

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
SUÍNAS LOCAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

**ELIZABETE CRISTINA DA SILVA**

**RECIFE-PE**

**2010**

**ELIZABETE CRISTINA DA SILVA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
SUÍNAS LOCAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Zootecnia, Área de concentração: Produção Animal.

**Comitê de orientação:** Prof<sup>o</sup> Dsc. Wilson Moreira Dutra Júnior

Pesquisador Dsc. Samuel Rezende Paiva

Prof<sup>o</sup> Dsc. Manoel Adrião Gomes Filho

**RECIFE-PE**

**2010**

Ficha catalográfica

S586d Silva, Elizabete Cristina da

Diversidade e estrutura genética de populações suínas  
locais de populações suínas locais no estado de Pernambuco  
Brasil / Elizabete Cristina da Silva – 2010.

110 p. : il.

Orientador: Wilson Moreira Dutra Júnior

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal  
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia,  
Recife, 2010.

Referências.

1. Locos de microssatélites 2. Genética animal 3. *Sus scrofa*  
4. Variabilidade genética I. Dutra Júnior, Wilson Moreira  
orientador II. Título

CDD 636.4

**ELIZABETE CRISTINA DA SILVA**

**DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES  
SUÍNAS LOCAIS NO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL**

Dissertação defendida e aprovada em 12 de Agosto de 2010.

**Orientador:** \_\_\_\_\_

Prof.º Wilson Moreira Dutra Júnior (Dsc -UFRPE)

**Banca avaliadora:**

\_\_\_\_\_

Prof.ª Maria de Mascena Diniz Maia (Dsc -UFRPE)

\_\_\_\_\_

Pesquisador Samuel Rezende Paiva

(Dsc – EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF)

\_\_\_\_\_

Prof.º Manoel Adrião Gomes Filho (Dsc – UFRPE)

## **BIOGRAFIA**

**Elizabete Cristina da Silva**, filha de Manoel Otávio da Silva e Nerice Pereira da Silva, nasceu em 04 de dezembro de 1981, em Palmares-PE. Em abril de 2003 iniciou o curso de Zootecnia na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), concluindo-o em agosto de 2008. Neste mesmo período ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, da UFRPE, o qual concluiu em 12 de Agosto de 2010.

*Dedico esta dissertação à minha família (mãe, irmãos e sobrinho) e ao meu noivo, Victor Calado, por serem o alicerce da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Departamento de Zootecnia, pelas oportunidades durante todos esses anos;

À CAPES/MEC, pela concessão da bolsa de estudos;

À FACEPE, pelo auxílio financeiro para a realização das atividades na Embrapa Recursos Genética e Biotecnologia, Brasília, DF;

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, pela oportunidade de estágio necessária à realização de atividades referentes a este trabalho;

À Pró-reitora de Pós-Graduação, Prof<sup>a</sup> Doutora Antônia Sherlânia, pela eficiência e compreensão quando eu precisei de subsídio para participar do Zootec 2010, para a divulgação desta pesquisa;

Ao Magnífico Reitor, Professor Valmar Corrêa de Andrade, por colaborar com a minha hospedagem em Brasília para a execução das análises moleculares;

A todos os docentes do Departamento de Zootecnia, pela contribuição ao meu crescimento científico e profissional;

Ao Professor Doutor Wilson Dutra, pela orientação, ensinamentos e compreensão; pelo valor dado a este trabalho, pela ajuda nas coletas em campo, por não medir esforços sempre que eu precisei de sua colaboração, pelas palavras bem colocadas no momento certo e, sobretudo, pelo exemplo profissional;

Ao Professor Doutor Manoel Adrião, pela sua orientação e disposição em colaborar com este trabalho, por abrir as portas do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada para a realização das análises moleculares, pela supervisão no momento das análises e preocupação para que ocorresse tudo bem;

Ao Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Doutor Samuel Paiva, pela sua orientação e contribuições no entendimento dos programas estatísticos e ideias para o enriquecimento deste trabalho; por além de abrir as portas do Laboratório

de Genética Animal para realização das análises moleculares ter fornecido os primers e todos os materiais necessários; pelos momentos dedicados a este trabalho, por ter sido presente quando eu precisei de suas colaborações e pelo exemplo de profissional a ser seguido;

À Doutora Patrícia Ianella, pela supervisão das análises moleculares à parte escrita, pelos seus ensinamentos e sua amizade. Obrigada pelas palavras de conforto em meus momentos difíceis. Enfim, obrigada por ser sensacional!

Ao pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF, Doutor Alexandre Caetano, por disponibilizar o sequenciador automático para realização da eletroforese capilar;

À Doutora Laura Rocha, por se dispor em colaborar e pelas sugestões no material escrito;

Aos colegas de Pós-Graduação Cláudio Parro e Clenilson Marquezin, pelos finais de semana dedicados a este trabalho para participarem das coletas de campo e discussões;

Aos colegas de graduação, Débora Nathálya, Leonardo, João Pontes e Késya, por auxiliarem nas coletas de campo e nas extrações de DNA;

Ao meu noivo, Victor Calado, pelo amor, compreensão pelas minhas ausências para dedicação a este trabalho, pela sua cumplicidade, amizade e incentivo. Apenas tu sabes a importância que tens para mim (Você é tudo);

À minha Mãe, Nerice, à minha irmã, Elaine, e irmãos, Manoel e Roberto, pelo apoio em todos os momentos da minha vida e pela confiança que sempre depositaram em mim. À minha cunhada Cláudia pela força e pelo sobrinho (Otávio) que eu sempre desejei;

Às amigas que conquistei no LGA, Ângela, Mariana, Vanessa Carvalho, Vanessa Belluco, Márcio, Marne, Leonardo, Lilian, Doutora Tatiana Amabile, Doutora Patrícia Ianella e Ronyere, pelos momentos de descontrações e apoio;

A todos os produtores de suínos do Estado de Pernambuco que permitiram utilizar seus animais para este estudo.

Meus profundos agradecimentos!!!



*Nenhum problema pode ser resolvido pelo  
mesmo estado de consciência que o gerou.*

*É preciso ir bem mais longe do que isso.*

***Albert Einstein***

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	<i>xi</i>
LISTA DE FIGURAS.....	<i>xii</i>
RESUMO.....	<i>xvi</i>
ABSTRACT.....	<i>xv</i>
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Situação e caracterização morfológica de suínos localmente adaptados no Brasil.....	4
2.2. Conservação de recursos genéticos animais .....	9
2.3. Características dos marcadores microssatélites .....	11
2.4. Estatísticas utilizadas em estudos de diversidade e estrutura genética.....	15
3. OBJETIVOS (gerais e específicos) .....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1. Critérios para seleção das amostras, amostragem e características .....	21
4.2. Material biológico e extração e avaliações do DNA .....	23
4.3. Diluição do DNA e reação da polimerase em cadeia (PCR).....	25
4.4. Genotipagem.....	28
4.5. Análises estatísticas .....	29
4.5.1. Definição da provável estrutura genética.....	29
4.5.2. Variabilidade genética intra e inter-populacional.....	31
4.5.3. Teste de alocação de amostras de suínos SRD .....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
5.1. Amplificações .....	34
5.2. Definição da provável estrutura genética.....	34
5.3. Variabilidade genética intra e inter-populacional.....	39
5.4. Teste de alocação de amostras de suínos SRD.....	54
6. CONCLUSÕES .....	54
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	58
8. ANEXOS.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características morfológicas de suínos localmente adaptados no Brasil.....	8
Tabela 2 - Grupos genéticos, siglas de cada população, municípios de origem de cada população e quantidade de animais por sexo e por e região (N/R) e os municípios visitados em cada região.....	22
Tabela 3 - Nome dos <i>loci</i> , cromossomos (Cr.) sequências dos primers, tamanho esperado (Te) e observado (To), tipo de marcação fluorescente (Marc.) e multiplexes (M).....	27
Tabela 4 - Análise de variância molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estrutura dos 12 grupos genéticos de suínos investigados. GL = graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; CV = componente de variação; $F_{ST}$ = índice de fixação.....	35
Tabela 5 - Estimativas por <i>locus</i> de índices relacionados à variabilidade genética de 190 suínos comerciais e localmente adaptados.....	41
Tabela 6 - Estimativas por grupo genético de índices relacionados à variabilidade genética de 190 suínos comerciais e localmente adaptados avaliados com 18 microssatélites.....	45
Tabela 7 - Distância genética de Nei (1972) (abaixo da diagonal) e $F_{ST}$ médio estimado (acima da diagonal) entre cada par de 12 grupos genéticos de suínos.....	50
Tabela 8 - Distribuição dos suínos SRD de cada região fisiográfica do Estado de Pernambuco em cada um dos dois clusters inferidos pela estatística DeltaK. A quantidade de indivíduos por região corresponde a N.....	56
Tabela 9 - Proporção de indivíduos de cada um dos 12 grupos genéticos estudados em relação a cada cluster determinada pela estatística DeltaK.....	57

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coleta de pelos em um suíno com características da raça localmente adaptada Piau.....	23
Figura 2 - Amostras de DNA visualizadas em gel de agarose 1%.....	24
Figura 3 - Quantificação do DNA em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo após diluição para 3ng/ $\mu$ L.....	25
Figura 4 - Estimativa do melhor K pela estatística DeltaK para as populações inferidas com o programa <i>Structure</i> que variou de K1 a K15.....	37
Figura 5 - Distribuição da estrutura genética dos 12 grupos genéticos suínos investigados neste estudo com o programa <i>Structure</i> para K = 2.....	38
Figura 6 - Distribuição da quantidade de alelos totais e alelos raros em 12 grupos de suínos.....	40
Figura 7 – Variações dos parâmetros número médio (Nam) e efetivo (Nea) de alelos nas populações comerciais, locais e nos 12 grupos genéticos representados pela média geral.....	47
Figura 8 - Variações dos parâmetros conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho) e índice de consanguinidade ( $F_{IS}$ ) nos grupos genéticos comerciais, locais e nos 12 grupos genéticos.....	47
Figura 9 – Árvore de distância genética agrupada pelo método UPGMA baseada nos valores da distância de Nei (1972).....	51

Figura 10- Representação da análise de Componentes Principais dos 12 grupos genéticos suínos.....	52
Figura 11- Distribuição dos suínos do grupo genético SRD em cada classe de probabilidade de alocação.....	54
Figura 12- Distribuição dos suínos do grupo genético SRD em cada classe de probabilidade de alocação nos dois clusters inferidos pela estatística DeltaK (K=2).....	55

## Resumo

No Brasil, os suínos naturalizados ou animais ditos localmente adaptados encontram-se em via de extinção devido à supervalorização das raças suínas exóticas que tem ocasionado perda de diversidade genética nessas populações. Dessa forma, objetivou-se caracterizar a diversidade e estrutura genética de nove grupos genéticos (GG) de suínos localmente adaptados: Baé (n=11), Caruncho (n=07), Canastra (n=29), Canastrão (n=09), Mamelado (n=07), Moura (n=18), Nilo (n=16), Piau (n=17) e Sem Raça Definida (SRD; n=47) e três raças exóticas: Duroc (n=04), Landrace (n=21) e Large White (n=04) com 22 marcadores microssatélites, e testar a viabilidade desses marcadores para alocar indivíduos de um GG SRD à sua população real. Detectou-se 198 alelos com 18 *loci* analisados em 190 suínos de 12 GG, todos foram polimórficos com PIC (conteúdo de informação polimórfica) variando de 0,54 (SW72) a 0,93 (S0005). Os resultados da AMOVA mostraram que 3,2% da variação total foram provenientes da diferença entre GG ( $P < 0,0001$ ) e 3,6% ( $P < 0,0001$ ) entre suínos locais e comerciais. As médias de alelos totais e efetivo de alelo ( $N_e$ ) foram menores para a raça comercial Duroc (3,65 e 3,01) e maiores para os GG SRD (8,89 e 4,53) e Canastra (8,61 e 4,58). Os nove GG locais apresentaram maior valor médio para os índices: número médio de alelos ( $N_m = 7,22$ ),  $N_e$  (4,18), PIC (0,67) e heterozigosidade esperada ( $H_e = 0,71$ ), enquanto, a heterozigosidade observada ( $H_o = 0,60$ ) foi menor devido à consanguinidade intrapopulacional ( $F_{IS} = 0,17$ ). Com exceção da raça Large White, todos os GG apresentaram desvio significativo ( $P < 0,05$ ) para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Utilizando o método UPGMA a partir da distância genética padrão de Nei, a raça Landrace foi agrupada com os GG locais Canastra, Moura, Canastrão, Baé e Caruncho. Baseando-se nos dois grupamentos ( $K=2$ ) para os testes de alocação dos suínos SRD, a maior parte (71,8%) dos indivíduos SRD foi agrupada em *clusters* separados das raças comerciais. Dois grupamentos parecem descrever adequadamente a distribuição da variabilidade genética encontrada nos 12 GG, os quais apresentaram baixo nível de diferenciação, conduzindo a uma estrutura genética populacional complexa, e os 18 *loci* foram eficazes para alocar os indivíduos SRD a sua população real.

**Palavras-chave:** genética animal, locos de microssatélites, *Sus scrofa*, variabilidade genética

## Abstract

In Brazil, naturalized pigs or animals called locally adapted are endangered species due to the overvaluation of exotic pig breeds that have caused loss of genetic diversity in these populations. Thus, this study aimed to characterize diversity and genetic structure of nine pig genetics groups locally adapted: Baé (n=11), Caruncho (n=07), Canastra (n=29), Canastrão (n=09), Mamelado (n=07), Moura (n=18), Nilo (n=16), Piau (n=17) and mongrel (SRD; n=47) and three exotic breeds (Duroc=04, Landrace=21 and Large White=04) with 18 microsatellite markers as well as testing these markers to allocate individuals from a mongrel population and their actual population. It was detected 198 alleles with 18 *loci* examined in 190 pigs from 12 genetic groups, all of them were polymorphic with PIC (polymorphic information content) ranged from 0.541 (SW72) to 0.933 (S0005). The results of AMOVA showed that 3.2% of total variation came from the difference between genetic groups ( $P < 0.0001$ ) and 3.6% ( $P < 0.0001$ ) between local and commercial pigs. The average alleles and alleles effective Nea were lower for commercial Duroc breed (3.65 and 3.008) and higher for mongrel populations (8.89 and 4.53) and Canastra (8.61, 4.58) detaching the high genetic diversity of the last ones. The nine local GG showed greater average value for the rates: alleles average number ( $N_{am} = 7.22$ ), Nea (4.18), PIC (0.67) and the expected heterozygosity ( $H_e = 0.71$ ), while the heterozygosity observed ( $H_o = 0.60$ ) was lower due to intrapopulation inbreeding ( $F_{IS} = 0.17$ ). Using the UPGMA method, Landrace breed was grouped with Canastra, Moura, Canastrão, Baé and Caruncho populations. Another group was formed by populations Piau, Mongrel, Nilo and Mamelado, while Large White and Duroc breeds were isolated from the rest. Based on the two populations ( $K=2$ ) for allocation of mongrel pigs, most (71.8%) individuals SRD was grouped into separate clusters of commercial breeds. Two clusters seem to accordingly describe the distribution of genetic variability found in 12 GG, which showed low level of differentiation, leading to a complex population genetic structure and the 18 *loci* were effective to allocate mongrel individuals to their actual population.

**Keywords:** animal genetics, *loci* of microsatellites, *Sus Scrofa*, genetic variability

## **1. Introdução**

No Brasil, a maioria do rebanho suinícola está composta de raças de alto potencial genético para produção de carne, como Landrace, Large White, Duroc, Pietrain e Hampshire, que foram introduzidos intensamente no País a partir da década de 60, e as linhagens comerciais, em sua maioria formada por cruzamentos, mais recentemente. Os suínos naturalizados ou animais ditos localmente adaptados que sobreviveram a processos de seleção natural desde o Período Colonial encontram-se em via de extinção, por serem animais caracterizados do tipo banha e pelos seus índices zootécnicos inferiores de produção de carne.

Apesar das raças exóticas serem mais produtivas, em relação às raças e/ou ecótipos de suínos localmente adaptados, são menos adequadas às condições de criação extensiva que ainda existem espalhadas em todas as regiões brasileiras, principalmente, nas regiões Norte e Nordeste. Por exigirem mais investimentos e cuidados em instalações, nutrição, manejo sanitário e geral, necessários para as raças melhoradas expressarem seu potencial produtivo, elas são menos criadas. Esse foi um dos motivos que garantiram a sobrevivência de algumas raças e/ou ecótipos de suínos localmente adaptados com um pequeno efetivo populacional que, aliado as práticas de manejo reprodutivo desordenado, como o cruzamento com raças comerciais, são responsáveis pela perda de diversidade genética e pelo aumento do nível de consanguinidade que leva às populações à extinção.

A importância da diversidade genética dentro das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variação presente dentro de cada uma, sendo que a perda de um único tipo ou raça compromete o acesso aos seus genes e combinações genéticas únicas que podem ser úteis na agricultura do futuro (EGITO et al., 2002).



Atualmente, a composição genética de remanescentes das raças e/ou ecótipos de suínos é resultante das práticas de manejo e melhoramento durante décadas adotadas pelos pequenos produtores, a fim de obter animais com características mais adequadas para as suas condições de produção, resultando em animais com fenótipos variados que dificultam identificá-los apenas por suas características morfológicas externas. Esses animais sustentaram a suinocultura no país durante séculos, permitindo que famílias aproveitassem os pequenos espaços de suas propriedades, inserindo-as nas atividades pecuárias, e, portanto, requer atenção, uma vez que no Brasil muitos dos suínos localmente adaptados estão em via de extinção.

A suinocultura é uma atividade importante para a economia do Estado de Pernambuco, posto que é praticada na maioria das propriedades rurais, estando distribuída por todas as regiões fisiográficas do Estado. Segundo os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2007), o estado possui o quinto maior rebanho do Nordeste, com um efetivo de suínos de 495,957 cabeças.

Os plantéis de suínos, em Pernambuco, encontram-se distribuídos tanto nos núcleos urbanos como nos núcleos rurais, não apresentam infraestrutura adequada para realizar escrituração zootécnica e a maioria possui de um a dez animais, sendo caracterizados como de subsistência familiar; contudo, muitas vezes são a única fonte de renda para o produtor. Nesses plantéis também foram identificados suínos com características morfológicas semelhantes às dos suínos localmente adaptados como Piau, Baé, Nilo, Canastra e Caruncho (SILVA et al., 2005; MARQUEZIN et al., 2006 e SILVA et al., 2006).

O baixo poder aquisitivo dos produtores de suínos no Estado de Pernambuco impede a obtenção de material genético de alta qualidade, levando-os a preferir animais mais rústicos. A necessidade de produzir em menos tempo conduz aos cruzamentos entre os suínos localmente adaptados com as raças exóticas já miscigenadas, produzindo, assim,

animais sem características de padrão racial definido, gerando ecótipos de suínos denominados de Sem Raça Definida (SRD).

Nos últimos anos, os avanços das técnicas moleculares proporcionaram a realização de vários estudos em populações em vias de extinção, visando avaliar ou estimar a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de uma população utilizando as informações dos marcadores moleculares como os microssatélites, que são considerados marcadores moleculares ideais para o estudo de diversidade genética em populações por serem altamente polimórficos, de expressão co-dominante, multialélicos, podem ser facilmente amplificados via reação em cadeia da polimerase (PCR) e a maioria estão localizados em regiões do DNA que não expressam um fenótipo sendo considerados marcadores neutros.

Diversos estudos com populações de animais domésticos utilizaram os microssatélites para estudar a diversidade e estrutura genética em vários países, contudo, ainda existem raros trabalhos deste tipo com suínos localmente adaptados no Brasil.

Diante do exposto, a proposta deste trabalho foi realizar um estudo de diversidade e estrutura genética de populações suínas no Estado de Pernambuco devido à grande lacuna existente quanto a esses tipos de estudos com os suínos localmente adaptados no Brasil. Para que isso fosse possível, utilizou-se marcadores microssatélites a fim de gerar informações que possam ser úteis para futuros programas de conservação e uso de recursos genéticos na região e ainda poderão ser adaptados para outras regiões do Nordeste e Brasil.

## **2. Revisão de literatura**

### **2.1. Situação e caracterização morfológica de suínos localmente adaptados no Brasil**

As primeiras raças suínas introduzidas no Brasil pertenciam às raças da Península Ibérica existentes em Portugal (Bizarra e Aletejana), algumas da Espanha (Galega e Perigordina), da Itália (Napolitana) e da Ásia (Macau). Da mestiçagem, cruzamento, consanguinidade e seleção dessas raças, além de algumas inglesas e americanas, surgiram as raças ou ecótipos nacionais, crioulas ou locais: Canastra, Canastrão, Caruncho, Nilo, Pereira, Piau, Pirapitinga, Moura, além dos animais com o fenótipo Casco de Burro (MACHADO, 1967; VIANNA, 1986).

Até a década de 50, a suinocultura brasileira caracterizava-se por sistemas extensivos com a utilização das raças nacionais produtoras de banha (SILVA FILHA et al., 2005). A partir da década de 60, os suínos localmente adaptados foram substituídos intensamente pelas raças geneticamente melhoradas, Landrace e Large White, importadas principalmente da Europa, e pela Duroc-Jersey, dos Estados Unidos da América do Norte (IRGANG e ROBSON, 1984 e VIANNA, 1986), e isso tem causado perda de diversidade genética nas populações suínas locais.

As raças e/ou ecótipos de suínos naturalizados sempre foram criados nas pequenas propriedades rurais do Brasil devido a sua capacidade de adaptação às condições precárias de manejo e alimentação. Entretanto, por serem caracterizados como animais do tipo banha, perderam sua preferência no mercado, levando os criatórios tradicionais a substituírem gradativamente esses animais. Isso provocou grandes mudanças na suinocultura tradicional, já que para os animais exóticos expressarem seu potencial

produtivo nas condições tropicais foram necessários investimentos em instalações, sanidade, nutrição, mão-de-obra qualificada e manejo geral, aumentando-se a busca por animais cada vez mais especializados para produção de carne magra.

Atualmente, das treze raças e/ou ecótipos identificados no Brasil uma está criticamente ameaçada e 12 correm risco de extinção (MARIANTE et al., 2003). Apenas duas das raças suínas brasileiras foram registradas até o momento, em livro aberto, pela Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS): a Piau, no ano de 1989, e Moura, que foi reconhecida no ano de 1990, distribuídas, principalmente, na Região Sudeste e Sul do País, respectivamente.

A raça Piau foi a primeira raça nacional registrada no Pig Book brasileiro, em 1989, com 1250 suínos registrados entre 1989 e 1995. A principal qualidade do Piau é a rusticidade e pode ser identificado pela pelagem ovejuna (branca/creme com manchas pretas difusas), orelhas do tipo asiáticas a ibéricas e perfil fronto-nasal retilíneo a subconcavilíneo. A média de leitões nascidos é de 8,06, ao desmame é de 7,41 leitões, o peso médio da leitegada aos 21 dias é de 33,43 kg. Considerada a raça brasileira mais importante, segundo Cavalcanti (1984), foi a que sofreu maior processo de seleção e melhoramento genético. Além disso, é ainda hoje muito utilizada em diversos trabalhos que buscam a identificação de genes ligados a características de interesse econômico, como desempenho e qualidade da carne.

Um ano depois de registrar os animais da raça Piau, os primeiros registros genealógicos da raça Moura foram emitidos pela Associação Brasileira de Criadores de Suínos (ABCS) em 1990 (FÁVERO et al., 2007).

A raça Moura, que provavelmente originou-se do cruzamento entre as raças Canastrão, Canastra e o Duroc (EGITO et al., 2002), é considerada uma das mais antigas e preservadas até hoje em pequenos plantéis da Universidade Federal do Paraná (UFPR),

Embrapa Suínos e Aves e Universidade Estadual de São Paulo, além de algumas fazendas em Santa Catarina e Paraná. Até 1995 foram registradas 1668 cabeças suínas. As características marcantes para criação desses animais são a sua rusticidade, prolificidade, o comprimento de carcaça e o marmoreio na carne. Os animais possuem pelagem preta entremeada de pelos brancos, orelhas do tipo ibéricas grandes e firmes e perfil fronto-nasal retilíneo a subcôncavilíneo. A média de leitões nascido é de 8,32 e de leitões desmamados 7,57, o peso médio dos leitões aos 21 dias é de 33,60 kg.

Quanto aos demais ecótipos, não foi possível catalogá-los, embora sejam ainda encontrados alguns exemplares espalhados pelo Brasil, sendo utilizados em cruzamentos com raças exóticas (CASTRO et al., 2002; SILVA FILHA et al., 2005; SILVA et al., 2006; NETO et al., 2007).

Apesar das raças exóticas terem alto potencial produtivo, a maioria não apresenta características adaptativas, tais como resistência a doenças e parasitas encontrados nos grupos locais (MARIANTE; CAVALCANTE, 2006), que foram adaptadas aos trópicos, onde sofreram uma forte pressão de seleção natural, imposta pelo clima, tipo de solo, altitude, oferta alimentar, doenças endêmicas, parasitismo, manejo tradicional e demanda de mercado (ABREU et al., 1998; EGITO et al., 2002), características essas que podem ser utilizadas futuramente nos programas de melhoramento (SOLLERO et al., 2008).

Desde muito tempo, a caracterização das diferentes raças de animais domésticos existentes visando a conservação de recursos genéticos era baseada, praticamente, em características morfológicas e produtivas. Um ponto negativo proveniente dessas informações é que elas podem sofrer influência do meio ambiente; mesmo assim, Poli et al. (1999) defendem que para caracterizar populações os parâmetros morfométricos devem ser considerados por serem altamente herdáveis, embora sofram alterações impostas pelo meio ambiente.

A caracterização morfológica ainda é considerada muito útil no estudo das relações genéticas entre raças ou populações em geral (JORDANA et al., 1993; CAPOTE, 2000). Contudo, a caracterização morfológica de raças e/ou ecótipos de suínos naturalizados no Brasil, que poderia auxiliar na identificação de populações biologicamente adaptadas, tem sido negligenciada na maioria dos estudos que envolvem tais populações, podendo ser justificada tanto pela dificuldade de contê-los como de diferenciá-los pelas características externas, uma vez que os poucos exemplares que restaram são utilizados em cruzamentos com as raças suínas comerciais para obtenção de animais mais adaptados às exigências do mercado consumidor, e isso tem resultado em animais com características morfológicas muito heterogêneas.

A caracterização morfológica pode ser baseada em características quantitativas que permitem o conhecimento das condições corporais através de medidas nos animais, e as qualitativas, que facilmente são distinguíveis apenas pela observação como a cor dos pelos, tipo de orelha, perfil cefálico, presença de cerdas etc (BARBA, 2004). Na Tabela 1, encontram-se as características morfológicas de oito grupos genéticos de suínos localmente adaptados às condições brasileiras.

Alguns trabalhos de censo e caracterização morfológica de suínos naturalizados foram realizados no Brasil por Castro et al. (2002) em 26 propriedades do Distrito Federal, onde encontraram uma população de 253 animais de diversos tipos nativos com predomínio da raça Piau, seguido do Nilo, Pirapitinga e Caruncho. Os autores também identificaram um tipo conhecido como Cuié, que tem pele negra, poucas cerdas e orelhas muito pequenas, em forma de colher. Ainda documentaram outro tipo de porte pequeno, com patas curtas, localmente conhecido como Bassé.

Tabela 1 – Características morfológicas de suínos localmente adaptados no Brasil.

Raça/ecótipo	Cor da pelagem	Cerdas	Perfil Cefálico	Tipo de Orelha
Canastra <sup>1,2,3</sup>	Preta	Presentes	Sub-côncavo ou côncavo	Ibérica
Canastrão <sup>1,2,3</sup>	Preta ou vermelha	Presentes	Côncavo	Céltica
Caruncho <sup>1,2,3</sup>	Creme com preto, vermelho e branco ou preto	Presentes	Côncavo ou sub-côncavo	Asiática ou Ibérica
Moura <sup>3</sup>	Cinza	Presentes	Retilíneo ou sub-côncavo	Céltica ou Ibérica
Nilo <sup>1,2,3</sup>	Preto	Ausentes ou muito fina	Sub-côncavo ou retilíneo	Ibérica
Piau <sup>1,2,3</sup>	Branco-Creme com preto ou pintas vermelhas	Presentes	Retilíneo	Ibérica ou Asiática
Pirapetinga <sup>1,2,3</sup>	Preta ou marrom	Ausentes	Sub-côncavo	Asiática
Tatu <sup>1,2</sup>	Preta	Raras		Asiática

Fonte: <sup>1</sup>Barreto (1973); <sup>2</sup>Vianna (1986); <sup>3</sup>Castro et al. (2002).

Neto et al. (2007), ao realizarem estudo semelhante, encontraram uma população pequena no Estado da Paraíba com 54 suínos, na qual predominou o suíno Canastrão, seguindo o Piau, Moura e Baé ou Bassê. Silva et al. (2006) também encontram em 14 municípios do Estado de Pernambuco 36 suínos com indicativos nativos, caracterizados pelo perfil cefálico, tipo de orelha e pelagem, com predomínio do Baé, seguindo Piau, Canastra, Canastrão e Nilo.

Esses estudos de caracterização e identificação de grupos raciais por meio de parâmetros morfoestruturais são fundamentais para se conhecer a relação filogenética de grupos étnicos de uma região e poderão servir de subsídios, tanto para o reconhecimento de uma raça ameaçada de extinção ou também para criar uma nova raça; contudo, deve ser

integrada com métodos moleculares para avaliar se os grupos identificados se diferenciam geneticamente ou não.

## **2.2. Conservação de recursos genéticos animais**

A manutenção da variabilidade genética tem sido reportada como o principal objetivo dos programas de conservação (FABUEL et al., 2004). Contudo, existem dificuldades em estabelecer as prioridades de conservação e melhoramento de raças no manejo de recursos genéticos animais, não devendo envolver somente a diversidade genética, mas também as probabilidades de extinção e as características importantes para a sociedade envolvida na criação destes animais (REGE; GIBSON, 2003).

A conservação da diversidade genética animal é realizada com a utilização de metodologias de conservações *in situ* e *ex situ*. É denominada *in situ* quando os animais vivos são mantidos em seu habitat natural. A conservação *ex situ* pode ser *in vivo*, quando os animais são mantidos fora do local onde foram naturalmente selecionados (como preservação em zoológicos) ou *in vitro*, quando há o armazenamento criogênico de tecidos reprodutivos, além da conservação molecular (bancos de DNA) (HODGES, 1992).

A conservação realizada em Núcleos de Conservação localizados no habitat onde os animais foram submetidos à seleção natural (*in situ*) é fundamental por permitir um manejo mais rigoroso visando, dentre outros aspectos, uma diminuição significativa da consanguinidade nos rebanhos (MARIANTE et al., 1999).

Para que um programa de conservação tenha sucesso é necessária a visão de um uso futuro desse conhecimento para atender programas de melhoramento animal (EGITO et al., 2002). Desse modo, a visão atual é a de manter a diversidade genética máxima de cada



espécie, presumindo as necessidades futuras para o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis (SIMIANER; MEYER, 2003).

As etapas de identificação das populações em vias de extinção ou diluição genética, caracterização fenotípica e genética e a avaliação do potencial produtivo são primordiais no processo de conservação das espécies (MARIANTE et al., 1999). Entretanto, a longa relação de raças extintas ou em extinção não significa, na maioria dos casos, a existência de genes capazes de melhorar as raças ditas modernas. Preservá-las é a única alternativa para avaliar a possível contribuição genética destas nos programas atuais de melhoramento genético (PEREIRA, 2008).

No Brasil, para evitar a perda de material genético de suínos naturalizados, em 1983, o Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia da Embrapa decidiu incluir dentre as suas prioridades a conservação de recursos genéticos animais, incluindo em seus programas as raças suínas naturalizadas: Piau (Sudeste e Nordeste), Monteiro (Pantanal) e Moura (Sul), que até aquele momento era dedicado a plantas (MARIANTE et al., 2009). Juntamente com outras unidades espalhadas pelo Brasil vêm contribuindo com estudos de levantamento populacional, caracterização morfoestrutural e genética, por meio de marcadores moleculares com diversas espécies que estão ameaçadas de extinção.

A nível mundial, em 1990, a FAO com apoio da UNEP (United Nations Environment Programme) e da EAAP (European Association of Animal Production) iniciou o desenvolvimento de uma base de dados (Global DATAbank), no qual dispõe de informações sobre as raças ou ecótipos de várias espécies de animais e atividades de conservação de diversos países, porém ainda existem poucos ou raros subsídios dos suínos brasileiros disponibilizados no Domestic Animal Diversity Information System (DAD-IS).

### 2.3. Características dos marcadores microssatélites

Marcador molecular é qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA e, para ser ideal, deve apresentar alto nível de polimorfismo, estabilidade em diferentes ambientes, detectar grande número de *loci* não ligados e ser de herança simples (MATIOLI, 2001). Por muito tempo, os estudos genéticos e de melhoramento tinham como ferramenta os marcadores morfológicos. Após a década de 60, surgem os marcadores isoenzimáticos que, diferente dos morfológicos, apresentam neutralidade em relação aos efeitos fenotípicos.

Os avanços das técnicas moleculares foram imprescindíveis para evolução de estudos de populações ameaçadas de extinção. A partir da década de 80, os marcadores moleculares têm sido largamente empregados nos estudos de populações de animais e plantas por permitirem a determinação de genótipos de indivíduos em vários *loci* em diversas espécies. Com as informações moleculares pode-se estimar a distribuição e quantificar a variabilidade genética entre e dentro dos indivíduos de uma população que é de extrema importância na conservação genética e melhoramento de uma raça (ARANGUREN-MÉNDEZ et al., 2005).

Hoje, os estudos de variabilidade genética nas sequências de DNA utilizam as diversas técnicas que empregam marcadores moleculares como RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) e STR (sequências simples repetidas) ou microssatélites (OLIVEIRA, 2007), polimorfismos de base única (SNPs), cromossomo Y e DNA mitocondrial. Dentre esses marcadores moleculares, os microssatélites foram considerados pela FAO os marcadores moleculares de eleição para estudos de diversidade genética em populações. Apesar disso, a escolha do

marcador apropriado dependerá do grau de polimorfismo do mesmo e do tipo de divergência evolutiva a ser estudada (BEEBEE; ROWE, 2004).

Os marcadores microssatélites são regiões de DNA em que sequências de um a seis nucleotídeos estão presentes em unidades repetitivas em todo genoma de eucariotos tendem a ocorrer em regiões não codificantes do genoma, por isso, são considerados seletivamente neutros. Além de serem tipicamente de natureza co-dominante, possuem alto polimorfismo genético, riqueza de alelos por *locus*, alta heterosigiosidade e o mais elevado conteúdo informativo dentre os marcadores moleculares. Com a tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) cada *locus* de microssatélite pode ser amplificado e analisado indiscriminadamente ou por multiplex, onde vários *loci* podem ser amplificados e analisados de uma só vez em sistemas semi-automatizados ou automatizados, características estas altamente desejadas em um marcador molecular (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As características dos microssatélites apresentadas também possibilitam o acesso mais acurado dos níveis de variabilidade genética e níveis de consanguinidade, facilitando a elaboração de estratégias de conservação que permitam recuperar os níveis de diversidade das populações (OLIVEIRA, 2007), assim como permitem estabelecer comparações genéticas entre alelos, genes para demonstrar as variações entre indivíduos e grupos de animais das populações (MARTÍNEZ et al., 2000; MENEZES et al., 2006).

Entretanto, os microssatélites apresentam algumas limitações como mutações nas regiões flanqueantes que são responsáveis pela ocorrência de alelos nulos ou silenciosos que não são amplificados na reação de PCR, dificultando, muitas vezes, a identificação dos heterozigotos, outra limitação seria a ocorrência de alelos idênticos (homoplasia) (JARNE; LAGODA, 1996).

Estima-se que os microssatélites sofrem entre  $10^{-3}$  e  $10^{-5}$  mutações por gameta, porém não se conhece muito sobre o mecanismo mediante o qual isso ocorre. Têm-se proposto dois possíveis processos que podem atuar separadamente: *crossing over* desigual durante a meiose, no qual o polimorfismo surge devido emparelhamento errado entre cromossomos homólogos, e por *slippage* (deslizamentos durante a replicação do DNA) quando a fita nascente de DNA se dissocia da fita molde e volta a se alinhar com ela. Sugestiona-se que o deslizamento durante a replicação é o mecanismo predominante nos microssatélites (WOLFF et al., 1989) por ocorrer em maior frequência em relação aos processos mutacionais ou inserções e deleções nucleotídica (POWEEL et al., 1996).

Apesar do estudo com microssatélites ser relativamente simples, um dos desafios é entender o processo mutacional. Além do modelo com infinito número de alelos (IAM) (KIMURA; CROW, 1964) e o modelo de duas fases (TPM) tem-se desenhado outros modelos de mutação como o modelo de mutação passo a passo (SMM), que explica a maioria das mutações nos marcadores microssatélites (OTHA; KIMURA, 1973), segundo o qual os alelos mutam ganhando ou perdendo uma unidade repetitiva.

Em 1995, consultores do projeto intitulado *Measurement of Domestic Animal Diversity* (MoDAD), FAO e a *International Society of Animal Genetics* (ISAG) elaboraram diretrizes e recomendações técnicas para a avaliação da diversidade genética, elaborando listas com *loci* de microssatélites para estudos de diversidade genética em várias espécies domésticas para serem utilizados em projetos internacionais. Essa lista foi ampliada no ano de 2004 e atualmente recomenda-se um painel de 27 marcadores microssatélites para o estudo de diversidade genética de suínos como estratégia de manejo de recursos genéticos.

Isso tem resultado em diversos trabalhos sobre a diversidade e estruturação genética de suínos localmente adaptados no Brasil por Sollero et al. (2008) e em outros países (CALVO et al. (2000), MARTÍNEZ et al. (2000), LEMUS-FLORES et al. (2001),

CHAIWATANASIN et al. (2002), FABUEL et al. (2004), LI et al. (2004), CANUL et al. (2005), KIM et al. (2005), MARTÍNEZ et al. (2005), THUY et al. (2006), VICENTE et al. (2008)), bem como de outras espécies de interesse econômico como em ovinos Paiva et al. (2004) e Paiva (2005), em bovinos por Maudet et al. (2002) e Egito et al. (2007), galinhas nativas chinesas (TADANO et al., 2007) em caprinos Menezes et al. (2006) e Oliveira et al. (2007), e em equinos (SILVA, 2006).

Dentre os trabalhos supracitados destacam-se o de Sollero et al. (2008), que avaliaram a diversidade e estrutura genética em cinco grupos suínos, três localmente adaptados no Brasil e dois comerciais (Piau, Moura, Monteiro, Landrace e MS60), a partir de informações moleculares geradas por 28 microssatélites, encontrando um importante padrão de diversidade genética apresentada pelas raças comerciais em relação aos grupos locais sugerindo uma possível erosão da diversidade genética dos suínos naturalizados.

Lemus-Flores et al. (2001) concluíram que as populações mexicanas analisadas com microssatélites podem ser um reservatório de diversidade genética que é importante para preservá-las e avaliá-las como uma fonte de novos alelos para o melhoramento futuro de linhas comerciais de suínos. Em estudos semelhantes, Kim et al. (2005), com 16 microssatélites, encontraram alta relação entre suínos coreanos e as raças Berkshire e Landrace. Thuy et al. (2006) com 20 *loci* de microssatélites encontraram nas raças suínas autóctones do Vietnã alto grau de polimorfismo, diversidade alélica e heterozigidade. Avaliando a relação genética entre populações indianas e exótica (Large White), a partir de 23 microssatélites, Behl et al. (2006) identificaram um tipo de suíno indiano distinto.

Os microssatélites aliados com as ferramentas estatísticas disponíveis para o estudo de populações têm sido úteis para obtenção de informações a respeito de suínos ameaçados de extinção.

## 2.4. Estatísticas utilizadas em estudos de diversidade e estrutura genética

A diversidade genética foi definida como sendo o material bruto sobre a qual a seleção natural atua para permitir a adaptação e evolução dos organismos e a sua adequação às mudanças ambientais e que a sua perda reduz o potencial evolutivo e está também associada à redução do sucesso reprodutivo das populações. Populações grandes de espécies naturalmente exogâmicas geralmente têm ampla diversidade genética e são reduzidas nas espécies em perigo de extinção devido ao baixo efetivo, sendo geralmente descrita usando o polimorfismo, a heterosigosidade média e a diversidade alélica para descrever e quantificar a variação genética dentro e entre populações (BERG; HAMRICK, 1997; FRANKHAM et al., 2008).

Complementando, para avaliar a diversidade genética de uma espécie é necessário avaliar a estrutura genética populacional, que é indispensável para a compreensão dos fatores evolutivos que atuam de acordo com as peculiaridades de cada espécie e população. A estrutura genética refere-se à distribuição dos alelos e genótipos no espaço e no tempo, ou seja, essa estrutura genética refere-se à distribuição da variabilidade entre e dentro de populações; sua formação resulta de vários fatores, como: o sistema de acasalamento, níveis de endogamia, fluxo gênico, bem como a deriva genética entre e dentro das populações (HAMRICK, 1982).

O acesso às informações sobre a estrutura e diversidade genética é conseguido pela combinação de marcadores moleculares e ferramentas estatísticas. O cálculo das frequências alélicas realiza-se pela contagem direta dos alelos observados, assumindo que a observação de um só alelo corresponde à condição de homozigose. A partir das frequências alélicas são obtidos os índices de diversidade genética: porcentagem de *loci* polimórficos, número médio de alelos por *locus*, heterozigosidade média observada,

heterozigosidade média esperada, de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, e índices de fixação de Wright.

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) ou diversidade genética é definida como a frequência relativa de indivíduos heterozigotos por *locus*, enquanto a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) é obtida diretamente nas populações amostradas.

Uma heterozigosidade baixa é normalmente a consequência de redução drástica do tamanho efetivo da população (bottleneck). O tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) é muito importante em estudos populacionais e está fortemente relacionado com a diversidade genética das espécies; populações grandes são capazes de manter altas taxas de variação genética em relação às pequenas populações (HAMRICK, 1982). Pode ser estimada a partir de dados demográficos sobre a proporção dos sexos, variância no tamanho das famílias e flutuações no tamanho das populações ao longo das gerações ou a partir de dados genéticos (FRANKHAM et al., 2008).

A relação genética existente entre populações pode ser analisada por meio de medidas de distâncias genéticas que são úteis para traçar as relações históricas e filogenéticas entre grupos e/ou populações. A distância genética é um reflexo das diferenças entre os genes, populações e espécies; quando não há essa diferença a distância será zero (NEI, 1987).

Diversas medidas de distância genética podem ser utilizadas; em geral recomenda-se de duas ou mais distâncias genéticas e assim avalia-se a semelhança entre elas. As mais utilizadas são a distância genética padrão de Nei  $D_S$  (1972) que considera a deriva e mutação e Reynolds (1983) a qual assume o modelo de deriva puro. Em estudos de relação genética entre populações suínas, por exemplo, têm-se empregado vários tipos de distâncias: padrão de Nei (NEI, 1972) por Laval et al. (2000) e Li et al. (2004), a  $D_A$  por

Sollero et al. (2008), Kim et al. (2005) e Martínez et al. (2000), ou ainda autores têm utilizado diferentes medidas (YANG et al., 2003; VICENTE et al., 2008).

O princípio de Hardy-Weinberg é até hoje considerado a base da genética de populações. De acordo com seu enunciado: para qualquer *locus* gênico, as frequências relativas dos genótipos em populações panmíticas permanecem constantes de geração a geração, a menos que fatores como mutação, seleção, deriva genética e migração perturbem esse equilíbrio. Entretanto, quando houver fatores evolutivos causando o desequilíbrio das frequências gênicas e genotípicas, apenas com uma geração de acasalamento ao acaso, sem a ocorrência de tais fatores evolutivos, o equilíbrio é restabelecido.

Para saber se um dado *locus* está ou não em equilíbrio em uma população utilizam-se as proporções de heterozigotos observados e esperados. Quando há déficit de heterozigotos significa dizer que há excesso de homozigotos, logo, a heterozigose observada na população é menor que a esperada, podendo ser resultante da endogamia, deriva genética, além do efeito fundador e o efeito gargalo, ou ainda do efeito Wahlund, que poderá contribuir para o aumento de homozigotos. Os testes comuns usados para verificar a ocorrência de desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) são os testes de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) para as proporções esperadas e observadas de heterozigotos, e o teste exato para uma análise mais rigorosa utiliza-se a partir do algoritmo em cadeia de Monte Carlo-Markov com milhares de interações (GUO; THOMPSON, 1992).

Em estudos de populações naturais, a identificação da estrutura genética pode ser realizada a partir da utilização dos coeficientes de endocruzamentos descritos por Sewall Wright (1951, 1965),  $F_{IS}$  (coeficiente de endogamia em relação às suas subpopulações),  $F_{IT}$  (índice de fixação que mede a redução média de heterozigotos de um indivíduo referente à população global) e  $F_{ST}$  (endogamia devido à diferenciação entre sub-populações, em



relação à população total). Esses coeficientes são baseados nos níveis de heterozigidade presente nos três níveis hierárquicos de uma estrutura populacional como o indivíduo, a subpopulação e a população total. Décadas depois os mesmos índices foram denominados de medidas de diferenciação (COCKERHAM, 1969), análogas aos coeficientes de Wright, baseados na análise de variância das frequências alélicas. Segundo Nei (1977), os três estatísticos F podem ser calculados a partir dos índices de heterozigidade.

$$F_{IS} = 1 - (H_O/H_S), \quad F_{IT} = 1 - (H_O/H_T), \quad F_{ST} = 1 - (H_S/H_T)$$

Onde,

$H_O$  = heterozigidade observada em todos os *loci* tipados para uma determinada população;

$H_S$  = heterozigidade esperada de Hardy-Weinberg;

$H_T$  = heterozigidade esperada de Hardy-Weinberg para a população total.

Valores de  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  variam de -1 a +1, negativos ou próximos de zero indicam que há variabilidade genética na população devido ao maior número de heterozigotos.

Os três índices estão relacionados mediante a equação:

$$F_{ST} = 1 - (1 - F_{IT}) / (1 - F_{IS})$$

O valor de  $F_{ST}$  pode variar de zero, quando não existe diferença entre as populações, a um, quando ocorre a fixação de diferentes alelos nas populações.

Outra metodologia utilizada para avaliar a distribuição da variabilidade entre e dentro das populações é a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992), com a qual se realiza uma análise molecular hierárquica a partir de uma matriz dos quadrados das distâncias entre todos os genótipos, resultando em componentes de variância análogas as estatísticas F de Wright. A análise pode ser aplicada para diversos tipos de marcadores moleculares, como os codominantes ou dominantes e dados de sequências.

Atualmente, um dos métodos que tem sido muito empregado no estudo de estrutura genética refere-se ao Método de Pritchard et al. (2000), o qual utiliza informações moleculares provenientes de microssatélites RFLPs e SNPs para realizar agrupamentos com as frequências alélicas das populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg usando o método bayesiano (Monte Carlo Markov Chain) para designar cada indivíduo a uma determinada população.

### **3. Objetivos:**

#### **3.1. Geral:**

Levando-se em consideração a importância de se estudar a diversidade das raças adaptadas e a escassez de estudos deste tipo em populações de suínos localmente adaptados, o presente estudo teve por objetivo caracterizar, com utilização de microssatélites, a diversidade e estrutura genética de populações suínas localmente adaptadas no Estado de Pernambuco, Brasil.

#### **3.2. Específicos:**

- Caracterizar a variabilidade genética existente intra e interpopulacional e a estrutura genética de nove grupos genéticos de suínos localmente adaptados e três de suínos comerciais com microssatélites;
- Identificar a relação das raças comerciais (Duroc, Landrace e Large White) com as populações suínas localmente adaptadas no Estado de Pernambuco, Brasil;
- Testar um painel de 22 microssatélites para designar indivíduos sem raça definida (SRD) à sua população ancestral.

#### **4. Material e Métodos**

Projeto aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco, registro no CEP n°: 031/2009, processo n°: 23082/2009-B08.

##### **4.1. Critérios para seleção das amostras, amostragem e características da população em estudo**

Os principais critérios para obtenção das amostras foram selecionar os animais acima de seis meses de idade e não aparentados. Para a amostragem de suínos localmente adaptados levaram-se em consideração as características morfológicas qualitativas: tipo de orelha, perfil cefálico, presença ou ausência de pelos, presenças de barbelas (apêndices presentes no pescoço) e características de pelagem (cor dos pelos e pele) e para as raças comerciais exigiam-se o registro genealógico (apenas foi possível para a população Landrace).

Foram utilizadas 190 amostras de suínos localmente adaptados e comerciais, das quais 176 provenientes de 82 propriedades (n) de diferentes regiões do Estado de Pernambuco: 28 amostras da Região Metropolitana do Recife (n=3), 13 da Zona da Mata Norte e Sul (n=6), 19 da Agreste Central e Meridional (n=10) e 116 da região Sertão do Araripe e Salgueiro (n= 63). Quatorze amostras foram de outros Estados do Brasil (Santa Catarina, Distrito Federal e Bahia). A quantidade e distribuição dos animais por raça ou grupo genético e sexo em cada região de origem encontram-se na Tabela 2. O período das coletas foi de janeiro a setembro de 2009.

Os suínos localmente adaptados foram caracterizados por suas particularidades morfológicas qualitativas segundo Barreto (1973), Vianna (1986) e Castro et al. (2002), e distribuídos em nove grupos genéticos (Baé, Caruncho, Canastra, Canastrão,

Tabela 2- Grupos genéticos, siglas de cada grupo, municípios de origem de cada população e quantidade de animais por sexo e por região (N/R) e os municípios visitados em cada região.

Grupo genético/racas	Siglas	Cidades	*Regiões	N/R	Sexo	
					M	F
Baé	SB	Exu, Ouricuri, Granito, Parnamirim e Salgueiro	ST	11	3	8
Canastra	SC	Bezerros e Belo Jardim	AG	06	2	4
		Bodocó, Exu, Ouricuri, Araripina, Granito, Parnamirim e Salgueiro	ST	23	8	15
Caruncho	SCAR	Araripina, Granito, Parnamirim e Salgueiro	ST	07	2	5
Canastrão	SCT	Araripina, Granito, Ouricuri Salgueiro e São José do Belmonte	ST	09	4	5
Duroc	SD	-	EMBRAPA,DF	<sup>a</sup> 04	2	2
Landrace	SLA	Abreu e Lima	MR	21	1	20
Large White	SLW	Goiana	ZM	02	2	-
		-	EMBRAPA,DF	<sup>b</sup> 02	1	1
Moura	SM	Araripina, Bodocó, Exu, Granito, Ouricuri, Parnamirim e São José do Belmonte	ST	18	6	12
Mamelado	SMM	Paulista	MR	05	4	1
		Goiana	ZM	02	1	1
Nilo	SN	Araripina, Exu, Granito Parnamirim, Salgueiro e São José do Belmonte	ST	16	5	11
Piau	SP	Bezerros	AG	1	-	1
		Araripina, Ouricuri Parnamirim e Salgueiro	ST	8	3	5
		-	EMBRAPA,DF	<sup>c</sup> 8	3	1
Sem raça definida	SRD	Vitória de Santo Antão, Itambé, Paudalho	ZM	11	2	9
		Bezerros, São Bento do Uma e Belo Jardim	AG	12	-	12
		Araripina, Bodocó, Exu, Granito, Ouricuri, Parnamirim e Salgueiro	ST	24	5	19
Total				190	54	132

\* MR= Região Metropolitana do Recife; ZM = Zona da Mata; AG = Agreste (AG); ST= Sertão; EMBRAPA, DF para amostras de DNA de suínos obtidas do Banco de DNA e Tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. <sup>a</sup>04 amostras da raça Duroc de Concórdia (SC), <sup>b</sup>02 amostras da raça Large White: 01 de Concórdia (SC) e 01 de Brasília (DF) e <sup>c</sup>08 amostras da raça Piau: 04 da Bahia (BA) e 04 Distrito Federal (DF).

Mamelado, Moura, Nilo, Piau e SRD) (fotos dos suínos locais encontram-se ANEXOS Figuras 1-9). Como população-referência utilizou-se suínos de raças comerciais: Landrace, Large White e Duroc para avaliar suas relações com os localmente adaptados. O grupo SRD foi formado por 47 suínos com características morfológicas bastante heterogêneas que impediram de classificá-los nos demais grupos.

#### 4.2. Material biológico, extração e quantificação do DNA

Para as análises moleculares foram coletadas, de cada suíno, amostras de pelos com bulbo capilar (aproximadamente 100 pelos por cada amostra). Esses pelos foram retirados, preferencialmente na região dorso lombar dos animais após serem contidos com um cachimbo (Figura 1), e colocados em envelopes identificados com informações referentes ao sexo, local de origem, grupo genético/raça e número quando possível, que permaneceram armazenados em temperatura ambiente até o momento da extração do DNA. O DNA das amostras de suínos obtidas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, DF já estava diluído ( $3\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e armazenado em Freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Figura 1 – Coleta de pelos em um suíno com características da raça localmente adaptada Piau. Seta 1 indica a ferramenta utilizada para contenção dos animais e seta 2 mostra os pelos obtidos.

Utilizou-se de 30 a 50 bulbos capilares de cada amostra para extração do DNA, seguindo os procedimentos descritos por Boyce et al. (1989), que utilizam o detergente catiônico brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB 2%) com adaptações. Desse modo, em cada *ependorf* de 1,5μL contendo os bulbos adicionaram-se 500μL do tampão de extração com CTAB e mercaptoetanol que foram macerados com pistilos por aproximadamente cinco minutos. Após extração do DNA, o pellet foi ressuspensionado em volumes de 50μL a 70μL de Tris/EDTA (TE) pH 8,0 (o protocolo para extração e preparação de soluções encontram-se ANEXOS).

O DNA genômico extraído foi visualizado em gel de agarose a 1%, corado com o intercalante de DNA (*Blue Green Loading Dye I*) para avaliação qualitativa. Utilizou-se para cada amostra uma alíquota de 5 μL de DNA e 0,25μL de *Blue Green Loading Dye I*. Na Figura 2, pode-se observar a eficiência da técnica de extração em 24 amostras de suínos localmente adaptados. As setas indicam que algumas amostras apresentaram baixa concentração de DNA, contudo suficiente para reação da polimerase em cadeia.

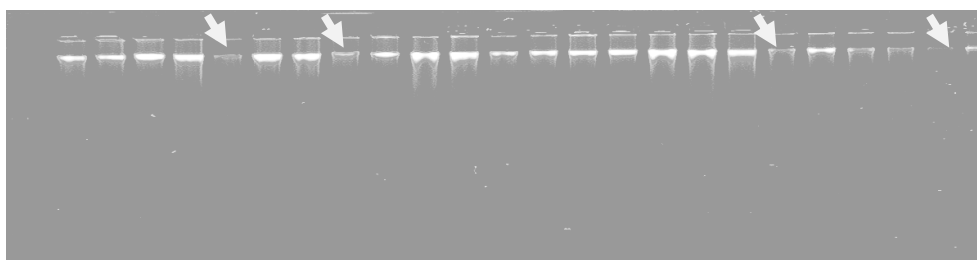


Figura 2- Amostras de DNA visualizadas em gel de agarose 1%. As setas indicam amostras que apresentaram pouco DNA.

A avaliação quantitativa do DNA foi realizada em espectrofotômetro por leitura da absorbância a 260 nm ( $A_{260}$ ) (*Thermo Scientific-BIOMATE 3*) e utilizou-se para cada amostra 5 μL de DNA diluídos em 495 μL de água ultra pura, repetindo a leitura por três

vezes e a concentração final (ng/ $\mu$ L) foi obtida pelo valor médio que variou de 10,5 a 554 ng/ $\mu$ L com uma média total de  $135,4 \pm 115,7$ . Estas etapas foram conduzidas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada (FAMA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As amostras de DNA permaneceram estocadas em Freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até serem encaminhadas ao Laboratório de Genética Animal (LGA) da Embrapa Recursos Genéticas e Biotecnologia, Brasília, DF para realização das análises posteriores.

#### 4.3. Diluição do DNA e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a montagem das reações em cadeia da polimerase (PCR), o DNA genômico foi diluído para uma concentração de 3ng/ $\mu$ L e quantificado no gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo e comparado com padrões de DNA do fago lambda com concentrações conhecida de 10, 20, 30, 40 e 50 ng/ $\mu$ L (Figura 3). Utilizou-se para cada amostra uma alíquota de 5  $\mu$ L de DNA diluído e 2  $\mu$ L de bromofenol e, para o marcador, apenas 1  $\mu$ L de cada concentração e a mesma quantidade de bromofenol (2  $\mu$ L).

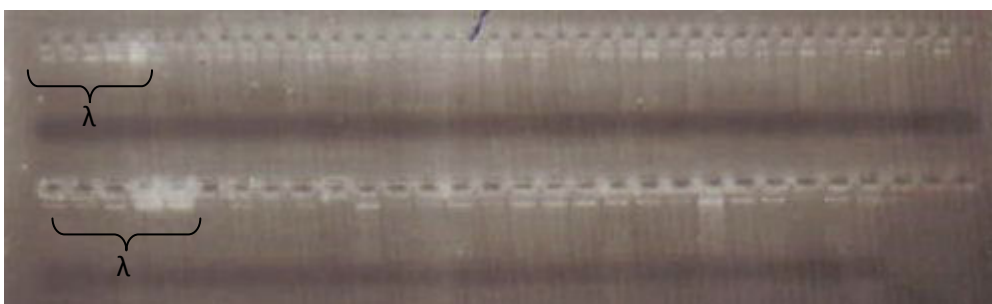


Figura 3- Quantificação do DNA em gel de agarose 2%. Os cinco primeiros poços destacados representam o marcador lambda ( $\lambda$ ) em ordem crescente (10-50ng).

Inicialmente, analisaram-se 22 microssatélites localizados aleatoriamente em 17 cromossomos autossômicos do genoma suínos, dentre os quais 19 fazem parte de um



painel recomendado pela FAO (*Food and Agriculture Organization*)/ISAG (*International Society of Animal Genetics*) FAO (2004) para o estudo de diversidade genética em suínos, dois destes tiveram que ser retirados após realizações dos testes de genotipagem (S0090 e S0386) e dois (S0228 e S0097) foram retirados das análises finais (estatísticas) por problemas nas amplificações; portanto, na Tabela 3 encontram-se as informações dos 22 *loci* sobre os cromossomos, as sequências dos *primers*, variação dos fragmentos esperados e obtidos neste trabalho, em pares de base, tipo de marcação fluorescente e *multiplex* de cada *locus* de microssatélites.

Antes de realizar as amplificações de todas as amostras, realizaram-se testes utilizando quatro amostras de DNA para controle positivo e mais um controle negativo sem DNA (branco) para padronizar a amplificação de todos os *primers*. A qualidade da amplificação foi avaliada com a visualização em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, comparando com padrões de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen). A eletroforese conduziu-se a 120 volts por duas horas em cuba horizontal e a visualização dos tamanhos dos fragmentos foi realizada com a fotodocumentação no *Eagle Eye™ II* (*Stratagene*).

As reações de PCR foram realizadas em termociclador (*Eppendorf Master Cycler Gradiente*) e para reduzir o número de reações, distribuiu-se os 22 pares de *primers* em quatro multiplexes de acordo com o tamanho de fragmentos esperados para cada *locus* em pares de base (bp) e tipo de marcação fluorescente (6' FAM ou HEX).

As reações de amplificação deram-se utilizando o kit (*Qiagen Master Mix*) para PCR multiplex (contendo *HotstartTaq* DNA Polimerase, Tampão para PCR *multiplex* com MgCl<sub>2</sub>, *mix* de dNTP, água *RNase-free* e *QSolution*), segundo as recomendações do fabricante, 4,5ng de DNA genômico e de 0,2 a 0,23mM de cada par de *primer* para um

Tabela 3- Nome dos *loci*, cromossomos (Cr.) seqüências dos *primers*, tamanho esperado (Te) e observado (To) obtido neste trabalho, tipo de marcação fluorescente (Marc.) e multiplexes (M).

<i>Loci</i>	Cr.	Seqüência primer 5'→3'	Te (pb)	To (pb)	**Marc	M
<sup>3</sup> SW1517	2	CAAATGATTTTATCCATCCTTGC TCTTAGTGATGCATTCTTAAGCTG	119-154	109-153	F	A
<sup>1</sup> SW830*	10	AAGTACCATGGAGAGGGAAATG ACATGGTTCCAAAGACCTGTG	174-204	173-196	H	A
<sup>4</sup> S0155*	1	AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC	142-162	133-159	H	A
<sup>3</sup> S0026*	16	AACCTTCCCTTCCCAATCAC CACAGACTGCTTTTTACTCC	84-102	82-97	F	A
<sup>2</sup> S0002*	3	GAAGCCAAAGAGACAACCTGC GTTCTTTACCCACTGAGCCA	191-219	177-224	H	B
<sup>7</sup> S0355*	15	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAAAGCC	244-271	139-268	H	B
<sup>6</sup> SW2406 *	6	AATGTCACCTTTAAGACGTGGG AATGCGAAACTCCTGAATTAGC	222-262	215-263	F	B
<sup>1</sup> SW936*	15	TCTGGAGCTAGCATAAGTGCC GTGCAAGTACACATGCAGGG	94-112	100-124	H	B
<sup>1</sup> SW857*	14	TGAGAGGTTCAGTTACAGAAGACC GATCCTCCTCCAAATCCCAT	140-160	135-165	F	B
<sup>3</sup> S0178*	8	TAGCCTGGGAACCTCCACACGCTG GGCACCAGGAATCTGCAATCCAG	101-128	101-137	F	B
<sup>1</sup> OPN	8	CCAATCCTATTCACGAAAAAGC CAACCCACTTGCTCCAC	142-164	130-165	H	C
<sup>1</sup> S0005*	5	TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCTGATTCTGGGTA	203-241	199-248	H	C
<sup>3</sup> S0101*	7	GAATGCAAAGAGTTCAGTGTAGG GTCTCCCTCACACTTACCGCAG	197-221	187-215	F	C
<sup>1</sup> SW24*	17	CTTTGGGTGGAGTGTGTGC ATCCAAATGCTGCAAGCG	93-121	100-118	F	C
<sup>1</sup> S0068*	13	AGTGGTCTCTCTCCCTCTTGCT CCTTCAACCTTTGAGCAAGAAC	211-260	200-257	H	D
<sup>1</sup> SW72*	3	ATCAGAACAGTCGCCGT TTTGAAAATGGGGTGTITCC	103-113	101-120	H	D
<sup>1</sup> SW455	4	CCTCCCTGGCACTCATTG CACACACACAAGCAGGTGC	184-206	174-209	F	D
<sup>1</sup> SW911*	9	CTCAGTTCTTTGGGACTGAACC CATCTGTGGAAAAAAAAAAGCC	149-173	139-182	F	D

\**Loci* FAO/ISAG (2004), \*\* F = 6<sup>3</sup>FAM; H= HEX

<sup>1</sup> Roher et al. (1994), <sup>2</sup>Fredholm et al. (1993), <sup>3</sup>Roher et al. (1996), <sup>4</sup>Ellegren et al. (1994), <sup>5</sup>Alexander et al. (1996a), <sup>6</sup>Alexander et al. (1996b), <sup>7</sup>Robic et al. (1994).

Tabela 3- Continuação.

<i>Loci</i>	Cr.	Sequência primer 5'→3'	Te (pb)	To (pb)	**Marc	M
<sup>4</sup> S0090*	12	CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	227-249	-	F	D
<sup>8</sup> S0386*	11	TCCTGGGTCTTATTTTCTA TTTTTATCTCCAACAGTAT	156-174	-	F	C
<sup>7</sup> S0228*	6	GGCATAGGCTGGCAGCAACA AGCCACCTCATCTTATCTACACT	220-246	217-240	H	A
<sup>3</sup> S0097*	4	GACCTATCTAATGTCATTATAGT TTCCTCCTAGAGTTGACAAACTT	209-250	201-239	F	A

\**Loci* FAO/ISAG (2004), \*\* F = 6°FAM; H= HEX

<sup>1</sup> Roher et al. (1994), <sup>2</sup> Fredholm et al. (1993), <sup>3</sup> Roher et al. (1996), <sup>4</sup> Ellegren et al. (1994), <sup>5</sup> Alexander et al. (1996a), <sup>6</sup> Alexander et al. (1996b), <sup>7</sup> Robic et al. (1994).

volume final de 7µL ( os protocolos para cada multiplex encontram-se na Tabela I ANEXOS). O termociclador foi programado para iniciar em 95°C por 15 minutos para ativação da enzima Taq DNA Polimerase, seguido de 36 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, 60°C para anelamento por 1 minuto e 30 segundos, extensão 72°C por 1 minuto e 30 segundos e um passo de extensão final de 72°C para alongamento, finalizando em 4°C, totalizando 38 ciclos.

#### 4.4. Genotipagem

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático modelo ABI Prism 3100 (*Applied Biosystems*). Para essa análise, as 190 amostras foram distribuídas em duas placas de 96 poços, com duas amostras sendo repetidas em todas as corridas para controle do tamanho dos fragmentos de um determinado *locus* entre as diferentes corridas.

As reações contidas em cada poço da placa foram de 1 µL de produtos das PCR e 9 µL de um mix constituído de 8 µL de formamida (Hi-Di) e 1 µL de um marcador padrão

de tamanho molecular marcado com a fluorescência ROX desenvolvido para análise dos fragmentos. Antes de submeter as reações à eletroforese capilar, realizou-se uma etapa de desnaturação, a fim de diminuir a taxa de anelamento do DNA a uma temperatura de 94°C (em termociclador) por cinco minutos e resfriamento imediato (em gelo) também por cinco minutos.

Os fragmentos foram identificados com o software *GenScan* v. 3.1 (*Applied Biosystems*), no qual é construído curva de regressão em função dos tamanhos padrões com fluorescência ROX que emite a cor vermelha, designando a cada pico o tamanho de cada curva, enquanto que com *software Genotyper* v. 3.7.0.1 (*Applied Biosystems*) identificaram-se os diferentes alelos de cada microssatélite de acordo com a intensidade de cada pico e o *software FlexiBin* v. 2.0 (AMOS et al., 2006) para identificação das classes alélicas (padrões de alguns alelos dos 18 *loci* encontram-se na Figura 10, ANEXOS). Na Tabela 3 encontram-se as variações dos fragmentos em pares de base obtidos neste estudo.

#### **4.5. Análises estatísticas**

##### **4.5.1. Definição da provável estrutura genética**

A análise de estrutura genética dos 12 grupos genéticos estudados foi realizada primeiramente através do programa Arlequin para determinar a diferenciação genética intergrupos por meio das estimativas  $F_{ST}$  (WEIR; COCKERHAM, 1984), que foram testadas com 100.000 interações de Cadeias de Markov e 10.000 permutações, bem como para a análise de variância molecular (AMOVA), que foi realizada sob quatro diferentes análises:

1. Análise I: consistiu em separar os grupos genéticos por regiões sem considerar suas características fenotípicas e resultou em cinco populações (Metropolitana do Recife, Zona da Mata, Agreste, Sertão e do Banco de DNA e Tecidos da Embrapa, DF.);
2. Análise II: testou-se três principais grupos fenotípicos (suínos localmente adaptados, comerciais e SRD);
3. Análise III: a população SRD foi agrupada com as demais localmente adaptadas, gerando dois grupos: um com as populações comerciais e outro com as localmente adaptadas;
4. Análise IV: considerou-se um único grupo com os 12 grupos genéticos.

A outra estratégia para definição da estrutura populacional consistiu em estimar o número de populações (K) mais provável nas amostras a partir dos dados dos genótipos dos 18 microssatélites. Utilizando o software Structure v. 2.3.3 (PRITCHARD et al., 2000), foi estimado um valor de k de 1 a 15, com cinco simulações para cada K, testados com 100.000 interações para o período de burn-in e 500.000 de repetições de Cadeia de Markov e Simulação Monte Carlo (MCMC), análises adicionais foram realizadas para testar a consistência dos resultados (50.000, 80.000 e 100.000 de burn-in com 100.000, 150.000 e 500.000 de MCMC respectivamente). Os testes foram aplicados com base no *admixture model* (modelo de miscigenação) com as frequências alélicas correlacionadas (FALUSH et al., 2003).

A partir dos logaritmos das probabilidades dos dados ( $\ln P(D)$ ) obtidos com o *Structure* para as duas análises, foi estimado o melhor K com uma estatística *ad hoc* denominada DeltaK, a qual baseia-se na taxa de mudança do logaritmo da probabilidade dos dados entre sucessivos valores de K (EVANNO et al., 2005). Os gráficos para

demonstração da estrutura foram gerados com o programa Structure (PRITCHARD et al., 2000).

#### 4.5.2. Variabilidade intra e inter-populacional

Após a definição da real estrutura dos 12 grupos genéticos foram calculados parâmetros de diversidade intra e interpopulacional.

Com o programa GenAlex v. 6.3 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) foram obtidos em cada *locus* e população o número total de alelos (NA), número médio (Nma) e efetivo de alelos (Nea), frequências alélicas e alélica privadas (PA), heterozigosidade esperada (He) e heterozigosidade observada (Ho), segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Para o cálculo da heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho), o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e duas probabilidades de exclusão de paternidade (PE1 e PE2) em cada *locus* utilizou-se o programa Cervus v. 3.0 (MARSHALL et al., 1998). A probabilidade de exclusão 1 (PE1) estima a probabilidade de exclusão, quando o genótipo do filho é conhecido, e a PE2, quando além do genótipo do filho tem-se também o genótipo de um dos progenitores (pai/mãe).

Para as estatísticas F de Wright ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$ ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) por *locus* e a significância das estatísticas F foi testada por *bootstrap* com 1000 reamostragens, com intervalo de confiança (IC) de 99%, o índice de consanguinidade ( $F_{IS}$ ) dentro das populações e o *P*-value utilizou-se o programa FSTAT v. 2.9.3. (GOUDET, 2002). O teste exato para verificar se os *loci* estavam de acordo com Equilíbrio de Hardy-Weinberg em cada população foi desempenhado com o programa Arlequin v. 3.1 (EXCOFFIER et al., 2006), de acordo com o modelo proposto por Guo e Thompson (1992) pelo método de Cadeias de Markov (1.000.000 interações e um número de

dememorização de 100.000). Esse teste é análogo ao teste exato de Fisher e foi desenvolvido para amenizar a ausência ou baixa frequência de genótipos na análise de marcadores multialélicos, como os microssatélites, e serviu para discriminar os *loci* que estavam em desequilíbrio nas populações. Empregou-se a correção de Bonferroni quando a população apresentou desvio significativo para algum *locus* com  $\alpha = 5\%$  (0,05/18).

A relação genética entre as populações foi avaliada a partir das distâncias genéticas padrão de Nei (1972) e Reynolds (1983) com o programa TFGA v.1.3 (MILLER, 2000). Com a utilização do programa TFGA, utilizou-se a matriz de distância genética padrão de Nei (1972) para a construção de um dendograma pelo método de agrupamento com média aritmética não ponderada UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com um *bootstrap* de 1000 repetições.

Para representar o padrão de distribuição da variabilidade genética e as relações entre as populações, definindo similaridades ou diferenças, uma análise de componentes principais (PCA) foi aplicada utilizando o programa GenAlex, baseando-se na distância genética padrão de Nei (1972), a qual serviu para comparar com os agrupamentos propostos pelo método UPGMA.

#### **4.5.3. Teste de alocação para as amostras de suínos SRD**

A probabilidade de alocação dos indivíduos SRD foi testada com o programa *Structure*, utilizando os procedimentos já descritos anteriormente para definição do número provável de população. Após a obtenção do melhor K considerando os dados de genótipos dos 12 grupos genéticos foi realizada a designação de 47 indivíduos SRD ou grupo genético em um ou mais clusters inferidos pelos valores de suas probabilidades de correlação ou certificação, ou seja, probabilidades de um dado genótipo (X) pertencer a

uma dada população (K) utilizando o método de agrupamento descrito por Pritchard et al. (2000) baseado na inferência bayesiana.

Para identificar a que cluster cada indivíduo pertencia, foram distribuídos os 47 indivíduos SRD pelos valores de probabilidades de alocação em três classes sem considerar os números de clusters:  $> 0,8$ ;  $0,79 - 0,6$  e  $< 0,59$ , depois os indivíduos de cada classe de probabilidade foram distribuídos em cada cluster para identificar em qual população encontrava-se a maior proporção de genótipos SRD.



## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Amplificações**

Dos 22 microssatélites submetidos à amplificação, dois (S0090 e SW836) não apresentaram amplificação de fragmentos nas condições de PCR estabelecidas e dois (S0028 e S0097), apesar de amplificarem os fragmentos, depois da genotipagem observou-se que mais de 40% de suas classes alélicas foram perdidas ou não identificadas sugerindo a presença de alelos nulos, sendo assim, foram excluídos das análises estatísticas. As percentagens de dados perdidos dos 18 *loci* analisados nas populações estão na Tabela II, ANEXOS, na qual mostra que 17 *loci* tiveram menos de 30% (mínimo de 1,6% (SW911) e máximo de 31,1% (S0355) dos alelos não identificados, e apenas um com 31,1%). Dessa forma, utilizaram-se nas análises estatísticas as informações moleculares de 18 microssatélites genotipados em 190 suínos distribuídos em 12 grupos genéticos.

### **5.2. Definição da provável estrutura genética**

O estudo da distribuição da estrutura populacional, em diferentes níveis hierárquicos, utilizando a AMOVA para testar a significância da variabilidade genética encontrada entre os grupos genéticos foi realizado sob quatro análises (Tabela 4). Pode ser observado que embora pequena, a maior variação interpopulacional foi obtida quando se contrastou dois grupos constituídos pelas grupos genéticos comerciais e localmente adaptados com  $F_{ST}$  de 3,6% altamente significativo ( $P < 0,0001$ ). Quando a análise foi realizada com um único grupo formado pelos 12 grupos genéticos o  $F_{ST}$  foi de 3,2% ( $P < 0,0001$ ), indicado que a

população suína amostrada no Estado de Pernambuco possui diferenciação genética significativamente pequena. A última estrutura para os 12 grupos genéticos foi escolhida para ser reavaliada com o programa *Structure* para comprovação da real estrutura da população suína em estudo e então alocar os indivíduos SRD à sua devida população.

Tabela 4- Análise de variância molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estrutura dos 12 grupos genéticos suínos investigados.

Estrutura	Fonte de variação	GL	SQ	CV	%Total	F <sub>ST</sub>	P-value
Análise I	Entre populações	4	27,258	0,02591	0,48	0,0048	>0,0001
Geografia	Dentro das populações	375	2014,916	5,37311	99,52		
Análise II	Entre populações	2	36,962	0,12122	2,09	0,02087	<0,0001
Fenótipo	Dentro das populações	377	2143,796	5,68646	97,91		
Análise III	Entre populações	1	14,915	0,03015	0,52	0,03597	<0,0001
Comerciais vs. locais e SRD	Entre populações dentro dos	10	108,549	0,17848	3,08		
	Dentro das populações	368	2057,294	5,59047	96,40		
Análise IV	Entre populações	11	123,464	0,18744	3,24	0,03244	<0,0001
12 grupos genéticos	Dentro das populações	368	2057,294	5,59047	96,76		

GL=graus de liberdade; SQ=soma dos quadrados; CV= componente de variação; F<sub>ST</sub>=índice de diferenciação.

Nos demais testes, a variação entre os cinco grupos genéticos referentes às regiões de procedência dos suínos, sem considerar suas informações fenotípicas, foi muito baixa (F<sub>ST</sub>=0,48%) e não significativa (P>0,0001) e, quando considerou-se um grupo com três

populações (comerciais, localmente adaptadas e SRD), o  $F_{ST}$  também foi baixo (2,09%;  $P < 0,0001$ ). Em todas essas análises, a maior variação (acima de 95%) ocorreu entre indivíduos dentro das populações, possivelmente, por terem sido provenientes de vários rebanhos e de diferentes regiões. Diante dessa baixa diferenciação genética entre os grupos genéticos, sugere-se a adoção de cruzamentos entre os indivíduos mais distantes como estratégia de conservação da variabilidade genética, assim como controlar o fluxo de genes intenso na população suína no Estado de Pernambuco através de práticas de manejo como a troca de material genético entre plantéis e cidades vizinhas.

A baixa diferenciação entre os grupos genéticos representa a realidade da população em estudo, uma vez que o  $F_{ST}$  é inversamente proporcional ao fluxo gênico e, nesses grupos genéticos, pode-se sugerir que existe alto fluxo de genes entre indivíduos de diferentes plantéis e regiões próximas. Santos-Silva et al. (2009), ao avaliarem raças ovinas portuguesas, afirmaram que as raças geograficamente próximas tendem a um nível de diferenciação pequeno, uma vez que o fluxo de genes entre raças é mais evidente.

Yang et al. (2003) encontraram diferenciação entre populações suínas chinesas ( $F_{ST}=7,7\%$ ) com informações provenientes de microssatélites. Os resultados da AMOVA de cinco populações suínas (Piau, Moura, Monteiro, Landrace e MS60) obtidos por Sollero et al. (2008) mostraram que 14% de toda diversidade observada foi proveniente da diferença entre os grupos genéticos avaliados. Entretanto, tais autores trabalharam com animais provenientes de rebanhos de conservação e comerciais, o que pode ter contribuído para um menor fluxo de genes devido às práticas de manejo adotadas. Em outro estudo realizado com suínos mexicanos, um valor de  $F_{ST} = 11\%$ , próximo ao obtido por Sollero et al. (2008) foi encontrado (LEMUS-FLORES et al., 2001). Os maiores valores de diferenciação genética para populações suínas já reportados foram de  $F_{ST} = 27\%$  (LAVAL

et al., 2000), seguido por 26,1% para um estudo de diferenciação realizado entre suínos europeus, coreanos e chineses (KIM et al., 2005).

O programa *Structure* tem sido largamente empregado em diversos estudos para definição do número provável de populações baseando nos valores médios de  $\ln Pr(X/K)$  (PAIVA, 2005; SOLLERO et al., 2008; VICENTE et al., 2008; MARTÍNEZ et al., 2008 SANTOS-SILVA et al., 2009). Como o *Structure* detecta facilmente duas a quatro populações altamente diferenciadas, e neste estudo, a diferenciação genética observada entre grupos genéticos foi baixa em todas as estruturas testadas, utilizou-se os logaritmos das probabilidades dos dados ( $\ln P(D)$ ) do *Structure* para inferir o melhor K com uma estatística *ad hoc* denominada DeltaK, a qual baseia-se na taxa de mudança do logaritmo da probabilidade dos dados entre sucessivos valores de K (EVANNO et al. 2005) inferindo que o melhor K foi aquele que apresentou o maior valor (92,01) para o  $\Delta K$  (Figura 4). A estatística DeltaK identificou nas 15 populações inferidas (K) maior probabilidade para K=2, assim foi possível visualizar a distribuição da variabilidade genética dos indivíduos conforme essa estrutura.

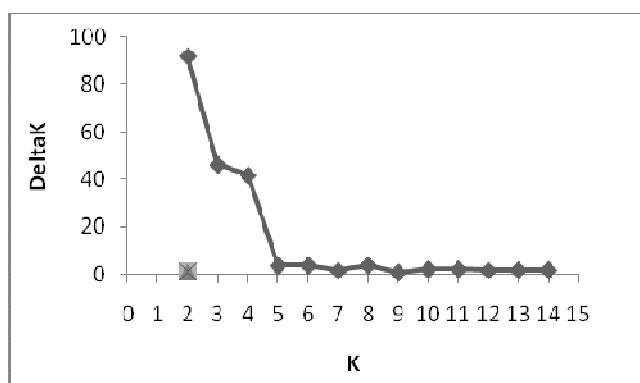


Figura 4- Estimativa do melhor K pela estatística DeltaK para as populações inferidas com o programa *Structure*, que variou de K1 a K15 para os 12 grupos genéticos.

Na Figura 5, as barras verticais correspondem a cada uma das 12 populações e as diferentes espessuras representam a amostragem de cada uma, enquanto as duas cores referem-se às duas populações estimadas pelo DeltaK e representadas graficamente pelo Structure. Quando a linha vertical é de uma única cor significa que 100% do genoma dessa população pertencem a este cluster, a menos que se têm duas cores significativas, demonstrando o compartilhamento de alelos com outras populações ancestrais, como visto nos doze grupos genéticos, e portanto, não foi possível separar os grupos genéticos locais dos comerciais. Contudo, observa-se que os suínos SRD tiveram alta proporção de genótipos representados pela cor vermelha na Figura 5, enquanto, os Canastras quase 100% dos genótipos foram representados pela cor verde, a qual também esteve em maior proporção nas raças comerciais (Landrace, Duroc e Large White).

Existem evidências da contribuição das raças comerciais em diferentes proporções nos grupos localmente adaptados, bem como elevado grau de miscigenação das populações em estudo. Estes resultados corroboram com os obtidos por Sollero et al. (2008), que também concluíram que as raças comerciais compartilham alelos com suínos localmente adaptados, principalmente a raça Landrace com a raça Piau.

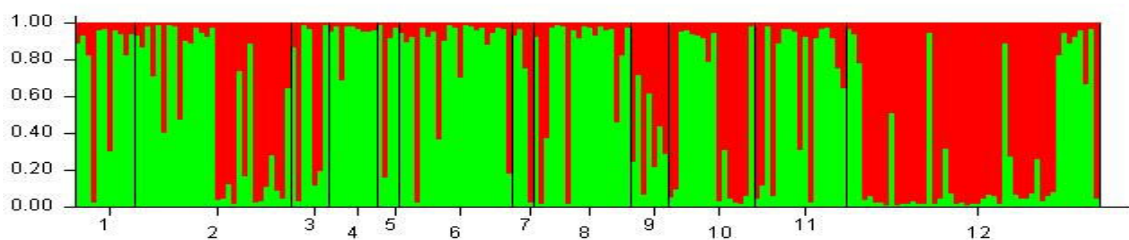


Figura 5- Distribuição da estrutura genética dos 12 grupos genéticos suínos investigados neste estudo com o programa Structure para K=2.

Populações: 1= Baé; 2=Canastra; 3=Caruncho; 4=Canastrão; 5=Duroc; 6=Landrace; 7= Large White; 8= Moura; 9=Mamelado; 10= Nilo; 11=Piau e 12=SRD.

### 5.3. Variabilidade intra e interpopulacional

Foram detectados 198 alelos com os 18 *loci* analisados nos 12 grupos genéticos suínos. Todos os *loci* apresentaram polimorfismo, apenas o marcador S0355 foi monomórfico nas raças Duroc e Large White, entretanto, nessas duas populações ocorreram falhas de genotipagem ou presença de alelos nulos em 75% dos indivíduos genotipados, o que resultou apenas na informação de um indivíduo de cada grupo. Lemus-Flores et al. (2001) detectaram com esse marcador 5 alelos em suínos da raça Duroc e 7 alelos nas raças Large White e Landrace, por outro lado, Martinez et al. (2005), avaliando populações suínas ibéricas verificaram que o S0355 foi monomórfico em seis das onze populações investigadas.

A distribuição das frequências alélicas para os 18 *loci* em cada população encontra-se na Figura 11, ANEXOS. A maioria dos *loci* apresentaram alelos comuns com alta frequência distribuídos em muitas das populações. Treze *loci* (SW1517, SW830, S0155, S0026, S0002, SW240, SW857, S0178, OPN, S0101, SW72, SW455 e SW911) apresentaram de um a dois alelos comuns em todos os grupos genéticos, e 16 alelos estiveram presente em 91,7% das populações suínas (na Tabela III, ANEXOS, encontra-se o número de alelos de cada *locus* compartilhados entre as populações).

Quatro alelos privados (8, 15, 1 e 3) foram detectados com os *loci* S1517, S0355, SW857 e SW72, apresentando baixa frequência de 4%, 6%, 7% e 3%, respectivamente, nas populações SRD (3) e Nilo (1).

Na Figura 6, em oito das 12 populações (Baé, Canastra, Canastrão, Landrace, Moura, Mamelado, Nilo, Piau, SRD) ocorreu a presença de alelos raros (com frequência inferior a 5%). Os grupos SRD, Canastra e Moura apresentaram maior quantidade de alelos totais e alelos raros, 160, 155 e 142 e 68, 63 e 45 respectivamente, pode-se observar a influência

do tamanho da amostra na quantidade de alelos totais. Das raças comerciais, a raça Landrace teve maior quantidade de alelos com 136 nos 18 *loci* genotipados. Desses, 33 tiveram frequência menor que 5%. Essa diferença na quantidade de alelos totais detectados nos grupos locais que foi superior aos comerciais pode ser um indicativo de que as raças comerciais tenham sofrido uma perda de diversidade alélica. Quanto aos alelos raros identificados mais nos grupos locais podem ser provenientes de mutações e/ou fluxo de genes recente. No geral, as frequências alélicas obtidas dos 18 microssatélites oscilaram de forma a demonstrar a existência de variabilidade genética tanto dentro quanto entre populações (Tabela IV, ANEXOS).

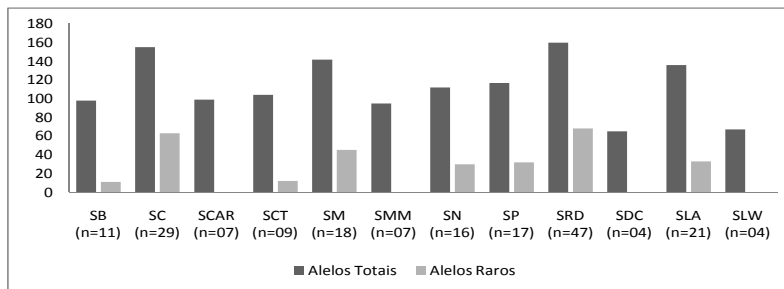


Figura 6 - Distribuição da quantidade de alelos totais e alelos raros em 12 grupos de suínos.

SB (Baé), SC (Canastra), SCAR (Caruncho), Canastrão (SCT), SDC (Duroc), SLA (Landrace), SLW (Large White), SM (Moura), SMM (Mamelado), SN (Nilo), SP (Piau) SRD (sem raça definida).

Na Tabela 5 encontram-se os resultados da análise quantitativa da variabilidade intrapopulacional dos parâmetros: número total ( $N_{ta}$ ), médio ( $N_{ma}$ ) e efetivo de alelos ( $N_{ea}$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), duas probabilidades de exclusão de paternidade (PE1 e PE2), estatísticas F ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  e  $F_{ST}$ ) em cada *locus* e número de grupos genéticos que apresentaram desvios significativos para o teste de EHW.

Tabela 5- Estimativas por *locus* de índices relacionados à variabilidade genética de 190 suínos comerciais e localmente adaptados.

<i>Loci</i>	<sup>a</sup> N <sub>ta</sub>	<sup>b</sup> N <sub>am</sub>	<sup>c</sup> N <sub>ea</sub>	<sup>d</sup> H <sub>o</sub>	<sup>e</sup> H <sub>e</sub>	<sup>f</sup> PIC	<sup>g</sup> PE1	<sup>h</sup> PE2	<sup>1</sup> F <sub>IT</sub>	<sup>2</sup> F <sub>ST</sub>	<sup>3</sup> F <sub>IS</sub>	<sup>m</sup> EHW
SW1517	12	6,80	3,751	0,523	0,776	0,753	0,582	0,400	0,328	0,016	0,316	6
SW830*	7	4,50	2,737	0,486	0,658	0,614	0,748	0,573	0,264	0,019	0,250	1
S0155*	9	6,20	2,709	0,494	0,653	0,633	0,725	0,532	0,243	0,000	0,246	4
S0026*	8	5,20	3,545	0,722	0,755	0,719	0,636	0,456	0,045	0,010	0,035	3
S0002*	9	6,50	4,586	0,911	0,829	0,805	0,513	0,341	-0,095	0,031	-0,130	2
S0355*	8	3,50	1,774	0,206	0,653	0,588	0,760	0,606	0,695	0,242	0,597	6
SW2406*	12	5,40	3,125	0,431	0,678	0,657	0,699	0,507	0,367	0,037	0,343	6
SW936*	12	6,20	4,074	0,497	0,851	0,832	0,462	0,298	0,421	0,055	0,388	4
SW857*	11	4,90	2,664	0,818	0,677	0,646	0,714	0,529	-0,196	0,033	-0,236	2
S0178*	8	4,90	3,089	0,970	0,721	0,688	0,670	0,487	-0,338	0,062	-0,427	7
OPN	13	6,30	3,976	0,514	0,793	0,768	0,563	0,385	0,355	0,028	0,337	7
S0005*	20	10,50	7,555	0,720	0,939	0,933	0,229	0,129	0,236	0,025	0,216	6
S0101*	8	5,20	3,350	0,492	0,719	0,686	0,674	0,490	0,317	0,001	0,317	6
SW24*	14	7,40	5,063	0,684	0,866	0,850	0,424	0,268	0,215	0,038	0,185	3
S0068*	19	10,20	7,407	0,790	0,913	0,903	0,306	0,181	0,136	0,010	0,127	8
SW72*	7	4,00	2,452	0,398	0,598	0,541	0,803	0,648	0,337	0,025	0,321	8
SW455	13	7,90	5,483	0,541	0,895	0,883	0,358	0,217	0,399	0,035	0,377	6
SW911*	8	5,70	4,267	0,722	0,819	0,792	0,537	0,362	0,123	0,037	0,089	1
Média	11	6,18	3,978	0,607	0,766	0,738	0,99998	0,99999	0,214	0,039	0,186	

<sup>1</sup>IC.99%= 0,105-0,314; <sup>2</sup>IC.99%= 0,022-0,063; <sup>3</sup>IC.99%=0,072-0,280; \*FAO/ISAG (2004).

<sup>a</sup> Número total de alelos; <sup>b</sup> Número médio de alelos; <sup>c</sup> Número efetivo de alelos; <sup>d</sup> Heterozigosidade observada; <sup>e</sup> Heterozigosidade esperada; <sup>f</sup> Conteúdo de Informação Polimórfica; <sup>g</sup>PE1 = probabilidade de exclusão 1, <sup>h</sup>PE2 = probabilidade de exclusão 2.

<sup>i</sup> índice de fixação referente à população global; <sup>j</sup> endogamia devido à diferenciação entre sub-populações, em relação à população total; <sup>l</sup> coeficiente de endogamia em relação às suas subpopulações; <sup>m</sup> Número de grupos genéticos que desviaram do EHW(P<0,05).



O número total de alelos por *locus* ( $N_{ta}$ ) variou de 07 para os *loci* SW830 e SW72 a 20 alelos para o *locus* S0005. Dos *loci* recomendados pela FAO, seis (SW830, S0026, S0355, S0178, S0101 e SW72) revelaram poucos alelos de sete a oito por *locus*; Laval et al. (2000) detectaram de sete a nove alelos por *locus* para os cinco desses *loci* (S0026, S0355, S0178, S0101 e SW72) e Behl et al. (2005) também obtiveram poucos alelos com os *loci* S0026, S0355, S0178 e SW72 ( de 6 a 11 alelos). O menor valor médio de alelos ( $N_{ma}$ ) foi de 3,5 para o *locus* S0355, que teve um total de 08 alelos, podendo ser reflexo da diferença nas amostragens entre os grupos genéticos. O *locus* S0005 também apresentou maior número de alelos em trabalhos realizados com populações suínas por Lemus-Flores et al. (2001) e Yang et al. (2003) obtiveram 23 e 31 alelos respectivamente, quantidades superior as apresentadas neste estudo e Fabuel et al. (2004), que identificaram 14 alelos. Em geral, a diversidade genética em cada heterozigosidade, a qual variou largamente entre os *loci*. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,206 (S0355) a 0,970 (S0178), enquanto a heterozigosidade esperada segundo o EHW ( $H_e$ ) variou de 0,598 (SW72) a 0,939 (S0005). O número efetivo de alelos foi de 1,774 (S0355) a 7,55 (S0005).

O Conteúdo de Informações Polimórficas (PIC) oscilou entre 0,541 (SW72) e 0,933 (S0005) com um valor médio de 0,738. Dos 18 *loci* de microssatélites analisados, nove apresentaram alto polimorfismo ( $PIC > 0,7$ ) e apenas dois com PIC inferior 0,6, segundo a classificação Botstein et al. (1980) marcadores com PIC superior 0,5 são considerados muito informativos. Os maiores valores de PIC (0,939 e 0,903) corresponderam aos microssatélites que apresentaram maior número de alelos (S0005 e S0068, respectivamente). Com base nos valores de PIC encontrados e altas probabilidades de exclusão combinada de 0,99998 (PE1) e 0,99999 (PE2), sugere-se que todos os *loci* podem ser utilizados para compor um painel para teste de paternidade em estudos posteriores com

os grupos genéticos deste trabalho, contudo, os *loci* recomendados pela FAO (SW936, S0005, S0068) apresentaram valores de PE1 e PE2 inferiores a 40%.

O  $F_{ST}$  por *locus* variou de zero (S0155) a 0,242 (S0355) e o valor médio foi de 0,039, significando que apenas 3,9% do total da variação genética foi explicada pela diferença entre populações e a maioria da diversidade genética existente (96,1%) correspondeu às diferenças entre os indivíduos dentro das populações. Para o índice  $F_{ST}$  66,7% dos *loci* apresentaram valores fora do intervalo de confiança (IC=99%), com onze *loci* apresentando valores significativos, embora baixos para diagnosticar diferenças entre grupos genéticos. Os valores médios de  $F_{IS}$  e  $F_{IT}$  para todos os *loci* foram de 0,186 e 0,214 com 38,9% e 33% dos valores fora do IC respectivamente.

O  $F_{IT}$  é o índice de fixação que mede a redução média de heterozigotos de um indivíduo referente à população global. Enquanto o  $F_{IS}$  é o coeficiente de consanguinidade dentro das populações que varia de -1 quando todos os indivíduos são heterozigotos e +1 quando não há heterozigotos na população e, neste estudo, representou alto grau de consanguinidade dentro das populações com exceção dos *loci* S0002 (-0,130), SW857 (-0,236) e S0178 (-0,427) que apresentaram  $F_{IS}$  negativo sugerindo excesso de heterozigotos nesses *loci* ou exogamia. Por outro lado, o  $F_{IS}$  positivo (0,186) para todos os *loci* nas populações, o qual representa o déficit de heterozigotos provavelmente reflete a subdivisão da população geral em subpopulações devido à consanguinidade acumulada nas pequenas populações.

O teste do EHW para os *loci* polimórficos mostrou que todos desviaram do EHW ( $P < 0,05$ ) em pelo menos uma população. Os *loci* SW72 (8) e S0068 (8) e OPN (7) apresentaram maior número de populações em desequilíbrio e os *loci* SW911 e S0830 apenas em uma população (SRD e Canastra, respectivamente). Esses são esperados, uma

vez que o EHW é atingido apenas em populações panmíticas (as probabilidades do teste para o EHW encontram-se na Tabela V, ANEXOS).

Callen et al. (1993) afirmaram que se a proporção de genótipos de um *locus* não está em EHW em algumas populações, pode-se suspeitar da ocorrência de uma seleção afetando tal *locus* ou ainda a existência de alelos nulos, que é um problema comum nos estudos com microssatélites explicado pela baixa eficiência da hibridização dos *primers* usados para amplificar um determinado *locus*. Contudo, quando uma população apresenta desvio para um número independente de *loci*, as causas como subdivisões dentro das populações, migração ou fluxo de genes de uma fonte externa, ou ainda, os acasalamentos não aleatórios são mais pronunciados.

Na Tabela 6 encontram-se os resultados das análises para número médio de alelos ( $N_m$ ) e número efetivo de alelos ( $N_e$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), conteúdo de informação polimórfica (PIC), índice de consanguinidade ( $F_{IS}$ ) e número de *loci* que apresentaram desvio para o EHW por população.

A média de alelos foi menor para a raça comercial Duroc que foi de 3,65 alelos, enquanto a população SRD apresentou 8,89 alelos e Canastra 8,61. A média para todos os grupos genéticos foi de 6,20 alelos, sendo que cinco dos grupos genéticos localmente adaptados e raça comercial Landrace apresentaram  $N_m$  acima da média.

As raças Duroc e Large White apesar do pequeno número de indivíduos genotipados ( $n=4$ ) apresentaram poucos alelos (3,61 e 3,72), e ainda nessas duas populações, o *locus* S0355 foi monomórfico, necessitando, portanto, mais estudos com estes mesmos microssatélites tipados em uma maior amostragem. Além disso, as raças comerciais podem estar sendo penalizadas pelo processo de seleção artificial, que causa diminuição da variabilidade genética.

Tabela 6 - Estimativas por grupo genético de índices relacionados à variabilidade genética de 190 suínos comerciais e localmente adaptados avaliados com 18 microssatélites.

Grupos genéticos/raças	N	<sup>a</sup> Nam	<sup>b</sup> Nea	<sup>c</sup> Ho	<sup>d</sup> He	<sup>e</sup> PIC	<sup>g</sup> F <sub>IS</sub>	<sup>h</sup> EHW
Baé	11	5,44	3,904	0,532	0,649	0,619	0,226*	1 (0)
Canastra	29	8,61	4,580	0,549	0,720	0,692	0,230*	16 (11)
Caruncho	07	5,50	4,024	0,625	0,707	0,670	0,153*	6 (0)
Canastrão	09	5,78	4,117	0,634	0,712	0,669	0,119*	3(2)
Moura	18	7,89	4,746	0,666	0,748	0,717	0,116*	8 (4)
Mamelado	07	4,67	3,381	0,576	0,622	0,606	0,156*	4 (0)
Nilo	16	6,22	3,776	0,620	0,679	0,637	0,113*	9 (3)
Piau	17	6,56	4,236	0,615	0,717	0,678	0,184*	11 (7)
SRD	47	8,89	4,539	0,561	0,732	0,700	0,228*	16 (14)
Duroc	04	3,61	3,008	0,569	0,581	0,564	0,250*	3 (0)
Landrace	21	7,56	4,412	0,592	0,718	0,687	0,180*	8 (6)
Large White	04	3,72	3,017	0,681	0,599	0,560	0,056	1 (0)
Média		6,20	3,98	0,60	0,68	0,65	0,167	

\*(P<0,05); <sup>a</sup>Número médio de alelos; <sup>b</sup>Número efetivo de alelos; <sup>c</sup>Heterozigosidade observada; <sup>d</sup>Heterozigosidade esperada; <sup>e</sup>Conteúdo de Informação Polimórfica; <sup>f</sup>Porcentagem de *loci* polimórficos; <sup>g</sup>Coefficiente de consanguinidade dentro de cada população; <sup>h</sup> Número de *loci* que desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg (P<0,05), valores entre parênteses refere-se ao número de *loci* em desequilíbrio após correção de Bonferroni (P<0,003).

O Nea variou de 3,008 (SD) a 4,746 (SM) e em 78% dos grupos genéticos de suínos localmente adaptados a He foi superior a 70% e os 22% restante acima de 60%.

Embora variando em todas as populações, a Ho média foi menor à He em 11 grupos genéticos, indicando que existe desequilíbrio de Hardy-Weinberg nas populações. Apenas na raça Large White a Ho foi superior à esperada, ressaltando que nessa população, composta por quatro indivíduos, dois foram amostrados de um rebanho de Pernambuco, um da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC) e outro de uma fazenda de Brasília (DF) e

também possivelmente o déficit de homozigoto nessa população deve-se aos planos dirigidos de seleção. A raça Duroc apresentou menor valor de  $H_e$  (0,581) devido ao fato do baixo número médio de alelos, por outro lado o grupo dos animais caracterizados morfologicamente como Moura apresentou maior valor para este índice (0,748).

Diversos fatores podem contribuir para a menor heterozigosidade observada em relação à esperada nas populações em estudo como consanguinidade, subdivisão da população, presença de alelos nulos ou ainda seleção a favor de homozigotos que conduz a perda de heterozigotos (MAUDET et al., 2002).

O PIC foi maior no grupo genético Moura (0,717) e menor nas raças Large White (0,560) e Duroc (0,564), a qual teve o menor valor para  $H_e$ . Nas figuras 7 e 8 encontram-se os valores médios para as populações comerciais, locais e média geral para os 12 grupos genéticos dos parâmetros número médio ( $N_e$ ) e efetivo de alelos ( $N_m$ ), conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ) e índice de consanguinidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ). Os suínos locais apresentaram maiores valores médios para os parâmetros de diversidade genética intrapopulacional como  $N_e$ ,  $N_m$ , PIC e  $H_e$  aos obtidos para as raças comerciais e ainda foram superiores às medias dos 12 grupos genéticos.

Tal observação demonstra a alta diversidade das populações localmente adaptadas em relação às comerciais. Provavelmente, esta maior diversidade é devido ao fato dos grupos genéticos localmente adaptados não estarem sujeitas a constantes programas de melhoramento para determinadas características como os rebanhos comerciais. Esta maior diversidade dos grupos localmente adaptados resulta em um pool gênico que as tornam capazes de sobreviver às adversidades do meio em que vivem. Contudo, a  $H_o$  foi inferior para os grupos genéticos locais o que sugere maior déficit de heterozigotos nesses grupos devido ao reduzido número de reprodutores e falta de manejo reprodutivo que elevam o

grau de consanguinidade como observados pelo maior valor médio para o coeficiente de consanguinidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ).

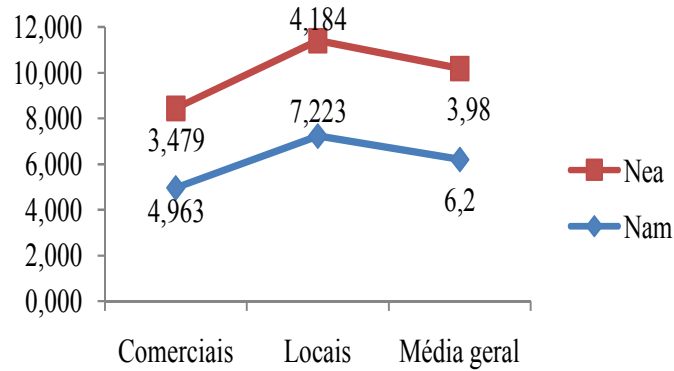


Figura 7 – Variações dos parâmetros número médio (Nam) e efetivo (Nea) de alelos nas populações comerciais, locais e nos 12 grupos genéticos representados pela média geral.

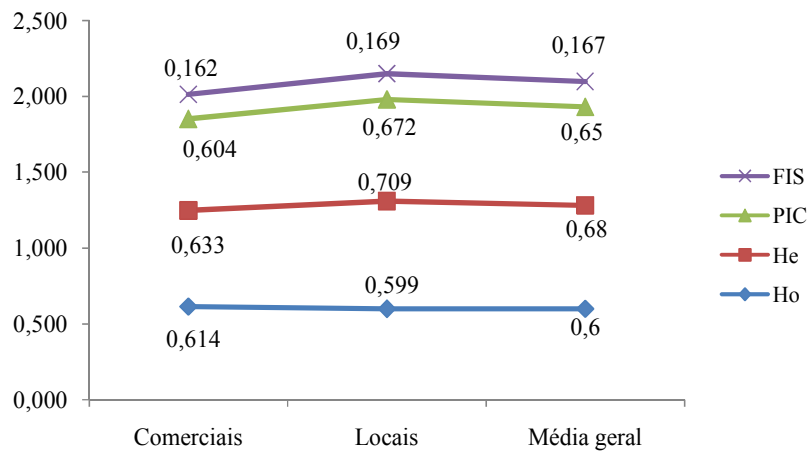


Figura 8 – Variações dos parâmetros conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigotidade esperada (He) e observada (Ho) nas raças grupos genéticos comerciais, locais e nos 12 grupos genéticos representados pela média geral.

A variabilidade dentro dos grupos genéticos estimados pelo coeficiente de consanguinidade ( $F_{IS}$ ) mostrou que o maior valor foi para raça Duroc (0,250;  $P < 0,05$ ), e o menor para raça Large White (0,056) sem efeito significativo ( $P > 0,05$ ). Três grupos genéticos de suínos localmente adaptados (Canastra, SRD e Baé) tiveram elevados valores de  $F_{IS}$  ( $P < 0,05$ ).

Nos grupos genéticos locais, como não há planos de seleção dirigidos, pode-se inferir que os valores de  $F_{IS}$  positivos sejam reflexos do efeito da consanguinidade, que pode contribuir para o déficit de heterozigotos observados devido aos acasalamentos entre indivíduos parentes que ocorrem nas pequenas populações dos criatórios de suínos em Pernambuco. A raça Landrace apresentou alto grau de consanguinidade ( $F_{IS}=0,180$ ) e foi significativo ( $P < 0,05$ ), e já era esperado essa consanguinidade uma vez que muitos dos indivíduos apresentavam grau de parentesco. A raça localmente adaptada Piau apresentou alto valor de  $F_{IS} = 0,184$  ( $P < 0,05$ ). Para o grupo genético SRD composto de 47 suínos o  $F_{IS}$  foi ainda maior, igual a 0,228 ( $P < 0,05$ ). Os valores positivos e significativos para  $F_{IS}$  em 11 grupos genéticos também demonstraram que os mesmos encontram em desequilíbrio de Hardy-Wienberg.

Contrariamente ao obtido neste trabalho, Sollero et al. (2008) encontram  $F_{IS}$  negativos (-0,054 e -0,055) quando avaliaram suínos Landraces provenientes de duas diferentes regiões do Brasil (Sul e Centro-Oeste) e Mouras (região Sul), respectivamente. Entretanto, obtiveram  $F_{IS}$  para raça Piau de 0,126 ao avaliar uma população composta de 31 suínos das regiões Nordeste (1), Sudeste (15) e Centro-Oeste (15). Valores de  $F_{IS}$  acima de 0,10 para as raças comerciais Landrace, Large White e Duroc estudadas em outros países foram obtidos por Lemus-Flores et al. (2001) e Kim et al. (2005).

O grupo SRD apresentou 16 *loci* desviando do EHW ( $P < 0,05$ ), enquanto que a raça Large White apenas um *locus* não aderiu ao EHW ( $P < 0,05$ ). Isso mostra grande diferença

na quantidade de *loci* que não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg entre as populações analisadas, principalmente nos grupos localmente adaptados que apresentaram maior amplitude de 3 (Canastrão) a 16 (SRD), nas raças comerciais a variação foi de 1 (Large White) a 11 (Landrace) *loci* em desequilíbrio. Após a correção de Bonferroni, o maior número de *loci* em desequilíbrio continuou sendo para os grupos genéticos SRD e Canastra (14 e 11 respectivamente), e em cinco grupos todos os *loci* aderiram ao EHW (Baé, Caruncho, Duroc, Large White e Mamelado).

Nos grupos analisados, a alta quantidade de *loci* desviados provavelmente deve-se ao fato de que os suínos eram criados por pequenos produtores no Estado de Pernambuco que, na maioria das vezes, realizavam os acasalamentos entre indivíduos aparentados, principalmente por terem um rebanho reduzido e também pelo hábito da troca de reprodutores entre propriedades vizinhas. O excesso de homozigotos nos grupos genéticos analisados deve ser proveniente do Efeito Walhund que é o resultado da presença de subpopulações nas amostras representadas em cada grupo como reportado por Lemus-Flores et al. (2001) para populações suínas mexicanas, que pode ser uma das justificativas para os 11 grupos genéticos estarem em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, assim como o número reduzido da amostra (CANUL et al., 2005).

Apesar do controle nas coletas de material biológico evitando-se indivíduos relacionados, as informações sobre a genealogia dos animais foram fornecidas pelos produtores, que em sua maioria não faziam controle zootécnico, e ainda compravam os animais de feiras livres, o que pode aumentar o fluxo de genes de outras populações.

A distância de Nei (1972) e Reynolds (1983) encontram-se na Tabela 6, representando a variação genética entre as populações. A partir dos valores da distância de Nei, evidenciou-se que a população localmente adaptada Canastra foi a mais próxima da raça comercial Landrace (0,094), por outro lado, a população Mamelado foi mais distante



geneticamente da raça Duroc (0,794). Possivelmente, devido ao isolamento geográfico, efeitos de deriva e amostragem, a raça Duroc foi a que apresentou maiores distâncias em relação as demais populações localmente adaptadas, mostrando resultados condizentes aos encontrados por Martinez et al. (2000), que utilizaram o mesmo método de distância e evidenciaram que há diferenciação genética entre suínos da raça Duroc e as raças suínas Ibéricas. Resultados semelhantes também foram obtidos pela distância de Reynolds, demonstrando que das raças comerciais, a população comercial Landrace apresentou alta relação com as populações locais.

Tabela 6 – Matriz de distância genética padrão de Nei (1972) (abaixo da diagonal) e distancia de Reynolds (1983) (acima da diagonal) entre cada par dos 12 grupos genéticos de suínos.

	SB	SC	SCAR	SCT	SDC	SLA	SLW	SM	SMM	SN	SP	SRD
SB	-	0,031	0,047	0,042	0,073	0,022	0,057	0,0425	0,089	0,101	0,061	0,067
SC	0,183	-	0,015	0,025	0,028	0,011	0,032	0,023	0,078	0,061	0,055	0,053
SCAR	0,308	0,182	-	0,008	0,043	0,022	0,025	0,022	0,070	0,075	0,060	0,058
SCT	0,257	0,182	0,219	-	0,047	0,011	0,036	0,016	0,082	0,072	0,061	0,074
SDC	0,444	0,292	0,452	0,426	-	0,036	0,072	0,048	0,130	0,133	0,084	0,098
SLA	0,158	0,094	0,214	0,145	0,326	-	0,043	0,011	0,073	0,073	0,050	0,065
SLW	0,336	0,259	0,336	0,326	0,523	0,295	-	0,043	0,073	0,097	0,067	0,062
SM	0,235	0,144	0,242	0,181	0,429	0,114	0,350	-	0,044	0,038	0,014	0,032
SMM	0,387	0,338	0,418	0,418	0,794	0,334	0,485	0,262	-	0,057	0,037	0,034
SN	0,386	0,252	0,367	0,324	0,754	0,312	0,539	0,199	0,273	-	0,018	0,037
SP	0,294	0,240	0,352	0,322	0,617	0,235	0,484	0,130	0,229	0,128	-	0,020
SRD	0,302	0,208	0,319	0,342	0,627	0,254	0,424	0,169	0,198	0,160	0,119	-

SB (Baé), SC (Canastra), SCAR (Caruncho), SCT (Canastrão), SDC (Duroc), SLA (Landrace), SLW (Large White), SM (Moura), SMM (Mamelado), SN (Nilo), SP (Piau) SRD (sem raça definida).

A partir da matriz de distância genética padrão de Nei (1972) se construiu uma árvore de distância pelo método UPGMA, na qual os números nas bifurcações do dendograma representam os valores de *bootstrapping* (Figura 9), demonstrou a formação de quatro grupos fortes, o primeiro com 51% de confiança agrupou a raça comercial

Landrace com os grupos genéticos locais Canastra, Moura, Canastrão, Baé e Caruncho, e o segundo, também com 51% de confiança pelas populações Piau, SRD, Nilo e Mamelado. Apesar de estar agrupada neste segundo cluster, a população Mamelado demonstrou-se mais distante das demais.

Houve maior proximidade da raça comercial Landrace com o grupo localmente adaptado Canastra apresentando alto valor de *bootstrapping* (77%). As raças Large White e Duroc foram mais distantes geneticamente dos demais grupos genéticos com valores de *bootstrapping* de 73% e 100%, respectivamente, e formaram os outros dois grupos (Figura 9).

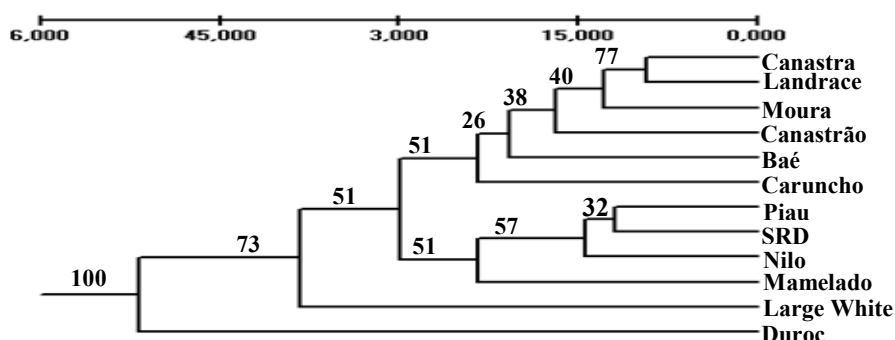


Figura 9 – Árvore de distância genética agrupada pelo método UPGMA baseada nos valores da distância de Nei (1972), demonstrando as relações genéticas entre os 12 grupos genéticos investigados.

Na análise de componentes principais (CPA) foram apresentados dois componentes responsáveis pela maior variação observada entre os grupos genéticos. O primeiro foi responsável por 41% do total da variação observada, enquanto o segundo explicou 16,7% (Figura 10A). Um terceiro componente com um percentual de 14,4% (Figura 10B, componente 1 vs componente 3 e Figura 10 C, componente 2 vs componente 3) também contribuiu para a variação total observada com o grupo genético Mamelado

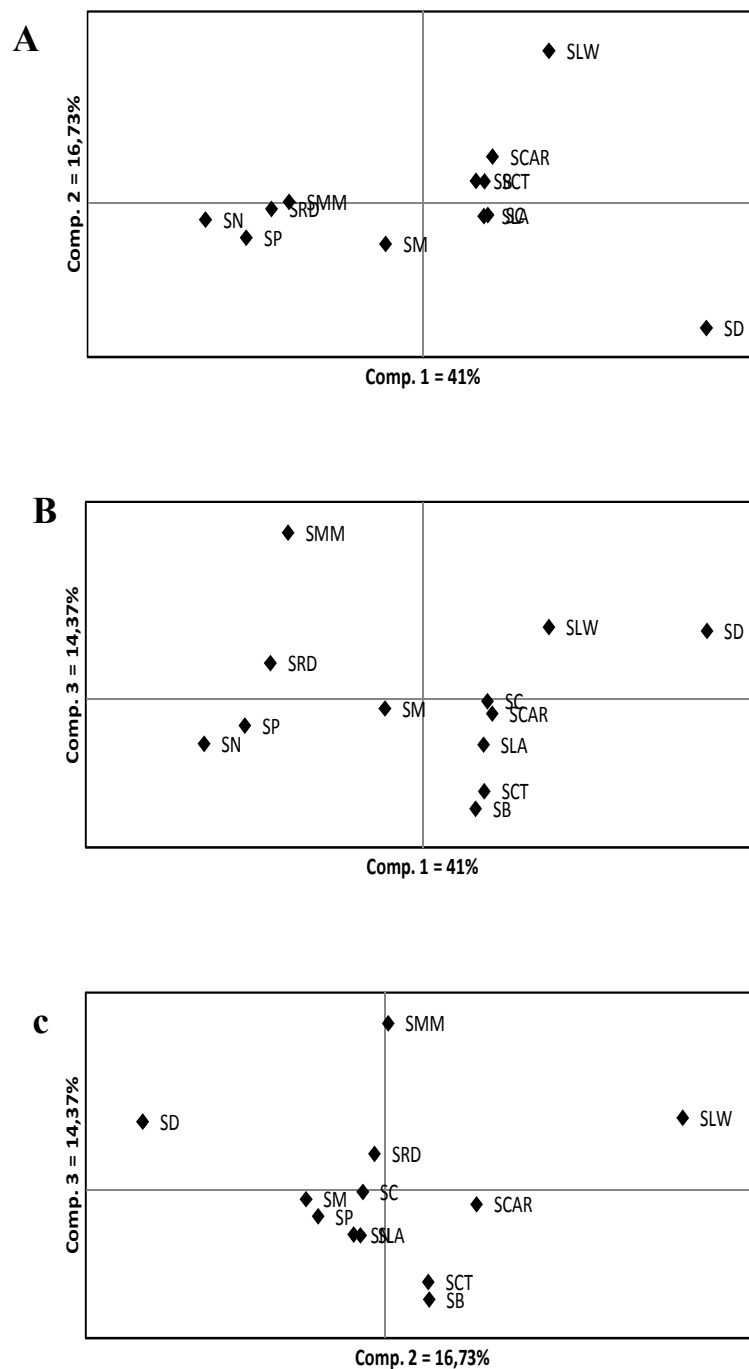


Figura 10 – Representação da análise de componentes principais dos 12 grupos genéticos obtidos a partir da distância genética padrão de Nei (1972).

SB (Baé), SC (Canastra), SCT (Canastrão), SCAR (Caruncho), SDC (Duroc), SLA (Landrace), SLW (Large White), SM (Moura), SMM (Mamelado), SN (Nilo), SP (Piau) SRD (sem raça definida).

(SMM) contribuindo mais para essa variação. Os três componentes resultaram em um percentual cumulativo de 72,2%. Fan et al. (2002) demonstraram valores inferiores (41%) ao deste trabalho pelos dois primeiros componentes quando avaliaram as raças suínas chinesas; Sollero et al. (2008) encontram 74% do total da variação observada em suínos localmente adaptados no Brasil explicada pelos dois primeiros componentes e foi superior ao deste estudo, que foi de 57,7% para os dois primeiros componentes (Figura 10A).

Os resultados obtidos dessa análise evidenciaram também um claro agrupamento das populações Caruncho (SCAR), Baé (SB) e Canastrão (SCT) e Canastra (SC) com a raça comercial Landrace (SLA), que apresentaram alta similaridade genética, principalmente entre a raça comercial Landrace e Canastra, e entre as populações locais Canastrão e Baé mostrando-se pela representação gráfica indistinguíveis. As raças Duroc (SD) e Large White (SLW) novamente foram as mais dissimilares, corroborando com os resultados representados pelo método UPGMA. A influência da raça Landrace, provavelmente, deve-se à sua predominância na região. Outro agrupamento foi constituído pelas populações locais (SN, SP, SRD e SMM) com a população Moura mostrando-se mais independente e mais similar com as populações Landrace e Canastra, e as populações SRD e Mamelado o agrupamento foi similar e pode ser justificado pela forte semelhança nas características morfológicas entre ambas, a presença de mameas (apêndices inseridos na base do pescoço) foi o principal critério para formação do grupo de suínos Mamelados.

A separação dos grupos genéticos no gráfico sugere que existe certa particularidade genética entre as populações que as tornam distintas.

#### 4.5.4. Teste de alocação para as amostras de suínos SRD

Apesar de não ter sido possível separar os grupos genéticos locais dos comerciais, os SRD tiveram maior parte dos seus genótipos clusterizados em uma das populações obtidas com a estatística DeltaK.

Posteriormente à obtenção do melhor K, foi realizada a alocação dos 47 indivíduos SRD pelos valores de probabilidades de correlação em três classes de valores de probabilidade de certificação racial obtidos com o programa Structure:  $> 0,8$ ;  $0,79 - 0,6$  e  $0,59-0,5$ . Em geral, 87,23% (n=41) dos indivíduos foram incluídos na classe de probabilidade acima de 0,8 com média de  $0,954 \pm 0,032$ . Os 10,64% (n=5) dos indivíduos pertenceram a classe de  $0,79-0,6$  com média de  $0,724 \pm 0,046$  e 2,13% dos indivíduos da classe de  $0,59-0,5$  ( $0,508 \pm 0,00$ ), que representou apenas um animal (Figura 11).

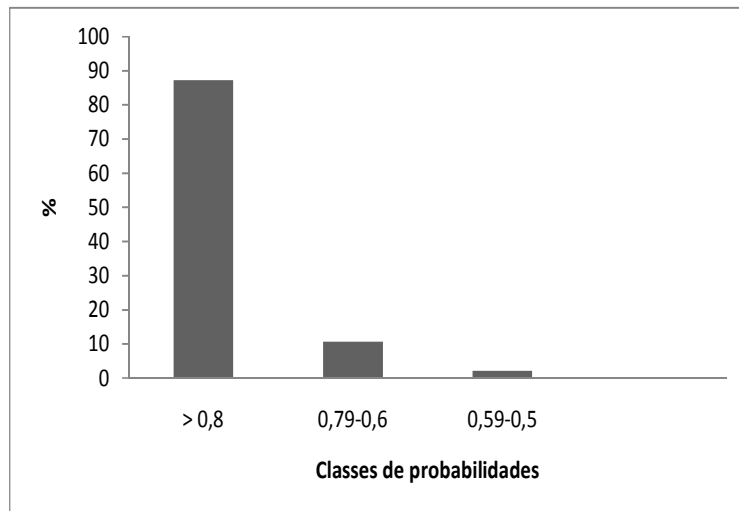


Figura 11- Distribuição dos suínos do grupo genético SRD em cada classe de probabilidade de alocação.

Observa-se com esta distribuição que a maior parte dos suínos do grupo SRD das classes de probabilidades de certificação >0,8 (85,37%) e de 0,79-0,6 com 60% dos indivíduos foram agrupadas na população 2 (*cluster*) e o único indivíduo da classe de 0,59-0,50 teve maior contribuição do *cluster* 1, que pode ser explicado pelo fato deste animal ser caracteristicamente muito miscigenado proveniente do município Parnamirim da região Sertão Central (Figura 12).

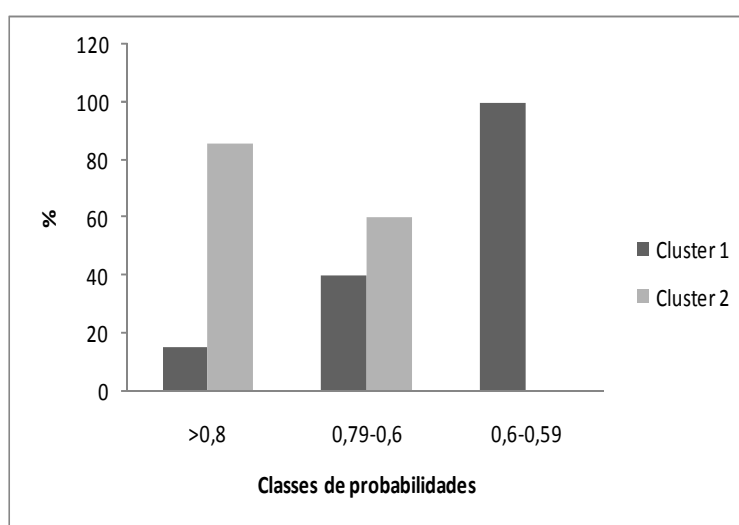


Figura 12- Distribuição dos suínos do grupo genético SRD em cada classe de probabilidade de alocação nos dois clusters inferidos pela estatística DeltaK (K=2).

A maioria dos suínos SRD procedentes das regiões Zona da Mata (90,9%), Agreste (75%) e Sertão (62,50%) agruparam-se no cluster 2, sugerindo que independente da região existe compartilhamento de alelos entre os indivíduos dessa população, assim como entre os indivíduos (SRD) da população um (Tabela 8). Fizeram parte do cluster 1 nove indivíduos SRD da região Sertão, dos municípios Araripina (n=3), Parnamirim (n=3),

Salgueiro (n=1) e Granito (n=2), um da Zona da Mata do município Paudalho e três da região Agreste dos municípios Bezerros, Pedra e Belo Jardim.

Tabela 8- Distribuição dos suínos SRD de cada região fisiográfica do Estado de Pernambuco em cada. A quantidade de indivíduos por região corresponde a N.

Regiões	N	Cluster 1 (%)	Cluster 2 (%)
Zona da Mata	11	9,1	90,9
Agreste	12	25,0	75,0
Sertão	24	37,50	62,50

Na Tabela 9 encontram-se as proporções dos indivíduos de cada grupo genético estudado em cada cluster (K=2), podendo ser observado que a população 1 apresentou maior probabilidade de certificação para o ecótipo Canastrão (0,940) e a população 2 para o SRD (0,718), demonstrando maior identidade genética das mesmas. O cluster 1 também apresentou altas probabilidades de certificação para as raças comerciais Landrace (0,832), Duroc (0,761) e Large White (0,677), bem como para outros grupos genéticos locais (Baé, Moura e Piau) e contribuiu praticamente para todos os grupos em estudo.

Apesar das raças exóticas (Duroc, Landrace e Large White) mostrarem maior proporção de alelos clusterizados na população 1, uma pequena parte apresentou alelos da população 2, o que pode sugerir compartilhamento com alelos de suínos localmente adaptados. Os grupos genéticos Nilo, Canastra e Caruncho foram as que apresentaram menores probabilidades de certificação, com os clusters 1 e 2.

Das quatro amostras da raça Large White, duas provenientes do município de Goiana, da região Zona da Mata, mostram-se influenciados por alelos dos grupos locais. O mesmo observou-se para quatro amostras da raça Landrace do município de Abreu e Lima

da região Metropolitana do Recife e uma de Duroc da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia - SC.

Os valores do índice de diferenciação ( $F_{ST}$ ) para cada população (K) inferida foi de 0,066 para a população 2, demonstrando maior diferenciação genética das sua subpopulações quando comparada com o  $F_{ST}$  das subpopulações da população 1 (0,022) (Tabela 9).

Tabela 9 – Proporção de indivíduos de cada um dos 12 grupos genéticos estudados em relação a cada cluster determinada pela estatística DeltaK.

Grupos genéticos	N	<i>Cluster 1</i>	<i>Cluster 2</i>
Baé	11	0,781	0,219
Canastra	29	0,561	0,439
Caruncho	07	0,593	0,407
Canastrão	09	0,940	0,060
Moura	18	0,792	0,208
Mamelado	07	0,378	0,622
Nilo	16	0,504	0,496
Piau	17	0,674	0,326
SRD	47	0,282	0,718
Duroc	04	0,761	0,239
Landrace	21	0,832	0,168
Large White	04	0,677	0,323
$F_{ST}$ para K		0,022	0,060