação do tamanho da população declina com o aumento do número de gerações (Nagamine & Higuchi, 2001). A introdução recente dos animais no país, poderia estar demonstrando muito mais o efeito de genes fundadores do que de processos de seleção. Esta seria uma causa não necessariamente alternativa aos processos seletivos, mas poderia estar atuando conjuntamente com estes.

A migração compreende tanto a introdução de indivíduos estranhos em uma população (imigração) como a saída de indivíduos desta população (emigração). Por este motivo pode-se promover o estabelecimento de alterações das frequências alélicas desde que elas sejam diferenciadas. Na criação animal ocorre imigração pela compra ou chegada de novos animais, por exemplo, no cruzamento de raças exóticas com animais de raças locais, como no caso dos animais híbridos do presente estudo.

Do ponto de vista genético, somente os indivíduos que estão se reproduzindo e transmitindo genes de uma geração a outra constituem efetivamente a população. As populações pequenas, como nos criatórios, possuem um tamanho efetivo bastante reduzido e, em decorrência disso, as frequências alélicas em tais populações estão sujeitas a oscilações casuais capazes de alterá-las profundamente.

Os animais do grupo genético $2n= 36$ apresentaram maior número de *loci* em desequilíbrio em comparação aos indivíduos com $2n= 37$ ou 38 , porém, a amostragem de um número reduzido de indivíduos, principalmente dos animais considerados híbridos, poderia introduzir uma distorção nas estimativas dos parâmetros.

6.3- DIVERSIDADE GÊNICA E INTRAPOPULACIONAL

A grande diversidade gênica nos dois grupos genéticos provavelmente seja devido ao fato desses animais praticamente não passarem por ação da seleção artificial em seu país de origem e terem sido introduzidos em nosso país recentemente, indicando que a seleção praticada para características de interesse econômico provavelmente ainda não levou à perda da variabilidade genética.

Recentemente, novos métodos foram desenvolvidos que exploram o fato de que alelos raros são geralmente perdidos primeiramente através da deriva genética. Desta maneira, quando uma população teve seu tamanho reduzido recentemente, como no caso de uma espécie introduzida, haverá uma deficiência de alelos raros em relação ao número esperado em uma população em equilíbrio (Garza & Williamson, 2001). Devido ao fato dos alelos raros contribuírem relativamente pouco à heterozigose esperada, haverá um excesso de heterozigose observada quando comparada com a população em equilíbrio com um número equivalente de alelos (Cornuet & Luikart, 1996).

A diversidade alélica e a heterozigose são freqüentemente relacionadas (Briton *et al.*, 1994). A heterozigose é menos afetada por *bottlenecks* severos no tamanho da população que a diversidade alélica (Frankham, 1995).

6.4- DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL

Um alto índice de diferenciação populacional ($G_{ST}' = 14,4\%$) foi observado quando todos os *loci* foram considerados. O maior valor de G_{ST}' observado foi do *locus* SW444 (27,6%), sendo portanto o mais informativo (Tabela 9).

Este alto índice de diferenciação populacional poderia ser resultante de processos de melhoramento e da introdução de alelos do porco doméstico nos animais híbridos, que levariam provavelmente à ocorrência de alguns alelos exclusivos (como no *locus* SW444).

Como as raças são domesticadas e melhoradas pelo homem, o período de divergência entre as raças ou linhagens é muito curto sob uma perspectiva evolutiva. A função da mutação de marcadores genéticos pode então ser apenas uma

pequena parcela na instituição da diferença genética entre duas raças (Nagamine & Higuchi, 2001).

6.5- DISTÂNCIA GENÉTICA

Todos os valores de distância genética estimados foram significativas (Tabela 11).

A distância genética ajuda a entender as relações evolutivas entre as populações. A conservação de raças de animais domésticos tradicionais está recebendo crescente atenção internacional (Hall & Bradley, 1995), visto que essas raças podem carregar genes úteis para o melhoramento genético. A medida da distância genética entre populações de animais domésticos produz informação para a caracterização das raças ou linhagens e então permite que essas sejam conservadas (Nagamine & Higuchi, 2001).

A seleção em um *locus* pode estabilizar frequências alélicas através de todas as subpopulações e, dessa forma, conduzir à subestimação da subestrutura da população ou distância genética. Alternativamente, diferenças nas pressões de seleção podem causar a fixação de alelos alternativos em diferentes subpopulações e causar a superestimação destes parâmetros. Dessa forma, os efeitos de seleção podem confundir resultados (Murray, 1996).

A detecção dos efeitos de seleção torna-se então um importante passo em qualquer análise. A comparação de frequências genotípicas observadas e aquelas esperadas das predições do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode detectar a presença de seleção. Esta comparação não é totalmente correta em *loci* microssatélites por causa dos efeitos combinados de tamanho amostral modesto e um grande número de alelos (Murray, 1996).

A seleção natural é simplesmente a perpetuação diferencial e não aleatória de diferentes genótipos. Todas as populações estão sujeitas à seleção natural, inclusive as de animais domésticos.

Finalmente, é importante citar que esta análise da variação dos microssatélites, mesmo se o número de *loci* foi relativamente pequeno, parece ser uma ferramenta valiosa para identificar a composição genética não somente das populações, mas também de indivíduos únicos, por exemplo, na identificação de javalis puros ou híbridos com porcos domésticos, bem como em programas de introdução de espécies como estas, que poderiam certamente ser melhoradas realizando-se análises genéticas preliminares.

7 CONCLUSÕES

- Os javalis considerados puros ($2n= 36$) diferenciaram-se geneticamente dos híbridos ($2n= 37$ ou 38), demonstrando que os *loci* de microssatélites são úteis para o estudo do processo de hibridação;

- Os iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (porco doméstico) podem ser utilizados em *Sus scrofa scrofa* (javali) em análises populacionais e na identificação de marcadores moleculares úteis ao melhoramento genético.

8 BIBLIOGRAFIA

- Abreu, U.; Mariante, A. & Santos, S. Conservação genética de raças naturalizadas do pantanal. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, ano I, n.5, p.18-21, 1998.
- Amorim, D. **Elementos Básicos de Sistemática Filogenética**. Holos Editora & Sociedade Brasileira de Entomologia, 2ª edição, 276p., 1997.
- Andersson-Eklund, L.; Marklund, L.; Lundstrom, K.; Haley, C.S.; Andersson, K.; Hansson, I.; Moller, M.; Andersson, I. Mapping quantitative 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.
- Arens, P.; Durka, W.; Wernke-Lenting, J.H.; Smulders, M.J.M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Geum urbanum* (Rosaceae) and their transferability within the genus *Geum*. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.209-212; 2004.
- Arnheim, N. & Erlich, H. Polymerase chain reaction strategy. **Annual Review Biochemistry**, v.61, p.131-156, 1992.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.11, p.155-165, 2002.

Barton, N.H. & Hewitt, G.M. Analysis of hybrid zones. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.16, p.113-148, 1985.

Bosma, A.; Haan, N.; Mellink, C. *et al.* Chromosome homology between the domestic pig and the babirusa (family Suidae) elucidated with the use of porcine painting probes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.75, p.32-35, 1996.

Briton, J.; Nurthen, R.K.; Briscoes D.A.; Frakham, R. Modelling problems in conservation genetics using *Drosophila*: consequences of harems. **Biol. Conserv.**, v.69, p.267-275, 1994.

Brown, J.F.; Hardge, T.; Rettenberger, G.; Archibald, A.L. Four new porcine polymorphic microsatellite loci (S0032, S0034, S0036, S0037). **Animal Genetics**, v.25, n.5, p.365, 1994.

Buchanan, F.; Adams, L.; Littlejohn, R.; Maddox, J.; Crawford, A. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. **Genomics**, v.22, n.2, p.397-403, 1994.

Cavalcanti, S. **Suinocultura Dinâmica**. FEP-MVZ Editora. Escola de Veterinária UFMG. Belo Horizonte, 1998.

Chen, H. & Leibenguth, F. Restriction patterns of mitochondrial DNA in European wild boar and German Landrace. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.110, n.4, p.725-728, 1995.

Ciampolini, R.; Moazami-Goudarzi, K.; Vaiman, D.; Dillmann, C.; Mazzanti, E.; Foulley, J.L.; Leveziel, H.; Cianci, D. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3259-3268, 1995.

Cornuet, J.M. & Luikart, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.14, p.2001-2014, 1996.

Daciuk, J. (1978) Notas faunísticas y bioecológicas de península Valdés y Patagonia. In: Jaksic, F.M.; Iriarte, J.A.; Jiménez, J.E.; Martínez, D.R. Invaders without frontiers: cross-border invasions of exotic mammals. **Biological Invasions**, v.4, p.157-173, 2002.

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.

Di Fiore, A. & Fleischer, R. Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates: Platyrrhini). **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.246-249, 2004.

- Di Rienzo, A.; Peterson, A.C.; Garza, J.C.; Valdes, A.M.; Slatkin, M.; Freimer, N.B.; 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proc. Nat. Ac. Sciences**, v.91, p.3166-3170, 1994.
- Echard, G.; Milan, D.; Yerle, M.; Lahbib-Mansais, Y.; Gellin, J. The gene map of the pig (*Sus scrofa scrofa* L.): a review. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.61, p.146-151, 1992.
- Ellegren, H.; Chowdhary, B.; 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. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. **Nature Genetics**, v.24, p.400-402, 2000.
- Fisher, R.A. **The genetic theory of natural selection**. Clarendon Press. Oxford, 1930.
- Fisher, R.A. **Statistical methods for research workers**. 12th ed., New York: Hafner, 1954.
- Forbes, S.H.; Hogg, J.T.; Buchanan, F.C.; Crowford, A.M.; Allendorf, F.W. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p.1106-1113, 1995.

Frankham, R. Conservation genetics. **Annual Review of Genetics**, v.29, p.305-327, 1995.

Frankham, R., Loebel, D.A. Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: rapid genetic adaptation to captivity. **Zoo. Biol.**, v.11, p.333-342, 1992.

Garza, J.C. & Williamson, E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite *loci*. **Molecular Ecology**, v.10, p.305-318, 2001.

Genov, P., Nikolov, H., Massei, G., Gerasimov, S. Craniometrical analysis of Bulgarian wild boar (*Sus scrofa*) populations. **Journal Zool. Lond.**, v.225, p.309-325, 1991.

Genov (1999) In: Goulding, M. Possible genetic sources of free-living wild boar (*Sus scrofa*) in southern England. **Mammal Review**, v.31, n.3, p.245-248, 2001.

Giuffra, E.; Kijas, J.; Amarger, V.; Carlborg, O.; Jeon, J.; Andersson, L. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, v.154, p.1785-1791, 2000.

Goldstein, D.B. & Schlötterer (eds) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford, 1999.

Gottelli, D.; Sillero-Zubiri, C.; Applebaum, G.D.; Roy, M.S.; Girma, D.J.; Garcia-Moreno, J.; Ostrand, E.A.; Wayne, R.K. Molecular genetics of the most

- endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. **Molecular Ecology**, v.3, p.622-629, 1992.
- Goudet, J.; Raymond, M.; de Meeus, T.; Rousset, F. Testing differentiation in diploid populations. **Genetics**, n.144, p.193-1940, 1996.
- Goudet, J. **PCA Gen ver. 1.2 Population genetics laboratory. University of Lausanne**. Lausanne, Switzerland, 1999.
- Goulding, M. Possible genetic sources of free-living wild boar (*Sus scrofa*) in southern England. **Mammal Review**, v.31, n.3, p.245-248, 2001.
- Goulding, M. & Roper, T. Press responses to the presence of free-living wild boar (*Sus scrofa*) in southern England. **Mammal Review**, v.32, n.4, p.272-282, 2002.
- Guo, S.W. & Thompson, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. **Biometrics**, n.48, p.361-372, 1992.
- Haig, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v.79, n.2, p.413-425, 1998.
- Haldane, J.B.S. An exact test for randomness of mating. **Journal of Genetics**, v.52, p.631-635, 1954.

Hall, S.J.G. & Bradley, D.G. Conserving livestock breed biodiversity. **Trends Ecol. Evolution**, v.10, p.267-270, 1995.

Higuchi, R. & Ochman, H. Simple and rapid preparation of samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.5865, 1989.

Huang, Y.; Shi, X.; Zhang, Y. Mitochondrial genetic variation in chinese pigs and wild boars. **Biochemical Genetics**, v.37, n.11/12, p.335-343, 1999.

Jaksic, F.M.; Iriarte, J.A.; Jiménez, J.E.; Martínez, D.R. Invaders without frontiers: cross-border invasions of exotic mammals. **Biological Invasions**, v.4, p.157-173, 2002.

Kimura, M.; Crow, J.F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v.49, p.725-738, 1964.

Kimura, M.; Ohta, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proc. Nat. Ac. Sciences**, v.75, p.2868-2872, 1978.

Kimura, M. **The neutral theory of molecular evolution**. Cambridge University Press. Cambridge, 1983.

Lachance, S. & Manga, P. Performance of domestic, hybrid and wild strains of brook trout, *Salvelinus fontinalis*, after stocking: the impact of intra- and interspecific competition. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v.47, p.2278-2284, 1990.

Latter, B.D.H. & Mulley, J.C. Genetic adaptation to captivity and inbreeding depression in small laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.19, p.255-266, 1995.

Li, W.H.; Grauer, D. **Gene structure and mutation**. In: Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, p.3-19, 1991.

Lopez-Corrales, N.; Beattie, C.; Rohrer, G. Cytogenetic assignment of 53 microsatellites from the USDA_MARC porcine genetic map. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.84, p.140-144, 1999.

Luikart, G.; Sherwin, W.B.; Steele, B.M.; Allendorf, F.W. Usefulness of molecular marker for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. **Molecular Ecology**, v.7, p.963-974, 1998.

McFee, A.F. & Banner, B.W. Inheritance of chromosome number in pigs. **J. Reprod. Fertil.**, v.11, p.161-163, 1969.

McGlone, J. & Pond, W. **Pig Production – Biological Principles and Applications**, 2003.

Milach, S. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, ano I, n.5, p.14-17, 1998.

Murray, B.W. (1996). The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. (<http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>, acesso em 22/04/02).

Nagamine, Y. & Higuchi, M. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. **J. Anim. Breed. Genetics**, v.118, p.101-109, 2001.

National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>, acesso em 05/2005).

Newton, C.R. **PCR. Essential data**. Ed. John Wiley & Sons, 1995.

Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, n.70, p.3321-3323, 1973.

Nei, M. ; Maruyama T.; Chakraborty, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, p.1-10,1975.

Nielsen, E.E.; Hansen M.M.; Loeschcke, V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*. A comparison of genetic composition over 60 years. **Molecular Ecology**, v.6, p.487-492, 1997.

Nowak, R.M. **Walker's mammals of the world**. Sixth edition, Baltimore, USA. John Hopkins University Press, v.2, 1999.

Oliver, W.L.R. (ed.). **Pigs, peccaries and hippos**. IUCN, Glad, Switzerland, 202p., 1993.

Paetkau, D. & Strobek, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**, v.3, p.489-495, 1994.

Parker, P.; Snow, A.; Schug, M.; Booton, G. & Fuerst, P. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Molecular Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

Peelman, L.J.; Weghe, A.V.; Coppieters, W.; Zeveren, A.V.; Bouquet, Y. Two microsatellites on pig chromosome 7. **Animal Genetics**, v.27, p.439, 1996.

Raymond, M.; Rousset, F. GENEPOP (version 1.2) Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.**, v.86, p.248-249, 1995.

Reynolds, J.; Weir, B.S.; Cockerham, C.C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short term genetic distance. **Genetics**, v.105, p.767-779, 1983.

Robic, A.; Parrou, J.L.; Yerle, M.; Goureau, A.; Dalens, M.; Milan, D.; Gellin, J. Pig microsatellites isolated from cosmids revealing polymorphism and localized on chromosomes. **Animal Genetics**, v.26, n.1, p.1-6, 1995.

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.

Rossiter, S.J.; Jones, G.; Ransome, R.D.; Barratt, E.M. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoes bat *Rhinolophus ferrumequinum*. **Molecular Ecology**, v.9, p.1131-1135, 2000.

Rothschild, M.F. & Plastow, G.S. Advances in pig genomics and industry applications. **AgBiotechNet**, v.1, p.1-8, 1999.

Rothschild, M.F. Programa Genoma do Porco. <http://www.genome.iastate.edu/resources/msprimer>. 2001.

Saitbekova, N.; Gaillard, C.; Obexer-Ruff, G.; Dolf, G. Genetic diversity in swiss goat breeds based on microsatellite analysis. **Animal Genetics**, v.30, p.36-41, 1999.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (Eds.). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, 1989.

Sanguinetti, C.J.; Dias Neto, E.; Simpson, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, n.5, p.914-921, 1994.

Schlotterer, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v.109, p.365-371, 2000.

Soulé (1990) In: Goulding, M. & Roper, T. Press responses to the presence of free-living wild boar (*Sus scrofa*) in southern England. **Mammal Review**, v.32, n.4, p.272-282, 2002.

Sun, H. & Kirkpatrick, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellite conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, v.7, p. 128-132, 1996.

Takahashi, I.; Nirasawa, K.; Nagamine, Y.; Tsudzuki, M.; Yamamoto Y. Genetic relationship among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. **J. Hered.**, v.89, p.543-546, 1998.

Tornsten, A.; Leon, J.T.; Alexander, L.J.; Andersson, L.; Chowdhary, B.P. Physical ordering of six YACs from the RN region in pigs. **Animal Genetics**, v.29, n.4, p.319-321, 1998.

Troyer, D.L.; Goad, D.W.; Xie, H.; Rohrer, G.A.; Alexander, L.J.; Beattle, 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.

Vernesi, C.; Crestanello, B.; Pecchioli, E.; Tartari, D.; Caramelli, D.; Hauffe, H.; Bertorelle, G. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild board (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, 585-595, 2003.

Vitic, J. & Stevanovic, J. Comparative studies of the serum lipoprotein and lipids in some domestic, laboratory and wild animals. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.106, n.1. p.223-229, 1993.

Waples, R.S. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. **Genetics**, v.121, p.379-391, 1989.

Wolkers, J.; Wensing, T.; Bruinderink, G.W.T.A. Nutritional status of wild boar (*Sus scrofa*): II. Body fat reserves in relation to hematology and blood chemistry. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.105, n.3, p.539-542, 1993.

Wright, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v.16, p.97-159, 1931.

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

Yue, G.; Beeckmann, P.; Bartenschlager, H.; Moser, G.; Geldermann, H. Rapid and precise genotyping of porcine microsatellites. **Electrophoresis**, v.20, p.3358-3363, 1999.

ABSTRACT

In the beginning of the XXth century some wild boar had been brought to Argentina and from there they had escaped and spread to northern Argentina, Uruguay and southern Brazil. During the 1990s some pure animals were imported for commercial purposes, from France and Canada. Nowadays hybrid animals occur in Brazil (with $2n = 37$ or 38 chromosomes) descendants from crosses between the wild boar ($2n = 36$) and the domestic pig ($2n = 38$).

The objective of the present work was to study the genetic composition of wild boars considered from pure lineages coming from Europe, and maintained in captivity in Brazil. Microsatellite markers were used with the purpose to contribute with the monitoring of the genetic variability and to help in management and genetic improvement programs.

The genomic DNA from wild boar was extracted and later amplified by PCR technique to be analyzed for 1GF1, SW444, ACTG2, LOX12A, CGA and TNFB microsatellites described for *Sus scrofa domestica*, the domestic pig. Amplification conditions were standardized for the wild boar (*Sus scrofa scrofa*), and all the six loci were polymorphic, showing a total of 36 alleles.

The possibility to utilize heterologous primers is a very important condition because it eliminates the necessity to develop a genomic library and thus becoming a faster and cheaper method.

Index terms: wild boar, microsatellite markers, heterologous primers.

ANEXO I

FICHA DE COLETA

Local: Rio Grande do Sul (Coletado por: Prof. Dr. Jeffrey F. Lui - FCAV, UNESP)

Material: Pêlo

Data: Abril/2001

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₁ 1	01	-	-	36
Javali ₁ 2	02	-	-	36
Javali ₁ 3	03	-	-	36
Javali ₁ 4	04	-	-	36
Javali ₁ 5	05	-	-	36
Javali ₁ 6	06	-	-	36
Javali ₁ 7	07	-	-	36
Javali ₁ 8	08	-	-	36

FICHA DE COLETA

Local: Serra Azul –SP (Coletado por: Prof. Dr. Jeffrey F. Lui - FCAV, UNESP)

Material: Pêlo

Data: 09/10/2001

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₂ 0	X	-	-	36
Javali ₂ 1	07	-	-	36
Javali ₂ 2	08	-	-	36
Javali ₂ 3	09	-	-	36
Javali ₂ 4	10	-	-	36
Javali ₂ 5	11	-	-	36
Javali ₂ 6	13	-	-	36
Javali ₂ 7	X1	-	-	36
Javali ₂ 8	X2	-	-	36
Javali ₂ 9	X3	-	-	36

FICHA DE COLETA

Local: Sítio Santa Esmeralda (Serra Azul –SP) (Coletado por: Lenicy L. Miranda)

Material: Pêlo

Data: 19/02/2002

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₃ 1	01	F	24	36
Javali ₃ 2	02	F	14	36
Javali ₃ 3	03	F	-	36
Javali ₃ 4	04	F	12	36
Javali ₃ 5	05	F	12	36
Javali ₃ 6	06	F	10	36
Javali ₃ 7	07	M	12	36
Javali ₃ 8	08	F	15	36
Javali ₃ 9	09	M	12	36
Javali ₃ 10	10	F	11	36
Javali ₃ 11	11	M	12	36
Javali ₃ 12	12	M	14	36
Javali ₃ 13	13	M	11	36
Javali ₃ 14	14	F	14	36
Javali ₃ 15	15	F	07	36

Javali ₃ 16	16	M	07	36
Javali ₃ 17	17	F	07	36
Javali ₃ 18	18	M	07	36
Javali ₃ 19	19	F	07	36
Javali ₃ 20	20	F	07	36
Javali ₃ 21	21	M	07	36
Javali ₃ 22	22	M	07	36
Javali ₃ 23	23	M	07	36
Javali ₃ 24	24	M	07	36
Javali ₃ 25	25	F	07	36
Javali ₃ 26	26	F	07	36
Javali ₃ 27	27	M	07	36
Javali ₃ 28	28	M	07	36
Javali ₃ 29	29	M	06	36
Javali ₃ 30	30	M	07	36

FICHA DE COLETA

Local: Serra Azul - SP (Coletado por: Prof. Dr. Jeffrey F. Lui - FCAV, UNESP)

Material: Pêlo

Data: Setembro/2002

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₄ 1	04	-	-	36
Javali ₄ 2	06	-	-	36
Javali ₄ 3	07	-	-	36
Javali ₄ 4	08	-	-	36
Javali ₄ 5	09	-	-	36
Javali ₄ 6	10	-	-	36
Javali ₄ 7	11	-	-	36
Javali ₄ 8	13	-	-	36
Javali ₄ 9	X	-	-	36

FICHA DE COLETA

Local: Fazenda Palmira (Serra Azul -SP) (Coletado por: Lenicy L. Miranda)

Material: Sangue

Data: 22/02/2003

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₅ 1	01	M	04	36
Javali ₅ 2	02	M	04	36
Javali ₅ 3	03	M	05	36
Javali ₅ 4	04	F	05	36
Javali ₅ 5	05	M	05	36
Javali ₅ 6	06	F	05	36
Javali ₅ 7	07	M	05	36
Javali ₅ 8	08	F	03	36
Javali ₅ 9	09	M	03	36
Javali ₅ 10	10	M	03	36
Javali ₅ 11	11	F	03	36
Javali ₅ 12	12	M	03	36
Javali ₅ 13	25	M	05	36
Javali ₅ 14	14	M	04	36
Javali ₅ 15	15	F	04	36
Javali ₅ 16	16	F	04	36
Javali ₅ 17	17	M	04	36
Javali ₅ 18	18	F	05	36
Javali ₅ 19	19	F	04	36

Javali ₅ 20	20	F	04	36
Javali ₅ 21	21	M	04	36
Javali ₅ 22	22	M	04	36
Javali ₅ 23	23	F	03	36
Javali ₅ 24	24	M	04	36
Javali ₅ 25	13	F	04	36
Javali ₅ 26	26	M	05	36
Javali ₅ 27	27	M	03	36
Javali ₅ 28	28	F	04	36
Javali ₅ 29	29	M	03	36
Javali ₅ 30	30	M	03	36

FICHA DE COLETA

Local: Sitio Santa Esmeralda (Serra Azul –SP) (Coletado por: Lenicy L. Miranda)

Material: Sangue

Data: 22/02/2003

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₅ 31	31	F	04	36
Javali ₅ 32	32	F	04	36
Javali ₅ 33	33	F	04	36
Javali ₅ 34	34	M	04	36
Javali ₅ 35	35	M	04	36
Javali ₅ 36	36	F	04	36
Javali ₅ 37	37	F	04	36
Javali ₅ 38	38	F	04	36
Javali ₅ 39	39	M	04	36
Javali ₅ 40	40	M	04	36
Javali ₅ 41	41	M	04	36
Javali ₅ 42	42	F	04	36
Javali ₅ 43	43	F	04	36
Javali ₅ 44	44	F	04	36
Javali ₅ 45	45	M	08	36
Javali ₅ 46	46	F	08	36
Javali ₅ 47	47	M	08	36
Javali ₅ 48	48	F	08	36
Javali ₅ 49	49	F	08	36
Javali ₅ 50	50	M	08	36
Javali ₅ 51	51	F	08	36
Javali ₅ 52	52	M	08	36
Javali ₅ 53	53	M	08	36
Javali ₅ 54	54	M	07	36
Javali ₅ 55	55	F	07	36
Javali ₅ 56	56	M	07	36
Javali ₅ 57	57	F	07	36
Javali ₅ 58	58	M	07	36
Javali ₅ 59	59	F	07	36
Javali ₅ 60	60	-	-	36

FICHA DE COLETA

Local: Sítio Santa Esmeralda* e Fazenda Palmira** (Serra Azul –SP)

(Coletado por: Prof. Dr. Jeffrey F. Lui – FCAV, UNESP)

Material: Sangue

Data: Maio/2003

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₆ 1*	02	-	-	N
Javali ₆ 2*	03	-	-	37
Javali ₆ 3*	04	-	-	37
Javali ₆ 4*	06	-	-	37
Javali ₆ 5*	07	-	-	37
Javali ₆ 6*	08	-	-	37
Javali ₆ 7**	09	-	-	36
Javali ₆ 8**	10	-	-	36
Javali ₆ 9**	11	-	-	36
Javali ₆ 10**	12	-	-	36
Javali ₆ 11**	13	-	-	36
Javali ₆ 12**	14	-	-	36
Javali ₆ 13**	15	-	-	36
Javali ₆ 14**	18	-	-	36
Javali ₆ 15**	19	-	-	36
Javali ₆ 16**	20	-	-	36

N= híbrido, 2n = 37 ou 38.

FICHA DE COLETA

Local: Sítio Santa Esmeralda (Serra Azul –SP)

(Coletado por: Prof. Dr. Jeffrey F. Lui – FCAV, UNESP)

Material: Sangue

Data: Maio/2003

Código	Tubo	Sexo	Idade (meses)	Cariótipo (2n)
Javali ₇ 1	03	-	-	N
Javali ₇ 2	04	-	-	38
Javali ₇ 3	05	-	-	37
Javali ₇ 4	06	-	-	N
Javali ₇ 5	07	-	-	38
Javali ₇ 6	08	-	-	38

N= híbrido, 2n = 37 ou 38.

ANEXO II

Tampão Estoque (Extração de DNA de Pêlos)

250 µl Tween 20
 5 ml 10X tampão PCR (sem Magnésio)
 5 ml MgCl₂ (25 mM)
 dH₂O para 50 ml

Tampão de Estocagem de Eritrócitos contendo Glicerol a 40%

Citrato tripotássico 0,1 M (P.M. = 324,4)
 KH₂PO₄ 0,0345 M (P.M. = 136,09)
 K₂HPO₄ 0,0344 M (P.M. = 174,18)
 40% de glicerol

Soluções para Extração do DNA de Sangue

Lise I	Lise II
Tris/HCl 0,01 M pH7,6	Tris/HCl 0,01 M pH 8,5
Sacarose 0,32 M	KCl 50 Mm
MgCl ₂ 5 mM	MgCl ₂ 2,5 mM
Triton X-100 1%	NP-40 0,45%
	Tween 20 (ou 80) 0,45%
	Proteinase K (10 mg/ml)

Gel de Poliacrilamida Não Desnaturante a 10%

6,67 ml Acri/Bis (29:1)
 1,40 ml Glicerol
 2 ml TBE (10X)
 Completar o volume para 20 ml e acrescentar:
 15 µl Temed
 300 µl Persulfato de Potássio (650 mg / 6,5 ml de água)

TBE

108 g Tris
 40 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 (18,6 g/100 ml)
 53g Ácido Bórico
 Completar para 1 litro

Tampão de Corrida ("loading buffer")

900 µl bromofenol 2,5%
 900 µl xileno cianol 2,5%
 900 µl TBE 10X
 4,5 ml Ficoll 30%
 1,8 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 (18,6 g/100 ml)
 3,6 g sacarose

Gel de Poliacrilamida Desnaturante (Uréia)

Concentração (%)	Volume (ml)	Acri/Bis (29:1) (ml)	Uréia (g)	TBE 10X (ml)	Temed (µl)	Persulf. Pot. (650 mg/ml) (µl)
10	30*	10,0	14,4	3,0	22,5	450
15	30*	15,0	14,4	3,0	22,5	450

*O volume foi completado para 30 ml com adição de água deionizada e posteriormente foram acrescentados o Temed e o Persulfato.

Caracterização genética de javalis (*Sus scrofa scrofa* L.) através de marcadores microssatélites

Lenícy Lucas de Miranda & Eucleia Primo Betioli Contel

RESUMO

No início do século XX, foram trazidos alguns javalis para a Argentina, que acabaram escapando e se espalhando pelo norte da Argentina, Uruguai e Sul do Brasil. Na década de 90 começaram a ser importados alguns animais puros, para fins de criação comercial, principalmente da França e Canadá. Ocorrem no Brasil também animais híbridos com $2n=37$ ou 38 cromossomos, descendentes do cruzamento do javali ($2n=36$) com o porco doméstico ($2n=38$). O objetivo deste trabalho foi a caracterização genética dos javalis considerados puros, originários da Europa, criados em cativeiros no país, através de marcadores microssatélites, com o intuito de contribuir com o monitoramento da variabilidade genética e sendo assim, auxiliar no manejo e gerenciamento de programas de melhoramento genético. Para estudar a pureza das linhagens de javalis, assim como estimar a variabilidade genética dentro de alguns grupos, o DNA genômico foi extraído e posteriormente amplificado pela técnica de PCR para análise de microssatélites (IGF1, SW444, ACTG2, LOX12A, CGA e TNFB), os quais foram desenvolvidos para a subespécie *Sus scrofa domestica* (suíno doméstico). As condições de amplificação foram padronizadas para o javali (*Sus scrofa scrofa*). Todos os seis *loci* foram polimórficos, apresentando um total de 36 alelos nos dois grupos genéticos (indivíduos com $2n=36$ e $2n=37$ ou 38 cromossomos). A utilização de iniciadores heterólogos é importante, pois, elimina a necessidade do desenvolvimento de biblioteca genômica, tornando-se um método mais rápido e de menor custo.

Termos para indexação: javali; marcadores microssatélites; iniciadores heterólogos.

INTRODUÇÃO

Os microssatélites (STRs - *Short Tandem Repeats*) são compostos de repetições em tandem de 2, 4 ou 6 pares de bases (como CA, CAAC ou GGAACC) previamente identificados por triagem de bibliotecas genômicas, com sondas de oligonucleotídeos repetidos em tandem. São extremamente úteis para estudos populacionais por serem altamente polimórficos (Parker *et al.*, 1998).

Devido a sua alta taxa de mutação (10^{-2} a 10^{-6} eventos por *locus* por geração) e de serem considerados seletivamente neutros, estes marcadores geralmente apresentam grande quantidade de variação. Estas características aliadas ao fato de serem marcadores codominantes espalhados de forma abundante no genoma e geralmente em regiões não transcritas tornam o microssatélite muito útil em estudos populacionais (Schlötterer, 2000).

Além da importância na construção de mapas genéticos e análise de ligação (Lopez-Corrales *et al.*, 1999), os microssatélites também têm sido utilizados no estudo da estrutura populacional, distância genética de populações e para identificação de indivíduos (Yue *et al.*, 1999). Vários trabalhos aplicam o conhecimento destes polimorfismos para estimar distância

genética entre animais domésticos, tais como foram feitos em bovinos (Ciampolini *et al.*, 1995), ovinos (Forbes *et al.*, 1995) e caprinos (Saitbekova *et al.*, 1999).

Como a maioria dos microssatélites 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 *taxa*, através da utilização de iniciadores heterólogos. Marcadores heterólogos de microssatélites têm sido muito empregados em espécies de interesse econômico. Arens *et al.* (2004) isolaram treze *loci* microssatélites na espécie *Geum urbanum* da família Rosaceae e testaram-os em outras 19 espécies de rosas do mesmo gênero. Em alguns casos foram obtidos padrões de muitas bandas, provavelmente devido à amplificação heteróloga. Di Fiore *et al.* (2004) identificaram sete *loci* microssatélites em macacos do gênero *Lagothrix* e testaram sua amplificação em outros 13 gêneros de primatas do Novo Mundo. Os autores concluíram que estes marcadores podem ser úteis para estudos de sistemas de acasalamentos e estrutura genética das populações em muitos primatas neotropicais.

Evidências paleontológicas indicam que os porcos originaram-se há cerca de 40 milhões de anos. Atualmente existem porcos selvagens na África (*warthog*), Ásia (babirusa) e Europa (javali da Eurásia) (McGlone & Pond, 2003). Evidências de exploração humana dos suiformes datam de 10 mil anos atrás (Oliver, 1993).

De acordo com Nowak (1999), o gênero *Sus* compreende apenas cinco espécies vivas atualmente, entre elas a *Sus scrofa* L., uma espécie comum na Eurásia e que ocorre também no noroeste da África; acredita-se na existência de no mínimo 16 (Giuffra *et al.*, 2000) ou 17 subespécies diferentes (Oliver, 1993), como por exemplo, o javali europeu (*Sus scrofa scrofa*), o porco doméstico (*Sus scrofa domestica*) e o javali da Malásia e Indonésia (*Sus scrofa vittatus*), entre outras (Chen & Leibenguth, 1995).

Na América do Sul, os primeiros javalis foram introduzidos da Europa pelo Sr. Pedro Luro, proprietário do rancho *San Huberto*, próximo à cidade de Santa Rosa, província de La Pampa, Argentina, durante o período de 1904-1906. Esses javalis foram mantidos em um cercado de 800ha, mas alguns conseguiram escapar tornando-se selvagens pouco tempo depois (Daciuk, 1978). Os javalis podem ser encontrados hoje, em estado selvagem, na Argentina, Uruguai e Sul do Brasil.

No Brasil, na década de 90, começaram a ser importados alguns animais considerados puros ($2n= 36$ cromossomos, de acordo com Darré *et al.*, 1992), principalmente da França e Canadá. Ocorrem no país também animais híbridos férteis com $2n= 37$ ou 38 cromossomos

resultantes do cruzamento do javali com o porco doméstico ($2n= 38$ cromossomos). O híbrido é de difícil constatação morfológica, uma vez que apresenta fenótipo semelhante ao javali; sua identificação só pode ser feita com segurança através de exame citogenético. McFee & Banner (1969) não registraram nenhuma evidência de fertilidade reduzida associada com estes diferentes números cromossômicos.

O interesse pela criação comercial do javali deve-se à sua carne de excelente sabor e ótima qualidade nutricional (Andersson-Eklund *et al.*, 1998).

Considerando que essa espécie exótica já foi introduzida no Brasil, algumas iniciativas poderiam (e deveriam) ser tomadas: 1) Prevenir (ou impedir) a fuga dos indivíduos em cativeiro; 2) Monitorar as populações; 3) Promover a educação pública em relação ao impacto dessa espécie; 4) Avaliar o seu uso econômico potencial; 5) Firmar acordos a respeito dessa espécie, com países que fazem fronteira com o país.

O javali enquadra-se perfeitamente nas tendências alimentares de nossos dias que têm seu foco direcionado para produtos orgânicos/naturais. O desenvolvimento da criação de javalis em nosso país esbarra muitas vezes em algumas dificuldades como a obtenção de animais puros, isto é, que não sejam descendentes do cruzamento do javali com o porco doméstico, quer sejam capturados vivos nos seus ambientes naturais ou oriundos de criatórios comerciais. Os javalis que vêm se adaptando às condições típicas brasileiras, não possuem até o momento nenhuma análise molecular com microssatélites.

O presente trabalho objetiva caracterizar geneticamente javalis (*Sus scrofa scrofa*) puros e híbridos criados no Brasil, originários da Europa, através de *loci* de microssatélites (STRs) do porco doméstico (*Sus scrofa domestica*).

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas amostras de sangue e testada a utilização de amostras de pêlo, de javalis puros $2n= 36$ cromossomos (*Sus scrofa scrofa* L.) e híbridos de javalis com o porco doméstico ($2n= 37$ ou 38 cromossomos) de ambos os sexos, de criatórios comerciais dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, originários da Europa e Canadá.

O DNA foi isolado das células dos pêlos e do sangue baseados na metodologia de Higuchi (1989) com modificações.

Foram utilizados seis pares de iniciadores (Tabela 1) para amplificação dos *loci* de microssatélites selecionados do projeto genoma do porco (Rothschild, 2001).

Tabela 1 - Pares de iniciadores para amplificação de *loci* de microssatélites do porco doméstico

<i>Locus</i>	Seqüência dos iniciadores (5' - 3')	Produto Gênico	Cromossomo	Referências
SW444	ATAGTTTCGGTTGGCCAG CTTAAGCCTCAAGCTAACAGGC	-	8	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CACTTGAGGGGCAAATGATT	Insuline-like growth factor 1	5	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
ACTG2	CATCTTCCTCTCCCTTCCC TGTGGACTCAAGGCTGTAAGC	Gamma Actin	3	Sun & Kirkpatrick, 1996
ALOX12A	CTTCAATGGTGCAGTGGGTTG ACTTTAATCAGATACAGAAGTTGG	Arachidonate 12-lipoxygenase	12	Ellegren <i>et al.</i> , 1994
TNFB	CTGGTCAGCCACCAAGATTT GGAAATGAGAAGTGTGGAGACC	Tumor necrosis factor β	7	Rohrer <i>et al.</i> , 1994
CGA	GTCACAGTGGATGGCATTG ACATCCCTAAGGTCGTGGC	Pituitary glycoprotein hormone	1	Troyer <i>et al.</i> , 1994

Em uma bancada livre de contaminação foi preparada a mistura do DNA com o mix da PCR (Tabela 2).

Tabela 2 – Soluções para reações de amplificação

<i>Locus</i>	DNA	Tampão Taq 10x	DNTPs 30 μ M	Iniciador 0,25 μ M	MgCl ₂	Taq DNA polimerase (1U/ μ l)
SW444	6,0 μ l	2,5 μ l	0,25 μ l	2,0 μ l	1,0 μ l	0,6 μ l
IGF1	5,0 μ l	2,5 μ l	0,25 μ l	2,0 μ l	1,5 μ l	0,5 μ l
ACTG2	5,0 μ l	2,5 μ l	0,25 μ l	3,0 μ l	1,5 μ l	0,5 μ l
ALOX12A	4,0 μ l	2,5 μ l	0,25 μ l	3,0 μ l	1,5 μ l	0,5 μ l
TNFB	3,0 μ l	2,5 μ l	0,25 μ l	2,0 μ l	1,5 μ l	0,5 μ l
CGA	5,0 μ l	2,5 μ l	0,25 μ l	2,0 μ l	1,5 μ l	0,5 μ l

*Foi acrescentado H₂O suficiente para completar o volume final de 25 μ l

Após acondicionar cada microtubo em um termociclador Stratagene Robocycler 40, seguiu-se à amplificação em programas padronizados para cada *locus*.

Depois da amplificação, as amostras foram aplicadas em um gel de poliácridamida não desnaturante a 10%, submetido a 200 V por aproximadamente duas horas. Para testar a eficiência da reação de amplificação e estimar o tamanho dos fragmentos (região de amplificação) foram utilizados marcadores de peso molecular de 10 pb, 25 pb (*Life Technologies-Gibco BRL*) e 50 pb (*Amersham Pharmacia Biotech*).

As amplificações foram consideradas positivas quando o gel apresentava uma ou duas bandas, com tamanho (pb) relacionado ao da espécie original (através do marcador de peso molecular) para a qual o iniciador foi desenvolvido. Por se tratar de amplificação heteróloga,

tomou-se o cuidado de repetir no mínimo três vezes todos os passos envolvidos na amplificação.

Posteriormente, 5 μ l do produto da PCR misturados com 7 μ l de tampão de corrida contendo formamida a 75% foram desnaturados por aquecimento a 94°C por 10 minutos e imediatamente colocados em um banho com gelo. A seguir foram analisados eletroforéticamente em gel desnaturante (uréia) de poliacrilamida, com a concentração do gel e o tempo de corrida padronizados de acordo com cada *locus*.

A visualização das bandas no gel foi realizada diretamente através de coloração com nitrato de prata (20%) descrita por Sanguinetti *et al.* (1994).

Depois de realizada a leitura do gel, este foi secado para ser guardado. A secagem foi feita retirando-se o gel da solução fixadora e em seguida embalando-o entre duas folhas de papel celofane embebido em água, sendo que a primeira folha envolvia uma placa de vidro. A secagem completa se efetuava deixando-se o gel à temperatura ambiente por alguns dias.

Seqüenciamento

Para o seqüenciamento foi realizada a amplificação do fragmento de DNA numa reação de PCR contendo: 4,0 μ l do DNA purificado, 4,0 μ l do iniciador (50 μ M) e 7,0 μ l do Kit Dyenamic (*Amersham Biosciences*).

Para a purificação do DNA foi utilizado 8,0 μ l do DNA amplificado mais 4,0 μ l do Kit de purificação Exosap (*Eppendorf*) e posteriormente procedeu-se de acordo com o programa padrão do Kit de purificação (15' a 37° C; 15' a 80° C).

Na reação de seqüenciamento foi utilizado o programa padrão do Kit Dyenamic (95° C – 5'; 95° C – 20"; 50° C – 15"; 60° C – 1' por 25 a 30 ciclos).

Análises Estatísticas

Com base nos dados gerados, foram estimadas as freqüências gênicas pelo programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995). A aderência das freqüências genotípicas observadas às proporções teóricas de Hardy-Weinberg foi verificada com o programa GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995).

Os testes exatos de diferenciação populacional foram realizados com o uso da opção 3 do programa GENEPOP.

A distância de Reynolds *et al.* (1983) é baseada nos valores de F_{ST} e estima o tempo necessário para o surgimento de determinado nível de variância entre as freqüências gênicas de diferentes populações. Esta medida foi utilizada para verificar a relação entre os dois grupos genéticos, baseando-se nos dados obtidos para seis *loci* do tipo STR.

RESULTADOS

Para que ocorresse a amplificação houve a necessidade de se reduzir as temperaturas de pareamento tornando-as mais apropriadas para a subespécie em estudo.

Tabela 3 – Comparação da temperatura de pareamento, amplitude de tamanho das bandas e número de alelos encontrados em *Sus scrofa domestica* (na literatura) e *Sus scrofa scrofa* nos seis *loci* microssatélites analisados.

<i>Locus</i>	Temperatura de Pareamento		Amplitude de Tamanho		Número de Alelos	
	<i>S. s. domestica</i>	<i>S. s. scrofa</i>	<i>S. s. domestica</i>	<i>S. s. scrofa</i>	<i>S. s. domestica</i>	<i>S. s. scrofa</i>
SW444	60°C	55°C	92-120	95-130	7	4
IGF1	58°C	53°C	223-237	230-250	12	6
ACTG2	58°C	50°C	109-142	110-140	9	8
ALOX12A	58°C	35°C	143-155	150-170	6	3
TNFB	60°C	57°C	174-213	175-210	10	8
CGA	65°C	50°C	322-366	325-370	7	7

Quanto às regiões de amplificação observadas no gel não-desnaturante de poliacrilamida, utilizando-se marcadores de peso molecular de 10pb, 25pb e 50pb, houve coincidência entre a subespécie de origem (*Sus s. domestica*) e *Sus s. scrofa* em todos os seis *loci* estudados. Aumentos de cerca de 10 pb em IGF1 e ALOX12A foram observados (Tabela 3).

A visualização dos alelos nos seis *loci* analisados através da técnica de eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida seguida de coloração com nitrato de prata foi considerada satisfatória. Considerando os dois grupos genéticos ($2n= 36$ e $2n= 37$ ou 38 cromossomos) analisados, foram identificados trinta e seis alelos na análise dos seis *loci* (Tabela 4), sendo quatro no *locus* SW444, seis no IGF1, oito no ACTG2, três no LOX12A, oito no TNFB e sete alelos no CGA. Em se tratando de iniciadores heterólogos, é de se esperar uma redução no número de alelos observados. Todos os seis *loci* analisados foram polimórficos.

Seqüenciamento

Foi obtida a seqüência do alelo 9 do *locus* CGA (indicada abaixo), no entanto, não foi possível distinguir os iniciadores devido à grande ocorrência de bases inespecíficas (N).

Comparando a seqüência obtida do *locus* CGA com o seqüência encontrada no GenBank (número de acesso: D00768) do porco doméstico, foi possível observar que a seqüência do microssatélite foi conservada no javali (Motif: (CT)₁₀).

Freqüências alélicas e equilíbrio de Hardy-Weinberg

As freqüências alélicas obtidas para os STRs SW444, IGF1, ACTG2, LOX12A, TNFB e CGA nos dois grupos genéticos estudados (*Sus s. scrofa* com $2n= 36$ e $2n= 37$ cromossomos) estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Freqüências dos alelos dos *loci* SW444, IGF1, ACTG2, LOX12A, TNFB e CGA nos dois grupos genéticos estudados (*Sus s. scrofa* com $2n= 36$ e $2n= 37$ ou 38 cromossomos).

<i>Locus</i>	Alelos	Freqüência Alélica (%)	
		<i>Sus s. scrofa</i> ($2n= 36$)	<i>Sus s. scrofa</i> ($2n= 37$ ou 38)
SW444	1	71,40	33,30
	2	-	50,00
	3	2,90	16,70
	4	25,70	-
IGF1	1	10,00	8,30
	2	10,70	33,30
	3	22,10	50,00
	4	9,30	-
	5	25,70	8,30
	6	22,10	-
ACTG2	1	-	33,30
	7	42,10	25,00
	10	9,30	-
	15	24,30	41,70
	16	4,30	-
	18	10,00	-
	20	8,60	-
	21	1,40	-
ALOX12A	1	-	33,30
	2	43,60	50,00
	3	56,40	16,70
TNFB	1	25,00	41,70
	2	32,10	-
	7	-	25,00
	9	12,90	33,30
	10	2,10	-
	11	11,40	-

	12	12,10	-
	14	4,30	-
CGA	1	0,80	-
	4	28,80	33,30
	7	1,50	33,30
	9	47,00	8,30
	10	0,80	-
	11	6,10	-
	12	15,20	25,00

O Teste exato foi aplicado e revelou desequilíbrio entre as proporções observadas e esperadas nos *loci* IGF1, ACTG2, ALOX12A e TNFB no grupo genético $2n= 36$ e no *locus* SW444 no grupo $2n= 37$ ou 38 cromossomos (Tabela 5).

No teste sensível à excesso de heterozigotos os resultados dos *loci* IGF1 e ALOX12A no grupo genético $2n= 36$ mostraram-se significativos, já os dos *loci* ACTG2 e TNFB deste mesmo grupo genético e o do *locus* SW444 do grupo genético $2n= 37$ ou 38 não foram significativos para os testes de excesso e deficiência de heterozigotos .

Tabela 5 – Teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg em dois grupos genéticos de javalis

Grupo genético	Lócus	Número de Animais Homozigotos		H-W (P)	
		Heterozigotos			
2n= 36 crom.	SW444	36 (40,17)	34 (29,81)	0,3509	(N.S.)
	IGF1	0 (13,19)	70 (56,80)	0,0000	(**)
	ACTG2	18 (18,15)	52 (51,84)	0,0479	(*)
	ALOX12A	9 (35,33)	61 (34,66)	0,0000	(**)
	TNFB	12 (14,47)	58 (55,52)	0,0117	(*)
	CGA	20 (21,47)	46 (44,52)	0,1030	(N.S.)
2n= 37 ou 38 crom.	SW444	4 (2)	2 (4)	0,0228	(*)
	IGF1	0 (1,90)	6 (4,09)	0,2099	(N.S.)
	ACTG2	4 (1,72)	2 (4,27)	0,2078	(N.S.)
	ALOX12A	0 (2)	6 (4)	0,2065	(N.S.)
	TNFB	1 (1,72)	5 (4,27)	1	(N.S.)
	CGA	2 (1,36)	4 (4,63)	0,5286	(N.S.)

Os valores entre parênteses correspondem às proporções esperadas de homozigotos e heterozigotos se a população estivesse em equilíbrio.

N.S. = Não Significativo

*Significativo $P < 0,05$

**Altamente Significativo $P < 0,01$

Diversidade gênica e estrutura populacional

Para as estimativas de diversidade gênica (heterozigose esperada) e estrutura populacional foram considerados os seis *loci* do tipo STR.

Os valores de diversidade gênica encontrados para cada *locus* em cada grupo genético variaram de 42,5% para o *locus* SW444 no grupo genético 2n= 36 a 81% para o *locus* IGF1 no grupo genético 2n= 36 (Tabela 6).

A diversidade total (H_T) foi de 73,3%, sendo o índice para subdivisão populacional (G_{ST}') estimado em 14,4% (Tabela 7).

Tabela 6 – Diversidade Gênica (H_s) para cada *locus* nos dois grupos genéticos

<i>Locus</i>	2n= 36	2n= 37 ou 38
SW444	0,425	0,700
IGF1	0,810	0,650
ACTG2	0,741	0,750
ALOX12A	0,493	0,633
TNFB	0,793	0,700
CGA	0,674	0,783

Tabela 7 – Estimadores de variabilidade segundo a metodologia de Nei (1973, 1975) para os dois grupos genéticos

<i>Locus</i>	Intra-populacional		Inter-populacional
	H_s	H_t'	G_{st}'
SW444	0,548	0,757	0,276
IGF1	0,737	0,824	0,106
ACTG2	0,736	0,793	0,072
ALOX12A	0,560	0,688	0,187
TNFB	0,750	0,853	0,120
CGA	0,724	0,822	0,120
Total	0,676	0,790	0,144

Diferenciação genética

Aplicando o teste de diferenciação genética, os dois grupos genéticos diferenciaram em relação aos seis *loci* analisados (Tabela 8).

Tabela 8 – Teste de diferenciação genética em dois grupos genéticos de javalis

<i>Locus</i>	Valor de P	Desvio Padrão
SW444	0,00000	0,00000
IGF1	0,01574	0,00137
ACTG2	0,00001	0,00001
ALOX12A	0,00002	0,00002
TNFB	0,00005	0,00005
CGA	0,00104	0,00052

Distâncias genéticas

A estimativa de distância genética possibilitou a comparação dos grupos genéticos em *Sus scrofa*, baseada nas frequências dos seis *loci* STRs. Dos valores obtidos pelas

comparações realizadas entre os dois grupos genéticos, observou-se que todos os *loci* apresentaram altos valores de distância genética (Tabela 9).

Tabela 9 – Valores de F_{ST} para os dois grupos genéticos

<i>Locus</i>	F_{ST}
SW444	0,333
IGF1	0,092
ACTG2	0,080
ALOX12A	0,207
TNFB	0,112
CGA	0,131
Todos	0,150*

*(IC 95: 0,099/ 0,223)

*(IC 99: 0,092/ 0,254)

DISCUSSÃO

A escolha dos *loci* microssatélites foi casual. Apesar de ainda não termos feito o seqüenciamento de todos os alelos aqui observados, foi possível a utilização destes nas análises. Todas as amostras que a princípio pareceram conter o mesmo alelo foram comparadas lado a lado em outros géis e as leituras confirmadas ou corrigidas, o que permitiu diferenciar bem cada um dos alelos encontrados, favorecendo a seleção de amostras-padrão para novas análises. Além disso, padrões de peso molecular de 10, 25 e 50 pb foram utilizados para a padronização de cada *locus* durante a análise das amostras, confirmando as regiões de amplificação do porco doméstico, visto que análises evolutivas de microssatélites têm mostrado uma grande variedade de graus de conservação (Goldstein & Schlotterer, 1998).

O número médio de seis alelos por *locus* encontrado neste trabalho é considerado satisfatório, comparável ao de Takahashi *et al.* (1998) que usaram oito *loci* de DNA microssatélite para investigar a relação genética entre aves, e obtiveram um número médio de alelos de 5,6.

A constituição genética da população, com relação aos genes que ela transporta, é descrita pela relação das frequências gênicas ou alélicas.

Os alelos tidos como característicos do grupo 2n= 37 ou 38 (grupo de animais híbridos) podem representar a introgressão de alelos do porco doméstico. Dados moleculares apresentados por Giuffra *et al.* (2000) confirmam os dados históricos e

claramente indicam uma introgressão de genes de porcos domésticos asiáticos em raças européias.

Populações que experimentam grandes reduções no seu tamanho efetivo (como no caso de espécies introduzidas) podem estar sujeitas a uma multiplicidade de mudanças. Quando o tamanho efetivo de uma população é reduzido, a deriva genética é intensificada, o que pode ocasionar que alguns alelos sejam perdidos e outros fixados. Muitas abordagens que utilizam dados genéticos para examinar reduções no tamanho das populações observam as mudanças nas frequências alélicas ou perda de alelos (Garza & Williamson, 2001).

O monitoramento pode ser usado para estimar o tamanho efetivo da população (Waples, 1989) e determinar a origem dos indivíduos imigrantes (Nielsen *et al.*, 1997). Entretanto, métodos de monitoramento genético que usam a variação em frequências alélicas têm se mostrado mais eficazes (Luikart *et al.*, 1998).

Segundo Vernesi *et al.* (2003), a hibridação entre populações geneticamente diferenciadas pode ter conseqüências positivas para a viabilidade da população quando o aumento potencial da variabilidade genética do grupo híbrido tem efeito na heterose ou na redução da depressão da endogamia. Mais freqüentemente, entretanto, a hibridação é considerada a causa da extinção de muitas populações em muitos animais e plantas, porque a adaptação local é quebrada nos híbridos ou simplesmente porque a integridade genética de um grupo é perdida. O risco de extinção é provavelmente mais elevado quando as populações sofrem introgressão de genes dos animais domesticados.

A variação de microssatélites tem sido utilizada para estudar a quantidade de hibridação entre espécies intimamente relacionadas (Gottelli *et al.*, 1994).

Três mudanças genéticas adversas ocorrem em cativeiro: depressão da endogamia, perda da variação genética e adaptação ao ambiente de cativeiro (Frankham, 1995). A adaptação genética ao cativeiro foi documentada em peixes, plantas e algumas espécies de *Drosophila*.

Na maioria dos indivíduos o tipo mais comum de reprodução é aquele onde os acasalamentos são ao acaso. Neste sistema, cada indivíduo de um dos sexos tem igual probabilidade de se acasalar com qualquer indivíduo do sexo oposto. Em outras palavras, a frequência de um determinado tipo de acasalamento é ditada pelo acaso.

Desvios dos valores esperados podem ser devidos a uma variedade de causas. Um excesso de heterozigotos pode indicar a presença de seleção ou ocorrência de *outbreeding* (Murray, 1996). No presente estudo os desvios observados em relação aos valores esperados de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg podem dever-se a uma possível seleção de

alelos destes *loci* direta ou indiretamente associados aos programas de seleção aplicados a características de interesse econômico. Portanto, os métodos de seleção a que os animais estão ou foram submetidos interferem no perfil das freqüências alélicas dos *loci* estudados.

A introdução recente dos animais no país, poderia estar demonstrando muito mais o efeito de genes fundadores do que de processos de seleção. Esta seria uma causa não necessariamente alternativa aos processos seletivos, mas poderia estar atuando conjuntamente com estes.

A migração compreende tanto a introdução de indivíduos estranhos em uma população (imigração) como a saída de indivíduos desta população (emigração). Por este motivo pode-se promover o estabelecimento de alterações das freqüências alélicas desde que elas sejam diferenciadas. Na criação animal ocorre imigração pela compra ou chegada de novos animais, por exemplo, no cruzamento de raças exóticas com animais de raças locais, como no caso dos animais híbridos do presente estudo.

As populações pequenas, como nos criatórios, possuem um tamanho efetivo bastante reduzido e, em decorrência disso, as freqüências alélicas em tais populações estão sujeitas a oscilações casuais capazes de alterá-las profundamente.

Os animais do grupo genético $2n=36$ apresentaram maior número de *loci* em desequilíbrio em comparação aos indivíduos com $2n=37$ ou 38 , porém, a amostragem de um número reduzido de indivíduos, principalmente dos animais considerados híbridos, poderia introduzir uma distorção nas estimativas dos parâmetros.

A grande diversidade gênica nos dois grupos genéticos provavelmente seja devido ao fato desses animais praticamente não passarem por ação da seleção artificial em seu país de origem e terem sido introduzidos em nosso país recentemente, indicando que a seleção praticada para características de interesse econômico provavelmente ainda não levou à perda da variabilidade genética.

Um alto índice de diferenciação populacional ($G_{ST}'=14,4\%$) foi observado quando todos os *loci* foram considerados. O maior valor de G_{ST}' observado foi do *locus* SW444 (27,6%), sendo portanto o mais informativo.

Este alto índice de diferenciação populacional poderia ser resultante de processos de melhoramento e da introdução de alelos do porco doméstico nos animais híbridos, que levariam provavelmente à ocorrência de alguns alelos exclusivos (como no *locus* SW444).

Todos os valores de distância genética estimados foram significativos (Tabela 9).

A seleção em um *locus* pode estabilizar freqüências alélicas através de todas as subpopulações e, dessa forma, conduzir à subestimação da subestrutura da população ou

distância genética. Alternativamente, diferenças nas pressões de seleção podem causar a fixação de alelos alternativos em diferentes subpopulações e causar a superestimação destes parâmetros. Dessa forma, os efeitos de seleção podem confundir resultados (Murray, 1996).

A detecção dos efeitos de seleção torna-se então um importante passo em qualquer análise. A comparação de frequências genótípicas observadas e aquelas esperadas das predições do equilíbrio de Hardy-Weinberg pode detectar a presença de seleção. Esta comparação não é totalmente correta em *loci* microssatélites por causa dos efeitos combinados de tamanho amostral modesto e um grande número de alelos (Murray, 1996).

Finalmente, é importante citar que esta análise da variação dos microssatélites, mesmo se o número de *loci* foi relativamente pequeno, parece ser uma ferramenta valiosa para identificar a composição genética não somente das populações, mas também de indivíduos únicos, por exemplo, na identificação de javalis puros ou híbridos com porcos domésticos, bem como em programas de introdução de espécies como estas, que poderiam certamente ser melhoradas realizando-se análises genéticas preliminares.

CONCLUSÕES

- Os javalis considerados puros ($2n= 36$) diferenciaram-se geneticamente dos híbridos ($2n= 37$ ou 38), demonstrando que os *loci* de microssatélites são úteis para o estudo do processo de hibridação;

- Os iniciadores desenvolvidos para *Sus scrofa domestica* (porco doméstico) podem ser utilizados em *Sus scrofa scrofa* (javali) em análises populacionais e na identificação de marcadores moleculares úteis ao melhoramento genético.

ABSTRACT

In the beginning of the XXth century some wild boar had been brought to Argentina and from there they had escaped and spread to northern Argentina, Uruguay and southern Brazil. During the 1990s some pure animals were imported for commercial purposes, from France and Canada. Nowadays hybrid animals occur in Brazil (with $2n = 37$ or 38 chromosomes) descendants from crosses between the wild boar ($2n = 36$) and the domestic pig ($2n = 38$). The objective of the present work was to study the genetic composition of wild boars considered from pure lineages coming from Europe, and maintained in captivity in Brazil. Microsatellite markers were used with the purpose to contribute with the monitoring of the genetic variability and to help in management and genetic improvement programs. The genomic DNA from wild boar was extracted and later amplified by PCR technique to be analyzed for 1GF1, SW444, ACTG2, LOX12A, CGA and TNFB microsatellites described for *Sus scrofa domestica*, the domestic pig. Amplification conditions were standardized for the wild boar (*Sus scrofa scrofa*), and all the six loci were polymorphic, showing a total of 36 alleles. The possibility to utilize heterologous primers is a very important condition because it

eliminates the necessity to develop a genomic library and thus becoming a faster and cheaper method.

Index terms: wild boar, microsatellite markers, heterologous primers.

BIBLIOGRAFIA

- Andersson-Eklund, L.; Marklund, L.; Lundstrom, K.; Haley, C.S.; Andersson, K.; Hansson, I.; Moller, M.; Andersson, I. Mapping quantitative 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.
- Arens, P.; Durka, W.; Wernke-Lenting, J.H.; Smulders, M.J.M. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Geum urbanum* (Rosaceae) and their transferability within the genus *Geum*. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.209-212; 2004.
- Buchanan, F.; Adams, L.; Littlejohn, R.; Maddox, J.; Crawford, A. Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. **Genomics**, v.22, n.2, p.397-403, 1994.
- Ciampolini, R.; Moazami-Goudarzi, K.; Vaiman, D.; Dillmann, C.; Mazzanti, E.; Foulley, J.L.; Leveziel, H.; Cianci, D. Individual multilocus genotypes using microsatellite polymorphisms to permit the analysis of the genetic variability within and between Italian beef cattle breeds. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3259-3268, 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.
- Di Fiore, A. & Fleischer, R. Microsatellite markers for woolly monkeys (*Lagothrix lagotricha*) and their amplification in other New World primates (Primates: Platyrrhini). **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.246-249, 2004.
- Ellegren, H.; Chowdhary, B.; 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.
- Forbes, S.H.; Hogg, J.T.; Buchanan, F.C.; Crawford, A.M.; Allendorf, F.W. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. **Mol. Biol. Evol.**, v.12, p.1106-1113, 1995.
- Garza, J.C. & Williamson, E.G. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. **Molecular Ecology**, v.10, p.305-318, 2001.
- Giuffra, E.; Kijas, J.; Amarger, V.; Carlborg, O.; Jeon, J.; Andersson, L. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. **Genetics**, v.154, p.1785-1791, 2000.
- Goldstein, D.B. & Schlötterer (eds) **Microsatellites: evolution and applications**. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- Gottelli, D.; Sillero-Zubiri, C.; Applebaum, G.D.; Roy, M.S.; Girma, D.J.; Garcia-Moreno, J.; Ostrand, E.A.; Wayne, R.K. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. **Molecular Ecology**, v.3, p.622-629, 1992.
- Higuchi, R. & Ochman, H. Simple and rapid preparation of samples for PCR. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.5865, 1989.
- Lopez-Corrales, N.; Beattie, C.; Rohrer, G. Cytogenetic assignment of 53 microsatellites from the USDA MARC porcine genetic map. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.84, p.140-144, 1999.
- Luikart, G.; Sherwin, W.B.; Steele, B.M.; Allendorf, F.W. Usefulness of molecular marker for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. **Molecular Ecology**, v.7, p.963-974, 1998.
- McFee, A.F. & Banner, B.W. Inheritance of chromosome number in pigs. **J. Reprod. Fertil.**, v.11, p.161-163, 1969.

- McGlone, J. & Pond, W. **Pig Production – Biological Principles and Applications**, 2003.
- Murray, B.W. (1996). The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. (<http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/brent.html>, acesso em 22/04/02).
- National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>, acesso em 05/2005).
- Nei, M. Analysis of gene diversity in subdivided population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, n.70, p.3321-3323, 1973.
- Nei, M. ; Maruyama T.; Chakraborty, R. The bottleneck effect and genetic variability in populations. **Evolution**, v.29, p.1-10, 1975.
- Nielsen, E.E.; Hansen M.M.; Loeschcke, V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: A comparison of genetic composition over 60 years. **Molecular Ecology**, v.6, p.487-492, 1997.
- Parker, P.; Snow, A.; Schug, M.; Booton, G. & Fuerst, P. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Molecular Ecology**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.
- Raymond, M.; Rousset, F. GENEPOP (version 1.2) Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.**, v.86, p.248-249, 1995.
- Reynolds, J.; Weir, B.S.; Cockerham, C.C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short term genetic distance. **Genetics**, v.105, p.767-779, 1983.
- 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.
- Rothschild, M.F. Programa Genoma do Porco. <http://www.genome.iastate.edu/resources/msprimer>. 2001.
- Sanguinetti, C.J.; Dias Neto, E.; Simpson, A.J. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, n.5, p.914-921, 1994.
- Schlotterer, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, v.109, p.365-371, 2000.
- Sun, H. & Kirkpatrick, B.W. Exploiting dinucleotide microsatellite conserved among mammalian species. **Mammalian Genome**, v.7, p. 128-132, 1996.
- Takahashi, I.; Nirasawa, K.; Nagamine, Y.; Tsudzuki, M.; Yamamoto Y. Genetic relationship among Japanese native breeds of chicken based on microsatellite DNA polymorphisms. **J. Hered.**, v.89, p.543-546, 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.
- Vernesi, C.; Crestanello, B.; Pecchioli, E.; Tartari, D.; Caramelli, D.; Hauffe, H.; Bertorelle, G. The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. **Molecular Ecology**, v. 12, 585-595, 2003.
- Waples, R.S. A generalized approach for estimating effective population size from temporal changes in allele frequency. **Genetics**, v.121, p.379-391, 1989.
- Wright, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.**, V.15, p.323-354, 1951.
- Yue, G.; Beeckmann, P.; Bartenschlager, H.; Moser, G.; Geldermann, H. Rapid and precise genotyping of porcine microsatellites. **Electrophoresis**, v.20, p.3358-3363, 1999.