

(GFR-13C) VARIABILIDADE GENÉTICA ENTRE JAVALIS (SUS SCROFA SCROFA), HÍBRIDOS E SUÍNOS POR MEIO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Jeffrey Frederico Lui^{1*} . Paula Viana Correa da Silva¹ . Guilherme de Oliveira Band¹ Luciana Correia de Almeida Regitano² Selma de Fátima Grossi³
Davi Nogueira Maciel Alves¹

¹ Universidade Estadual Paulista, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n. Dep. de Zootecnia, FCAV/UNESP CEP 14884-900, Jaboticabal SP, Brasil

² EMBRAPA Sudeste Pecuária, São Carlos SP, Brasil. ³ Instituição Moura. Lacerda, Ribeirão Preto SP, Brasil

* Autor para contato: Jeffrey@fcav.unesp.br

RESUMO

Os híbridos entre javalis e suínos é bastante comum. Assim, tem-se detectado polimorfismo em javalis, variando o número de cromossomos de 36 a 38. No experimento foram utilizados os animais agrupados em 5 grupos genéticos: grupo I - 59 suínos domésticos com $2n = 38$; grupo II - 46 javalis puros de origem (PO) com $2n = 36$; grupo III - 6 híbridos, com $2n=36$; grupo IV - 30 híbridos com $2n=37$ e grupo V - 10 híbridos com $2n=38$. O DNA genômico foi extraído e, posteriormente, amplificou-se, pela técnica de PCR, os fragmentos desses microssatélites - IGF1, ACTG2, TNFB -, os quais foram desenvolvidos para a subespécie *Sus scrofa domestica*. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) dentro de cada população e testar as relações existentes entre os cinco grupos genéticos para estabelecer a distância genética entre eles. Os valores médios de heterozigosidades variaram 0,537-0,7871 e apresentam-se inferiores aos valores médios de heterozigosidades esperadas (0,6749-0,8279). Os valores de F_{IS} para os Grupos II e III foram negativos, -0,005 e -0,037 respectivamente nestas populações. Nos demais grupos os valores de F_{IS} foram positivos.

Palavras-Chaves: genética molecular, javalis, microssatélites, fragmentos, amplificação.

ABSTRACT

The occurrence of crossbred animals between wild boar and swines, both in nature and in captivity, is quite common. Thus, polymorphism has been detected among wild boar, varying the number of chromosomes from 36 to 38. Animals were grouped into 5 genetic groups: grupo IV - 30 híbridos com $2n=37$ e grupo V - 10 híbridos com $2n=38$. group I, 59 domestic pigs with $2n = 38$; group II, 46 purebred wild boars with $2n = 36$ imported from France in 1997; group III, 6 crossbred animals (crossbred x backcrossing animals) with $2n = 36$; group IV, 30 crossbred animals (wild boars x domestic pigs) with ploidy equal to 37 chromosomes and group V, composed of 10 crossbred animals (wild boars x domestic pigs) with $2n = 38$. The genomic DNA was extracted and the fragments of these microsatellites - IGF1, ACTG2, TNFB - were

amplified through the PCR technique, which were developed for the *Sus scrofa domestica* species. The objective of this paper was evaluate the expected (H_e) and observed (H_o) heterozigosity and the endogamy coeficient (F_{IS}) within each population and test relationship among the five genetic groups to stablish the genetic distance among them. The mean heterozigosity values variate between 0,537 and 0,7871 and presented lower mean values than expected heterozigosity (0,6749-0,8279). The F_{IS} values for groups II and III were negative (-0,005 and -0,037 respectively) within this populations. For the other populations the F_{IS} values were positive.

Key Words: molecular genetics, wild boars, microsatellites, fragments, amplification.

INTRODUÇÃO

A necessidade de aumentar a produtividade nas javalinoculturas induziu à adoção de cruzamentos do Javali com o suíno doméstico. Esses cruzamentos originam animais com novo genótipo, constituído pela fusão dos genótipos do doméstico com o selvagem, resultando em animais cruzados e não melhorados. O cariótipo padrão para o javali europeu (*Sus scrofa scrofa*) é $2n= 36$ cromossomos (Darré et al., 1992) e os animais híbridos podem ter $2n= 37$ e 38 cromossomos, resultantes do cruzamento do javali com o suíno doméstico e seus acasalamentos.

Atualmente, a distinção entre animal puro e híbrido é feita não só pela observação do fenótipo, mas também por meio da análise do número de cromossomos nas células diplóides. Outros métodos como marcadores moleculares podem colaborar com essa distinção. O presente trabalho objetivou utilizar marcadores microsatélites (STRs) desenvolvidos para suínos domésticos para caracterização genética de javalis puros (*Sus scrofa scrofa*) e seus híbridos

MATERIAL E MÉTODOS

Cerca de 151 animais (javalis, híbridos e suínos) de 5 grupos genéticos bem definidos foi utilizado. Sendo classificados no grupo I, 59 suínos domésticos que possuíam $2n=38$; no grupo II, 46 javalis puros de origem (PO) com $2n=36$; no grupo III, 6 híbridos com $2n=36$, provenientes de acasalamentos entre híbridos e retrocruzamentos; no grupo IV, 30 híbridos com suíno doméstico com $2n=37$ cromossomos; e no grupo V, por 10 híbridos com o suíno doméstico, com $2n=38$, conhecidos popularmente como Javaporcos, devido à similaridade cariotípica e fenotípica com o suíno doméstico.

O DNA genômico foi extraído do sangue conforme metodologia descrita por Zadworny & Kuhnlein (1990). Para realização deste trabalho foram analisados 3 locos de microsatélites (ACTG2; IGF1; TNFB), utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os parâmetros populacionais tais como: heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) foram calculados por meio do programa MS_TOOLS (PARK, 2001). O coeficiente de endogamia (F_{IS}) dentro de cada população foi calculado pelo programa FSTAT (GOUDET, 2002). A existência do Equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro das populações foi através dos testes globais para déficit e excesso de heterozigotos com o programa Genepop (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Os Valores de p exatos foram obtidos pelo método de cadeia de Markov mediante análise com os seguintes parâmetros: 10000 dememorizações, 40 batches e 2000 permutações.

Para testar as relações existentes entre os cinco grupos genéticos analisados foi estimado o índice de fixação F_{ST} proposto por Weir & Cockerham (1984), calculados pelo programa Genepop. As frequências alélicas apresentadas nas populações também foram comparadas por meio de distâncias genéticas, estabelecidas pelo programa DISPAN (OTA, 1993). Testou-se o padrão de distância genética D_A (Nei et al., 1983) para a construção de dendogramas pelo método algorítimo de Neighbor joining (Saitou & Nei, 1987). Análise de bootstrap com 1000 replicações foi utilizada para avaliar a consistência interna dos grupamentos sugeridos, bem como a magnitude dos efeitos de erros amostrais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de heterozigidades observadas nas populações variaram 0,537-0,7871 e apresentam-se inferiores aos valores médios de heterozigidades esperadas (0,6749-0,8279). No grupo genético híbrido $2n=38$ (Grupo V), o número efetivo de alelos (3,0761) e a heterozigidade esperada (0,6749) corresponderam aos mais baixos valores entre todos os grupos analisados. Já os grupos IV e o I, apresentaram os maiores valores para estas estimativas de número efetivo de alelos (5,8 e 5,6, respectivamente). De uma forma geral, os cinco grupos genéticos apresentaram heterozigidade observadas inferiores aos valores de heterozigidade esperadas e estas estimativas, assim como a diversidade alélica, se mostraram variáveis entre estas populações.

Os valores de F_{IS} (coeficiente de endogamia) para os Grupos II e III foram negativos, -0,005 e -0,037 respectivamente nestas populações, esta diversidade gênica pode estar associada ao fato dessas populações não terem passado por uma ação de seleção artificial intensa. Nos demais grupos (I, IV, V) os valores de F_{IS} foram positivos.

O Grupo I e o Grupo IV não apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg para Déficit de heterozigotos, pois, os suínos pertenciam a duas pequenas propriedades e a endogamia poderia estar ocorrendo. No presente estudo, o número de alelos médios do Grupo II apresentou redução com relação ao Grupo I, sugerindo a endogamia ou à presença de alelos nulos.

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

Observa-se que a maior distância genética foi encontrada entre os grupos genéticos javali (Grupo II) e híbrido (Grupo V) de 0,6420, enquanto o suíno (Grupo I) se apresentou mais relacionado com o grupo híbrido (Grupo IV) de 0,233. Quando se considerou todos os animais cruzados como um grupo único a maior distância foi observada para os grupos javali (Grupo II) e suíno (Grupo I) de 0,4084 seguido de híbrido e javali de 0,4059, sendo que os grupos híbridos (Grupos III, IV e V) e suíno se apresentaram mais relacionados, como se verifica no dendograma da Figura 1. O dendograma obtido (Figura 1) indica a separação em três grupos distintos. O primeiro grupamento formado por grupo V ($2n=38$) e grupo IV ($2n=37$) obteve 74% de confiabilidade na distância genética entre eles. O segundo grupamento, formado

pelo grupo I (2n=38) apresentou 82% de confiabilidade na distância entre este e os grupos V e IV. O terceiro foi representado pelo grupo II e grupo III e mostrou-se mais diferenciado e distante em relação aos outros analisados. Estes grupos II e III estão próximos em ploidia e parentesco (2n=36) e apresentam-se semelhantes fenotipicamente.

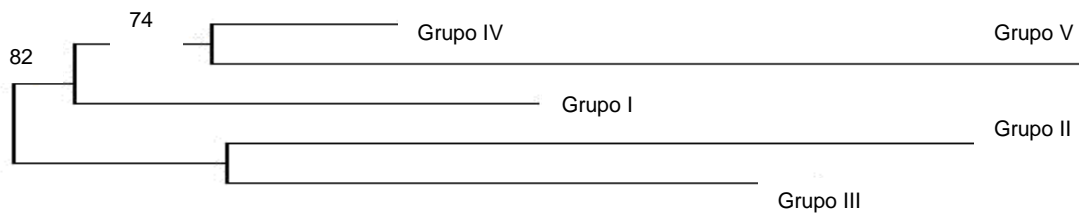


Figura 1. Dendrograma UPGMA baseado na distância D_A com os respectivos valores de brootstrapping em cada grupamento.

Os javalis puros se diferenciam geneticamente dos suínos e dos híbridos, havendo diferenças quanto ao tamanho e freqüência de alelos nos três locos de microssatélites. As estimativas de variabilidade apontaram de um modo geral, perda de heterozigidade. O cálculo da distância genética permitiu agrupar em um mesmo grupo os javalis puros e híbridos de mesma ploidia (2n=36) o que confirma a não distinção fenotípica entre os dois animais.

BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. GOUDET, J. FSTAT Version 2.9.3.2 for windows: a computer program to calculate F-statistics, 2002. URL: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
3. PARK, S. D. E., Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. University of Dublin, 2001. [Ph.D. Thesis (in prep.)].
4. RAYMOND, M. L. & ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, v. 49, p. 1280-1283, 1995.
5. SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425, 1987.
6. WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F statistics for the analysis of the population structure. *Evolution*, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
7. ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. – The identification of the kappa-casein genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genetic*, v.80, p.631-634, 1990.