



FC

Biblioteca
Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

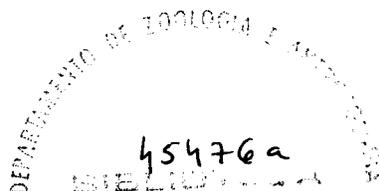


F. 4/166a

Íris Pinheiro

Caracterização genética do javali na Península Ibérica e das raças suínas portuguesas, Bísara e Alentejana

Variabilidade genética ao nível do DNA mitocondrial e dos genes da cor da pelagem *MC1R* e *KIT*



Dissertação de Mestrado em Biodiversidade e Recursos Genéticos apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.

A large, stylized handwritten signature in black ink, which appears to read "Íris Pinheiro".

Faculdade de Ciências
Universidade do Porto
2005

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com a ajuda de várias pessoas, às quais gostaria de expressar o meu reconhecimento.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Célio Alves, por todo o apoio e disponibilidade demonstrados. O seu incentivo foi fundamental no decorrer deste trabalho.

À Raquel Godinho, devo um agradecimento especial por crer que sem o seu apoio, aconselhamento e revisão constantes, não teria sido possível executar e terminar esta tese. As suas sugestões e críticas foram fundamentais durante todo o trabalho realizado no laboratório e durante as várias fases de escrita da tese.

Ao Professor Doutor Nuno Ferrand de Almeida, pela oportunidade concedida e pela confiança demonstrada.

Às minhas amigas e colegas Sara Rocha e Catarina Carmo, pelas inúmeras sugestões e críticas. À Catarina Carmo dedico um especial agradecimento pela imensa ajuda prestada no laboratório e pela disponibilidade dispensada durante vários momentos decisivos deste trabalho. Da mesma forma, agradeço ao Zef toda a disponibilidade que prestou com a interpretação dos resultados e a revisão de alguns manuscritos, bem como todo o apoio prestado nos momentos mais difíceis dos últimos dezassete meses.

Ao Doutor Christian Gortázar, por me ter acolhido no *Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos* da Universidade de Castilla-La Mancha de Espanha, durante a fase inicial do trabalho laboratorial.

Aos meus colegas do CIBIO, agradeço o apoio prestado ao longo dos últimos meses. Quero ainda agradecer em particular às minhas colegas Ângela Ribeiro, Rita Oliveira e Teresa Silva, pela amizade e paciência que demonstraram desde que chegaram ao CTM.

Agradeço ainda a várias pessoas e instituições que colheram e cederam amostras de javali e de porcos domésticos, nomeadamente: António Pedro Santos da Universidade de Évora, pelas amostras de javali colhidas no sul de Portugal; Christian Gortázar pelas amostras Espanholas; Klaus Hackländer da Universidade de Medicina Veterinária de Viena e *Office National de la Chasse*, em França, pelas amostras Austríacas e Francesas, respectivamente; Engenheiro João Santos Silva, da Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho pelas amostras de porco Bísaro; Associação Nacional dos Criadores de Porco de Raça Alentejana e Estação Zootécnica Nacional pelas amostras de raça Alentejana.

Aos meus amigos e família, em especial aos meus pais, pelo incentivo e compreensão. Sem eles não teria sido possível concretizar esta tese.

Índice

RESUMO

SUMMARY

1. Introdução Geral	1
1.1 O javali Eurasiático – <i>Sus scrofa</i>	1
1.2 A domesticação	6
1.2.1 As raças domésticas portuguesas	7
1.3 A utilização do DNA mitocondrial em suínos	10
1.4 A utilização dos genes da cor da pelagem em suínos	12
1.5 Objectivos e organização da tese	14
1.5.1 Objectivos	14
1.5.2 Organização da tese	15
2. Caracterização genética – DNA mitocondrial	17
2.1 Artigo 1: Mitochondrial DNA diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (<i>Sus scrofa</i>) in the Iberian Peninsula (<i>in prep.</i>).	18
Íris Pinheiro, Raquel Godinho, Christian Gortázar, e Paulo Célio Alves	
3. Genes da cor da pelagem	41
3.1 Artigo 2: Diversidade genética do <i>MC1R</i> nas raças suínas portuguesas e no javali Ibérico (<i>in prep.</i>).	42
Íris Pinheiro e Raquel Godinho	

3.2 Artigo 3: The Portuguese Bísaro pig with belt-like phenotype has not the Belt allele at the <i>Dominant White (I/KIT)</i> locus (<i>in prep.</i>).	57
Íris Pinheiro e Raquel Godinho	
4. Discussão Geral	67
4.1 O javali na Península Ibérica	67
4.2 As raças domésticas portuguesas	70
4.3 Os híbridos	73
5. Referências bibliográficas	75
ANEXOS	

Resumo

O javali (*Sus scrofa*) é uma espécie com uma alargada área de distribuição por toda a Eurásia e possui, na Europa, um papel importante não só do ponto de vista económico, uma vez que se trata de uma espécie cinegética, como também do ponto de vista ecológico. Desta forma, está sujeita a determinadas práticas mediadas pelo homem, como reintroduções e translocações, que põem em causa a integridade genética das suas populações naturais. O cruzamento com porcos domésticos, frequentemente realizado de forma deliberada pelos criadores, constitui também uma ameaça ao património genético selvagem, bem como uma adulteração das características genéticas das próprias raças domésticas. As consequências destas práticas, aliadas à dificuldade na classificação taxonómica desta espécie, levantam uma série de problemas. Por um lado, é importante identificar quais as populações selvagens que devem ser conservadas e, por outro, a preservação das raças autóctones deve constituir uma prioridade. Na Península Ibérica são raros os trabalhos acerca da diversidade genética do javali, designadamente em Portugal, onde também escasseiam os estudos sobre a variabilidade genética das suas raças suínas locais, Bísara e Alentejana.

Assim, o presente trabalho teve como principais objectivos: a) analisar a variabilidade genética do javali Ibérico e das raças suínas portuguesas ao nível da região de controlo do DNA mitocondrial, b) determinar, com base no mesmo marcador, a sua relação filogenética com suínos selvagens e domésticos da Europa Central e da Ásia, c) avaliar a diversidade genética ao nível dos genes da cor da pelagem *MC1R* e *KIT*, d) perceber se há evidências de hibridação entre as formas selvagens e domésticas.

A análise da região de controlo do DNA mitocondrial permitiu confirmar a existência dos três grandes grupos de javalis na Eurásia e ainda, comprovar que os

javalis Ibéricos estão filogeneticamente relacionados com os javalis da Europa Central, não havendo portanto, qualquer evidência de que a Península Ibérica tenha servido de refúgio para estes animais durante as glaciações do Quaternário. A proximidade filogenética observada entre as raças domésticas portuguesas e Europeias é concordante com uma origem materna comum, sendo estas raças provavelmente provenientes de um único evento de domesticação. Os níveis de diversidade haplotípica encontrados nas populações selvagens e nas raças domésticas são elevados, existindo também uma diferença genética significativa entre populações e entre raças. No presente estudo não se detectou qualquer evidência de introgressão de DNA mitocondrial Asiático.

A diversidade encontrada nas raças domésticas ao nível do gene *MC1R* foi relativamente elevada, o que está de acordo com os inúmeros cruzamentos que foram efectuados entre as raças portuguesas e importadas. Este facto é mais evidente na raça Bísara pois, a par desta variabilidade genética está também uma imensa variedade fenotípica no que respeita à pigmentação. Os animais desta raça podem ser inteiramente brancos, malhados, ou apresentar pelagem preta com uma cinta branca que atravessa os ombros e os membros dianteiros, um fenótipo muito semelhante ao da raça Hampshire. Apesar desta semelhança, o porco Bísaro não partilha com esta raça o alelo do gene *KIT* responsável por este fenótipo, levantando a hipótese de esta ser uma característica geneticamente heterogénea. Já o alelo *Dominant White*, deste mesmo gene, foi encontrado na raça Bísara com uma frequência de 0,12, um facto concordante com a observação de animais inteiramente brancos. Encontraram-se nesta raça evidências de introgressão de DNA nuclear de origem asiática.

Na raça Alentejana, apesar de se terem identificado vários alelos ao nível do gene *MC1R*, a forte selecção a que tem sido sujeita, no sentido de conservar a sua coloração característica, não se traduz numa diversidade fenotípica. De uma forma geral, talvez devido ao facto de não ter sido submetida a cruzamentos tão intensos com raças importadas, o porco Alentejano apresenta níveis de variabilidade genética inferiores aos detectados no Bísaro.

As evidências da ocorrência de hibridação entre javalis e porcos domésticos foram escassas. Isto porque, por um lado, o cruzamento entre fêmeas selvagens e machos domésticos é improvável e, por outro, o número de indivíduos utilizado no estudo dos genes nucleares foi reduzido. Não se pode rejeitar contudo, a hipótese de os animais selvagens onde se identificaram os haplótipos mitocondriais partilhados com as raças domésticas se tratarem de porcos ferais, um problema relativamente vulgar numa série de países Europeus.

Summary

The wild boar (*Sus scrofa*) is a species with an extensive distribution area throughout Eurasia and has, in Europe, an important role, not only in an economical point of view, as a game species, as also in an ecological point of view. In this way, it's often submitted to man mediated practices, like reintroductions and translocations, which can have a negative effect on the genetic integrity of their natural populations. Crossbreeding with domestic pigs, frequently done in a deliberated way by farmers, is also a threat to wild genetic patrimony, as well as an adulteration of the genetic characteristics of domestic breeds themselves. The consequences of such practices, allied to the difficulty in this species taxonomy, give raise to a number of problems. In one hand, it's important to identify which wild populations must be conserved and, on the other hand, the preservation of autochthonous breeds must be a priority. In Iberian Peninsula, studies about the genetic diversity of wild boars are few, particularly in Portugal, were also there's a lack of studies about the genetic variability of its local pig breeds, Bísaro and Alentejano.

Therefore, the present study has as main objectives: a) analyse the genetic variability of mitochondrial DNA (mtDNA) control region in Iberian wild boar and in Portuguese pig breeds, b) establish, based on the same marker, their phylogenetic relationships with wild and domestic pigs from Central Europe and Asia, c) evaluate the genetic diversity in coat color genes *MC1R* and *KIT*, d) realize if there are any evidences of hybridization between wild and domestic forms.

Mitochondrial DNA analysis confirmed the existence of the three groups of Eurasian wild boars and, that Iberian wild boars are phylogenetic related to wild boars from Central Europe, hence providing evidence of no refugia in Iberia during Quaternary glaciations. The close phylogenetic relationship observed

between Portuguese and European pig breeds is in accordance with a common maternal origin, being these breeds probably descendent from a single domestication event. High levels of haplotype diversity were found in both wild and domestic pigs, as were also detected significant genetic differences between wild populations and between breeds. No evidences of Asian mtDNA introgression were identified in our survey.

The diversity found at *MC1R* gene in domestic breeds was reasonably high, which is in agreement with the numerous crosses that were done between Portuguese breeds and imported ones. This fact is more obvious in Bísaro breed, since this genetic variability is associated with an immense coat color variety. Bísaro pigs can be entirely white, spotted, or can show a white belt across shoulders and front legs against a black coat color, in a very similar phenotype as seen in Hampshire pigs. Despite this similarity, Bísaro pigs do not share with this breed the *KIT* allele responsible for this phenotype, suggesting that this can be a heterogeneous genetic characteristic. The *Dominant White* allele, of this same gene, was detected in Bísaro breed with a frequency of 0.12, which is in conformity with the observation of white pigs. Evidences of nuclear DNA with Asiatic origin were found in this breed.

In Alentejano breed, despite the high variability found in *MC1R* gene, the strong selection for its characteristic coat color, does not correspond to a phenotypic diversity. In general, perhaps because it wasn't so intensively crossed with foreign breeds, Alentejano pigs show lower levels of genetic variability when compared with Bísaro.

Evidences of hybridization between wild boars and domestic pigs are scarce. This can be justified, in one hand, because crossbreeding between wild females and domestic males is improbable and, on the other hand, the number of individuals used in the study about nuclear genes is low. However, one cannot reject the hypothesis that wild animals that share mtDNA haplotypes with domestic breeds are feral, a common problem in a number of European countries.

1. Introdução Geral

A ordem ARTIODACTYLA, à qual pertencem o porco e o javali, surgiu há 55 milhões de anos e constitui aquele que é hoje o mais bem sucedido grupo de grandes herbívoros, nativo de todos os continentes, com excepção da Antártida e da Austrália. Da ordem ARTIODACTYLA fazem parte três subordens, pertencendo os suínos à subordem dos SUIFORMES (artiodáctilos arcaicos ou primitivos), que inclui hipopótamos, pecaris e porcos (Figura 1.1). Os suínos pertencem ainda à família SUIDAE, à subfamília SUINAE ("porcos verdadeiros") e ao género *Sus*. A família dos Suídeos é um grupo de artiodáctilos pouco especializados do Velho Mundo, que se caracteriza por possuir focinhos alongados, olfacto bastante apurado e caninos modificados em grandes presas ou colmilhos. A subfamília SUINAE contém, para além do género *Sus*, outros dois géneros: *Hylochoerus* e *Potamochoerus*, ambos do continente Africano. Na Figura 1.1 apresenta-se um esquema de classificação dos SUIFORMES baseado numa revisão taxionómica proposta por Oliver (1995).

1.1 O javali Eurasiático – *Sus scrofa*

O javali, ou Porco Selvagem Eurasiático, pertence à espécie *Sus scrofa* e encontra-se amplamente distribuído pela Eurásia e Norte de África (Figura 1.2). Foi ainda introduzido em diversos países como a Argentina, Estados Unidos da América, Austrália e África do Sul por constituir um valioso recurso cinegético e por conseguinte, económico.

O número de subespécies de javali não é consensual entre diferentes autores, podendo variar entre 4 e 25. Oliver (1995) considera que existem pelo menos 17 subespécies de javali (Figura 1.1), um número não muito diferente

daquele que é proposto numa revisão mais recente do género *Sus* onde se atesta para a existência de 16 subespécies (Ruvinsky e Rothschild, 1998).

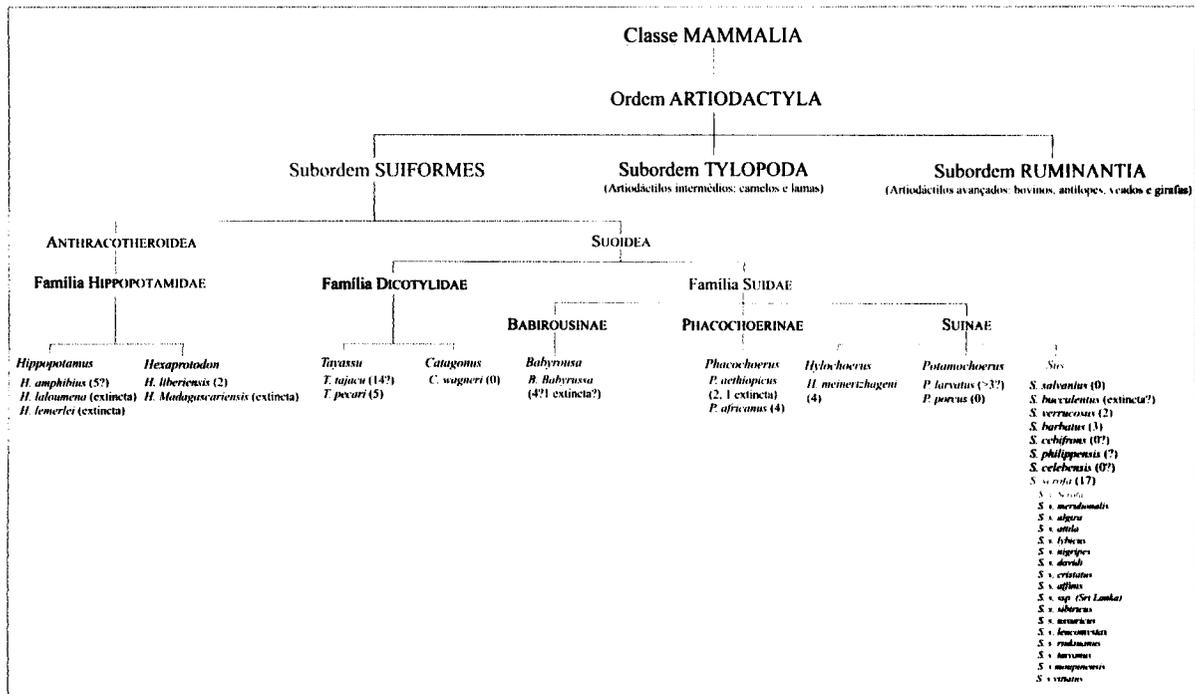


Figura 1.1 Taxionomia da subordem dos SUIFORMES baseado na revisão proposta por Oliver (1995). Entre parêntesis indica-se o número de subespécies provável segundo o mesmo autor.

Nenhuma das duas propostas citadas faz referência às duas subespécies que, de acordo com alguns autores, existiriam na Península Ibérica: *S. s. castilianus* e *S. s. baeticus* (Miller, 1912; Almaça, 1971; Serôdio, 1985). Recentemente, num estudo baseado em dados craniométricos, Genov (1999) propõe a existência de apenas 4 subespécies: *S. s. scrofa*, distribuída por toda a Europa, Norte de África e Oeste da Ásia; *S. s. ussuricus*, presente no Norte da Ásia e Japão; *S. s. cristatus*, na Ásia Menor e na Índia e *S. s. vittatus* na Indonésia. Estudos realizados com base em marcadores genéticos suportam a existência de apenas uma subespécie na Europa, onde a Itália constitui a única excepção. Segundo Randi (1995), existe em Itália pelo menos mais uma subespécie: *S. s. meridionalis*. De acordo com Toro e colaboradores (2000) esta subespécie está na origem das raças suínas domésticas tipicamente mediterrânicas que existem actualmente também na Península Ibérica.

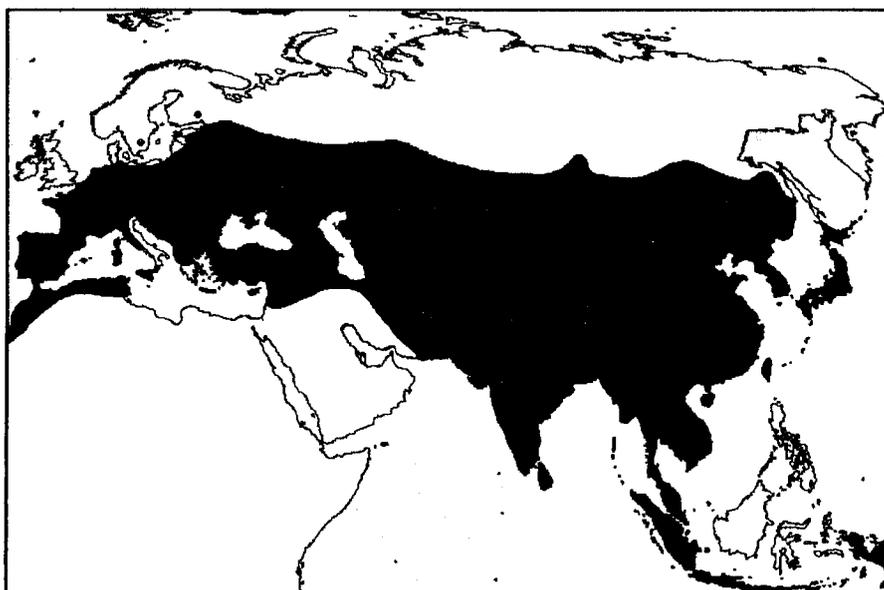


Figura 1.2 Mapa da distribuição do javali Eurasiático, *Sus scrofa*.

De uma forma geral, os estudos baseados em dados morfométricos tendem a elevar o número de subespécies e, a enorme plasticidade fenotípica desta espécie sugere que é necessário ter algum cuidado na sua classificação intraespecífica (Randi, 1995). Este facto salienta a importância dos estudos genéticos na resolução destes problemas taxionómicos, de forma a tornar eficazes os esforços de conservação.

O javali é um animal com uma grande plasticidade ambiental, podendo adaptar-se e sobreviver nos mais variados habitats, desde as geladas paisagens siberianas até às condições de grande aridez do Norte de África. A par desta capacidade de adaptação climática, estão também os seus hábitos alimentares variados, que vão desde frutos da floresta, como bolotas e castanhas, até toda a espécie de micromamíferos, coelhos, répteis, e mesmo moluscos e peixes (Reis, 1995). São fundamentalmente estas características que permitem que esta espécie apresente hoje uma área de distribuição tão alargada.

O javali é uma espécie sedentária que vive em grupos matriarcais de 10 a 20 indivíduos, constituído por duas ou três fêmeas adultas e respectivas crias sob a dominância de uma fêmea. A partir dos 12 meses os machos subadultos vão

abandonando estes grupos e podem eventualmente juntar-se aos machos adultos. De uma forma geral, os machos adultos são solitários e só durante a época de reprodução se aproximam das fêmeas (O.N.C., 1988; Oliver *et al.*, 1993; Santos, 2002). Até aos 6 meses as crias são muito dependentes das progenitoras, tornando-se independentes entre os 6 e os 12 meses. No javali adulto, a pelagem é composta por cerdas grossas de tom cinzento ou pardo e normalmente é mais escura no Inverno (Figura 1.3). São animais dotados de uma grande robustez física, com um comprimento e peso médios de 1,50 m e 130 kg, respectivamente. No entanto, na Europa Central estes animais podem atingir quase os 300 kg (O.N.C., 1988; Reis, 1995). A corpulência superior dos machos, bem como a presença de presas de maior tamanho num focinho mais entroncado permite facilmente distingui-los das fêmeas.

O javali é ainda uma espécie essencialmente nocturna e a sua actividade tem início no crepúsculo, onde os animais vão abandonando o seu local de repouso diurno para procurar alimento. De uma forma geral, os machos possuem um domínio vital mais alargado do que as fêmeas, podendo afastar-se até cerca de 20 km (O.N.C., 1988; Spitz e Valet, 1991; Santos, 2002).



Figura 1.3 Fêmea de javali com uma cria (Fotografia de Josef L. Hlasek).

Nos séculos XVIII e XIX, o javali sofreu fortes declínios populacionais em todo o Continente Europeu devido à pressão causada pela caça (Apollonio *et al.*, 1988; Randi, 1995; Massei e Genov, 2000). No entanto, depois da Segunda Guerra Mundial assistiu-se a uma forte expansão populacional, com consequente recolonização das suas áreas de distribuição (Massei e Toso, 1993; Massei e Genov,

2000). A diminuição do número de grandes predadores, o abandono dos campos de cultivo e as translocações de animais têm contribuído para aumentar os efectivos desta espécie (Apollonio *et al.*, 1988; Randi, 1995). Este aumento levou mesmo a que se tornasse uma ameaça às culturas e aos ecossistemas em diversos países. As populações portuguesas de javali sofreram também um forte declínio durante o século XIX. Segundo Bugalho e colaboradores (1984), no início do século XX, a presença do javali estava limitada a algumas serras nortenhas e a pequenos agregados no centro e no sul do país, não representando mais do que cerca de 4,75% do território continental. Após a década de 70, novamente associado ao abandono dos campos e à proibição da caça, o javali expandiu-se e recolonizou as suas antigas áreas de distribuição, nomeadamente no sul de Portugal. Actualmente, esta espécie ocupa quase todo o território continental, com excepção dos grandes centros urbanos e de algumas zonas litorais (Morais, 1979).

A par com a sua expansão natural, estão também descritos episódios de translocações e de reintroduções um pouco por toda a Europa, nomeadamente em diversas regiões de Portugal. A reintrodução de animais, frequentemente cruzados com porcos domésticos em cativeiro e a possível miscigenação entre indivíduos provenientes de populações geográficas distintas, constitui claramente um problema em termos de conservação e de gestão das populações (Apollonio *et al.*, 1988; Randi, 1995; Rhymer e Simberloff, 1996).

Durante as glaciações do Quaternário as regiões do Sul da Europa, nomeadamente da bacia do Mediterrâneo como a Península Ibérica, Itália, Grécia, Turquia e Balcãs, constituíram importantes refúgios para inúmeras espécies de animais e plantas (Hewitt, 1999). As oscilações climáticas do Quaternário tiveram um grande impacto na variação e na diversidade genética das espécies, sendo o grande número de endemismos encontrados nestas áreas um exemplo disso (Hewitt, 1999, 2000).

A única região da Europa que encerra evidências de que tenha constituído um refúgio para o javali durante a última glaciação é a Itália. Um estudo efectuado

com base na sequência completa do DNA mitocondrial, mostrou que existe uma grande divergência genética entre os javalis Italianos e os javalis da Europa Central. Uma separação tão clara entre os dois grupos suporta a existência de uma subespécie distinta, que se teria diferenciado nesta região há cerca de 669000 anos, devido ao isolamento criado pelos Alpes (Kijas e Andersson, 2001). Durante as glaciações do Quaternário, a Península Ibérica constituiu um importante refúgio para uma série de mamíferos, como é o exemplo do coelho selvagem (Branco *et al.* 2002) ou do urso pardo (Tarbelet *et al.* 1994) mas, ao que tudo indica, o mesmo não aconteceu para os javalis Ibéricos. No entanto, uma amostragem alargada a toda a Península, nomeadamente a Portugal, não foi até agora realizada, não havendo portanto dados suficientes que confirmem esta hipótese.

1.2 A domesticação

Há cerca de 16000 anos, quando o clima começou a aquecer e a ficar mais sazonal, o Homem expandiu-se e tornou-se sedentário em áreas férteis e apropriadas à agricultura. O Crescente Fértil no Sudoeste da Ásia, a China no Leste Asiático e os Andes na América do Sul, foram os três principais centros de domesticação de espécies de animais e de plantas (Bruford *et al.*, 2003). Alguns dos mais importantes animais domésticos, como os bovinos, ovelhas, cabras e porcos, foram domesticados nestes locais, há aproximadamente 10000 anos (Andersson, 2001).

A domesticação dos javalis Europeu e Asiático ocorreu de forma independente há, sensivelmente, 9000 anos no Próximo Oriente e provavelmente na China (Bökönyi, 1974; Epstein e Bichard, 1984; Giuffra *et al.*, 2000). Os primeiros achados arqueológicos de porcos domésticos foram encontrados na Anatólia, com cerca de 7000 anos, e também na China, datados do início do Neolítico. Subsequentemente, foi a partir destes locais que se expandiram para o resto do mundo (Epstein e Bichard, 1984). No entanto, segundo alguns autores a domesticação do porco pode ter ocorrido repetidamente em diversas regiões,

nomeadamente em África (Blench, 2000). Há mesmo evidências da existência de fósseis de porcos domésticos no Egipto e em Marrocos, com cerca de 5000 anos e, ainda que não tenham sido domesticados, podem ter contribuído para o património genético das populações que aí chegaram mais tarde (MacDonald, 2000). No entanto, é difícil estudar uma possível domesticação do porco em África porque, a par da difícil comparação entre os dados osteológicos, por serem facilmente confundíveis com outros Suídeos selvagens, está também a importação alargada de raças Europeias que teve lugar durante a época colonial.

1.2.1 As raças domésticas portuguesas

As raças domésticas de animais são um componente importante da Biodiversidade, uma vez que possuem combinações alélicas que resultam da adaptação a condições ambientais particulares e que podem, ou poderão ser no futuro, úteis para a Agricultura (Hall e Bradley, 1995). De uma forma geral, as raças autóctones não só representam um importante património genético, como também estão frequentemente associadas a sistemas de exploração extensivos, de importância económica relevante. Assim, a sua conservação deve ser uma prioridade.

Em Portugal existem duas raças autóctones de suínos, a Bísara e a Alentejana. A raça Bísara pertence ao Tronco Céltico, tal como inúmeras raças do Norte da Europa e, segundo alguns autores, tem origem no javali Europeu (*Sus scrofa scrofa*) (Reis, 2003). Esta é uma raça típica do Norte de Portugal, podendo ser encontrada em Trás-os-Montes, Minho e Beiras. Os Bísaros são geralmente animais grandes, chegando a atingir 1 m de altura e 1,5 m da nuca à raiz da cauda (Figura 1.4.) (Reis, 2003). Para alguns autores, no início do século XX existiriam duas variedades de porco Bísaro: uma preta ou preta malhada, distribuída desde Trás-os-Montes até Castelo Branco, conhecida como Transmontana ou Beirã e a variedade branca ou branca malhada, a Galega, com distribuição desde o Minho até à Estremadura (Póvoas Janeiro, 1944 *in* Reis, 2003).



Figura 1.4 Fêmea da raça Bísara (Fotografia gentilmente cedida por João Santos Silva, Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho).

De acordo com Miranda do Vale (1949), no final do século XIX, a raça Bísara foi sujeita a cruzamentos sucessivos com raças de origem Inglesa, nomeadamente com as raças Berkshire, Large White, Large Black e Tamworth. Também nos últimos 30 anos o porco Bísaro foi cruzado com a raça Piétrain (Ramos *et al.*, 2003). Estes cruzamentos, realizados com o objectivo de melhorar a raça, quase a levaram à extinção e, somente em 1994 o cruzamento activo com raças importadas foi consideravelmente reduzido, como consequência da criação da Associação Nacional de Criadores de Suínos de Raça Bísara e de livros de registo dos animais. Assim, esta raça encontra-se actualmente sob medidas de conservação.

A raça Alentejana tem uma maior expressão em Portugal do que a Bísara, estendendo-se a sua exploração por todo o Alentejo. Esta raça pertence ao Tronco Ibérico, do qual fazem parte as raças domésticas da bacia do Mediterrâneo, como a Casertana de Itália, a Gascon do Sul de França e o Porco Ibérico Espanhol (Reis, 2003). Esta raça apresenta a pele sempre pigmentada e coberta por cerdas pouco abundantes de cor preta, ruiva, ou raramente branca (Figura 1.5). São de uma forma geral animais rústicos e com uma boa deposição de gordura. A qualidade da sua carne e produtos são mundialmente conhecidos, fazendo destas raças um atractivo económico importante (Reis, 2003).

Segundo alguns autores, os animais pertencentes ao Tronco Ibérico são descendentes da espécie selvagem *Sus mediterraneus*, que se distinguiria do javali Europeu por possuir membros mais curtos (Reis, 2003). No entanto, Toro *et al.* (2000) sugere que a subespécie que está na origem desta linhagem é a *Sus scrofa*

meridionalis, que estaria também presente no Sudoeste da Península Ibérica. Esta subespécie tem actualmente uma área de distribuição restrita à Sardenha e ao que tudo indica, constitui um grupo muito divergente em relação aos javalis Europeus (Randi, 1995). Não há assim, evidências inequívocas de que o porco Alentejano descenda de uma destas duas espécies, ou de uma outra espécie ainda não identificada.



Figura 1.5 Porco Alentejano (Fotografia disponibilizada pela ANCPA - Associação Nacional dos Criadores de Porco de Raça Alentejana).

De acordo com dados históricos, existiam em Portugal três variedades da raça Alentejana, uma loira, uma ruiva ou Ervideira e outra preta ou Caldeira. As variedades loira e ruiva estão actualmente extintas e a produção centrou-se na variedade preta, de maior rentabilidade (Póvoas Janeiro, 1944 *in* Reis, 2003).

O regime de exploração da raça Alentejana está intimamente ligado a um ecossistema particular de características tipicamente mediterrânicas, o montado, constituindo os porcos Alentejano e Ibérico as últimas raças de pastoreio da Europa (Matos, 2000). Também a raça Alentejana sofreu cruzamentos com várias raças Inglesas durante a década de 50, como por exemplo com as raças Yorkshire, Berkshire e Landrace (Frazão, 1984). No entanto, estes cruzamentos não tiveram grande sucesso, talvez porque os animais híbridos não se adaptavam bem ao tipo de exploração do porco Alentejano e assim, nunca foram tão extensos como na raça Bísara (Reis, 2003).

As raças portuguesas são, de uma forma geral, de crescimento lento, têm uma prolificidade reduzida e uma excessiva deposição de gordura. Por estes

motivos, os criadores optam frequentemente pelo cruzamento com raças de maior produtividade como a Large White ou a Landrace, de forma a fazer face a um mercado cada vez mais exigente (Matos, 2000). É natural que estas práticas realizadas ao longo de vários anos tenham alterado as características genéticas destas raças e como tal, não se conhecem as suas consequências. Sendo assim, a sua conservação deve passar por uma prévia caracterização genética, que não só permita ampliar o conhecimento acerca das suas origens, como também avaliar até que ponto terão sido afectadas por estes cruzamentos descontrolados.

O cruzamento entre porcos domésticos e selvagens foi prática comum em Portugal, assim como em diversos países Europeus, realizado numa tentativa de, por um lado, aumentar os efectivos das populações selvagens e por outro, alterar as características das raças domésticas. Também as populações de porcos ferais são um problema, uma vez que constituem uma ameaça à integridade genética das populações selvagens naturais (Randi, 1995; Rhymer e Simberloff, 1996; Goulding, 2001; Robins *et al.*, 2003; Wilson, 2004). A raça Alentejana, graças ao seu regime de manejo tradicional com acabamento em montanha, tem oportunidade de contactar com animais selvagens (Santos, 2002). A cariotipagem constitui um método de diagnóstico útil na detecção de híbridos entre formas selvagens e domésticas, designadamente entre o porco Alentejano e o javali Europeu, uma vez que os primeiros possuem 38 cromossomas e os últimos 36 (Santos, 2002).

1.3 A utilização do DNA mitocondrial em suínos

O DNA mitocondrial dos mamíferos consiste numa molécula circular de dupla cadeia, de 15000 a 17000 pb (pares de bases) de comprimento e codifica 37 genes. Este marcador genético é um dos mais utilizados em estudos filogenéticos e filogeográficos a diferentes níveis taxonómicos (Awise, 2000). Desta forma, tem sido amplamente utilizado em estudos sobre a domesticação, pois permite inferir acerca da variação das populações selvagens ancestrais e das populações domésticas

actuais (Bruford *et al.*, 2003). O citocromo *b* e a região de controlo do DNA mitocondrial, por serem *loci* altamente variáveis, são ideais para estudar a variabilidade genética a nível inter e intraespecífico. A região de controlo apresenta níveis extraordinários de variação intraespecífica, permitindo deste modo determinar padrões geográficos de diversidade e evolução das populações, expansões demográficas, fluxo génico, hibridação, dispersão e deriva genética (Bruford *et al.*, 2003). A variabilidade genética ao nível do DNA mitocondrial tem sido estudada em numerosos animais domésticos, revelando padrões de domesticação mais ou menos complexos (Loftus *et al.*, 1994; Hiendleder *et al.*, 1998; Giuffra *et al.*, 2000; Luikart *et al.*, 2001).

Estudos realizados com base no citocromo *b* e na região de controlo do DNA mitocondrial confirmam a existência de três grandes grupos de porcos selvagens e domésticos: um grupo Asiático (A), constituído por inúmeras raças domésticas e javalis asiáticos e dois grupos Europeus, EI e EII (Giuffra *et al.*, 2000; Kijas e Andersson, 2001). O grupo EI engloba as raças domésticas e os javalis Europeus, com excepção dos javalis italianos, que formam o segundo grupo Europeu, EII. Como foi já aqui referido, estes resultados apontam para um cenário de domesticação independente no Próximo Oriente e na Ásia e para a possibilidade de ter existido um refúgio em Itália durante a última glaciação. Ainda com base neste marcador, Alves e colaboradores (2003) realizaram um estudo sobre a variabilidade genética e as relações filogenéticas entre diversas variedades de Porco Ibérico e javalis provenientes de Espanha. Ao que tudo indica, as raças domésticas e os javalis espanhóis fazem parte do principal grupo Europeu, EI.

Registos históricos indicam que, durante os séculos XVIII e XIX, foram introduzidos na Europa porcos domésticos provenientes da Ásia, sendo a primeira referência a este episódio atribuída a Darwin (1868). Este facto é confirmado pela presença de DNA mitocondrial de origem Asiática em inúmeras raças Europeias (Giuffra *et al.*, 2000).

Os javalis da Europa Ocidental parecem apresentar baixos valores de variabilidade ao nível do DNA mitocondrial, não existindo igualmente diferenças significativas entre porcos domésticos e selvagens. Isto sugere que a colonização do Oeste Europeu foi recente e realizada através de populações de javali que poderão ter sobrevivido a uma drástica redução demográfica (Randi, 1995).

1.4 A utilização dos genes da cor da pelagem em suínos

Os animais domésticos foram sujeitos durante centenas de anos a uma marcada selecção por parte do homem, pelo que, possuem características fenotípicas e adaptativas únicas (Andersson e Georges, 2004). A pigmentação, por exemplo, é uma característica altamente seleccionada pelo homem, o que fez dos genes associados à cor da pelagem um objecto de interesse por parte dos investigadores nos últimos anos e, hoje em dia, o seu papel funcional está bem caracterizado em inúmeras espécies de aves e mamíferos (Andersson, 2003; Klungland e Våge, 2003; Mundy *et al.*, 2003).

O gene *MC1R* (*melanocortin 1 receptor*), codificado pelo *locus Extension*, é um dos responsáveis pela regulação da síntese da eumelanina e da feomelanina nos melanócitos (Jackson, 1994). A maioria dos mamíferos selvagens apresenta uma mistura destes dois pigmentos, o que resulta numa cor homogénea. Já os animais domésticos apresentam uma grande variedade de cores, sendo as raças frequentemente caracterizadas pelo fenótipo associado à cor da pelagem (Klungland e Våge, 2003). Actualmente, estão descritos para a espécie *Sus scrofa* oito alelos neste *locus* (Kijas *et al.*, 1998; Giuffra *et al.*, 2000; Gustafsson *et al.*, 2001; Kijas *et al.*, 2001; Carrión *et al.*, 2003). O javali Europeu possui um alelo único que o distingue do javali Asiático e das raças domésticas. Por este facto, este *locus* constitui um marcador genético ideal para a detecção de híbridos entre formas selvagens e domésticas (Kijas *et al.*, 1998; Andersson, 2003; Carrión *et al.*, 2003).

A selecção por uma pelagem totalmente branca nas linhagens comerciais de porcos domésticos tem uma expressão enorme e na Europa este tipo de selecção remonta mesmo à época medieval (Wiseman, 1996). A pelagem totalmente branca, que se pode observar em algumas raças suínas como a Large White ou a Landrace, deve-se à presença de duas mutações no gene *I/KIT* (*locus Dominant White*), uma duplicação do gene e uma mutação que leva à perda do exão 17 numa das cópias (Johansson *et al.* 1992; Johansson Moller *et al.* 1996; Marklund *et al.* 1998). O funcionamento normal deste gene é necessário à sobrevivência e migração dos precursores dos melanócitos pelo que, uma perda de funcionalidade deste gene resulta numa falta dos mesmos (Mayer e Green, 1968). Em alguns animais, mutações neste *locus* resultam numa série de efeitos pleiotrópicos na hematopoiese e gametogénese, podendo mesmo ser letais quando presentes em homozigotia (Jackson, 1994; Barsh, 1996). Embora férteis, os porcos homozigóticos para este alelo apresentam um número inferior de glóbulos brancos (Marklund *et al.* 1998). Até ao momento foram identificados seis alelos no gene *KIT* (Johansson *et al.* 1992; Johansson Moller *et al.* 1996; Marklund *et al.* 1998; Giuffra *et al.* 1999; Pielberg *et al.* 2002). Dois destes alelos apresentam uma duplicação do gene e outros dois possuem uma triplicação, o que indica que são geneticamente instáveis e que provavelmente novos alelos poderão surgir por recombinação desigual (Pielberg *et al.* 2002).

1.5 Objectivos e organização da tese

1.5.1 Objectivos

O conhecimento acerca das espécies que ocorrem na Península Ibérica de forma natural e que são parte integrante dos ecossistemas é fundamental. O javali é uma dessas espécies e, na Península Ibérica, o estudo da diversidade genética de uma espécie cinegética é, hoje em dia, imprescindível para uma adequada gestão das suas populações, nomeadamente no que respeita aos problemas que as reintroduções e translocações possam levantar. Em Portugal e em Espanha abundam os trabalhos acerca da biologia e ecologia desta espécie, no entanto, em termos de diversidade genética os estudos são escassos e só há alguns anos começaram a ter alguma expressão (Santos, 2002; Alves *et al.*, 2003).

A Biodiversidade na Península Ibérica não é apenas composta pelas suas espécies selvagens, mas também pelas raças domésticas autóctones que se encontram perfeitamente integradas num determinado contexto agrícola, socio-económico e paisagístico das suas regiões. Em Espanha, tem crescido nos últimos anos a preocupação com a preservação destes recursos, nomeadamente com a sua raça suína mais importante, o Porco Ibérico. Estudos realizados com o intuito de determinar a sua variabilidade genética têm permitido ampliar o conhecimento sobre a raça e, actualmente são inúmeras as publicações acerca de genes que podem de alguma forma melhorar a sua performance e trazer vantagens à raça e à sua produção (Rodrigañez *et al.*, 2000; Toro *et al.*, 2000; Alves *et al.*, 2003; Fabuel *et al.*, 2004). Em Portugal, embora também na última década se tenham reunido esforços para melhorar e preservar as suas duas raças suínas, os estudos acerca da sua diversidade genética escasseiam, de modo que não é possível dirigir esforços de conservação sem um conhecimento prévio acerca das mesmas.

Face ao exposto, pretende-se com este trabalho alargar o conhecimento sobre a diversidade genética do javali na Península Ibérica e das raças suínas autóctones portuguesas, Bísara e Alentejana. Assim, foram definidos os seguintes objectivos:

- A. Analisar a variabilidade genética ao nível do DNA mitocondrial em populações de javali da Península Ibérica e nas duas raças suínas autóctones portuguesas, e interpretá-la à luz dos actuais conhecimentos sobre a demografia e filogeografia do javali na Europa.
- B. Identificar a variação existente ao nível de dois *loci* relacionados com a cor da pelagem, *MC1R* e *KIT*, no javali e nas duas raças suínas portuguesas.
- C. Avaliar o grau de hibridação entre as raças suínas domésticas portuguesas e o javali à luz da variabilidade genética encontrada para estas formas no DNA mitocondrial e nos genes da cor da pelagem.

1.5.2 Organização da tese

No *Capítulo II* é abordado o tema da caracterização genética ao nível da região de controlo do DNA mitocondrial, em 20 populações de javali da Península Ibérica e da Europa Central e nas duas raças domésticas portuguesas. Para o efeito, sequenciou-se um fragmento de 717 pb da região de controlo do DNA mitocondrial num total de 160 animais. Este trabalho é apresentado sob a forma de um artigo em preparação para submissão a uma revista internacional da especialidade.

No *Capítulo III* apresentam-se os resultados obtidos para os genes da cor da pelagem sob duas formas. A primeira parte refere-se ao gene *MC1R* e será apresentada em Português, com uma breve introdução sobre o tema, descrição dos

resultados e uma pequena discussão. Neste estudo, um fragmento de 1106 pb, que inclui o único exão do gene *MC1R*, foi sequenciado em 33 animais incluindo javalis, Bísaros e Alentejanos. Este trabalho é assim apresentado sob a forma de artigo para posterior submissão a uma revista da especialidade.

A segunda parte do trabalho reporta-se ao gene *KIT* e será apresentado sob a forma de uma *short communication* em preparação para submissão a uma revista internacional da especialidade. Dois fragmentos que incluem os exões 17 e 19 do gene *KIT* foram amplificados e analisados por PCR/RFLP, de forma a identificar os alelos que poderão estar na base dos fenótipos observados nas raças domésticas portuguesas.

No capítulo IV será feita uma discussão geral dos resultados obtidos neste trabalho.

2. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA – DNA MITOCONDRIAL

2.1 Artigo 1:

Mitochondrial DNA diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (*Sus scrofa*) in the Iberian Peninsula.

Íris Pinheiro, Raquel Godinho, Christian Gortázar e Paulo Célio Alves

(Artigo em preparação para submissão)

Mitochondrial DNA diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (*Sus scrofa*) in the Iberian Peninsula

I. PINHEIRO *†, R. GODINHO *, C. GORTÁZAR § and P. C. ALVES *†

*CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal; †Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto 4099-002 Porto, Portugal; §IREC, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC/UCLM/JCCLM), 13005 Ciudad Real, Spain.

Abstract

The wild boar, *Sus scrofa*, is an important game species and has a wide distribution in Eurasia. In the last few decades, European populations began to expand and, this fact, allied to man mediated translocations and reintroductions, shaped its genetic variability and gave rise to management problems that urge to be solved. Phylogenetic relationships between 17 Iberian wild boar populations and European and Asian animals were assessed by the analysis of a 717 base pairs (bp) fragment of the mitochondrial DNA (mtDNA) control region. This analysis was extended to two autochthonous Portuguese pig breeds, Bísaro and Alentejano, and their relationships with several European and Asian breeds were established. High levels of gene diversity were found in Iberian wild boars and Portuguese domestic pigs, as well as a significant genetic difference among and within populations. Iberian wild boars and Portuguese pig breeds belong to a main European group, revealing a common maternal origin with animals from Central Europe. No signs of Asian mtDNA introgression from Asiatic populations were found in our survey.

Keywords: wild boars, domestic pigs, mitochondrial DNA, Iberian Peninsula, population expansion, ancestry.

Introduction

The wild boar, *Sus scrofa*, is common in Eurasia and can also be found in the Northwestern region of Africa. The number of described subspecies is uncertain, varying between 4 and 25. Recent studies based on craniometric data suggest that there are only four geographically distinct subspecies, being the *S. s. scrofa* the inhabitant subspecies of Europe, West Asia and Northwest Africa (Genov 1999). However, the taxonomy of this species is far from being resolved and several works based on genetic markers are consistent with the existence of more subspecies both in Europe and Asia (Randi 1995; Ruvinsky & Rothschild 1998; Watanobe *et al.* 1999). Domestication of the wild boar took place in the Near East for the first time, at approximately 9000 years, but there are evidences for an independent domestication of European and Asian forms (Bökönyi 1974; Giuffra *et al.* 2000). The earliest archaeological finds of pig-keeping are usually placed in Anatolia by 7000 BC, and in the early Neolithic of China (Epstein & Bichard 1984). Giuffra *et al.* (2000), in a study based on cytochrome *b*, estimated the time since divergence of European and Asian ancestral forms in 500 000 years, a final evidence for their independent domestication.

Wild boars live in matriarchal groups with hierarchical dominance of one sow, and the only males in the group are immature juveniles, except during the breeding season. They can travel up to 20 km depending on food supply, and usually females have a smaller home range than males (O.N.C. 1988; Spitz & Valet 1991). During the 18th and 19th centuries, wild boars underwent through extreme reduction in several European countries and even became extinct in Britain, mainly due to hunting pressure (Apollonio *et al.* 1988; Yalden 1999). However, after World War II, a decrease in the number of predators and changes in agricultural practices lead to a substantial range expansion of this species (Massei & Toso 1993; Massei & Genov 2000). In Portugal, during the 19th century,

populations of wild boars also declined, and in the beginning of the 20th century this species was restricted to a few Northern locations and to small nucleus in the Centre and South of the country, occupying no more than 4.75% of the continental territory (Bugalho *et al.* 1984). But, in the last 30 years, also due to changes in agriculture, where large field areas became gradually abandoned, and because hunting wild boars turn out to be forbidden, these animals started to recolonize the deserted regions. Therefore, nowadays this species occupies all the continental territory, except for the large urban centres (Morais 1979). This expansion might have also been shaped by translocation and reintroduction of animals, often hybridized in captivity with domestic pigs. Hybridization between animals with distinct geographical origins and between wild boars and domestic pigs is common, and therefore represents a threat to the genetic integrity of native wild populations (Apollonio *et al.* 1988; Rhymer & Simberloff 1996; Vernesi *et al.* 2003). The consequences of such practices are not well known, and so far, there is no information about the genetic diversity of such important game species in the Iberian Peninsula.

Southern regions of Europe, especially the Mediterranean, were very important refugial areas for several animal and plant species during the Quaternary glaciations (Hewitt 1999, 2000). The Iberian Peninsula provided fundamental refugia for numerous mammals such as wild rabbits (Branco *et al.* 2002) or brown bears (Tarbelet *et al.* 1994). Mitochondrial DNA (mtDNA) studies sustain that Spanish and Northern European wild boars are closely related, clustering in one main European group, and also suggest that Central and South-western Spain did not act as refugial areas for wild boars (Alves *et al.* 2003). However, an extensive survey covering most of the Iberian Peninsula, including Portugal, was not done so far. Moreover, Italian wild boars are highly divergent from this main European group (Randi, 1995; Kijas and Andersson 2001). This fact suggests that they might have evolved in Italy due to reproductive isolation during the last glaciation, providing evidences for a second European group (Kijas and Andersson 2001). Finally, these two groups are morphologically and genetically

divergent from a third group that includes Asian subspecies of wild and domestic pigs (Giuffra *et al.* 2000).

In the last few years, studies about the genetic diversity of livestock have been improved. The establishment of conservation programmes became a priority in many countries, since local domestic breeds represent an important genetic and ecological component of biodiversity (Hall & Bradley 1995). In Portugal there are two autochthonous pig breeds, Bísaro and Alentejano. The Alentejano in Portugal and the Iberian pigs in Spain are considered typical Mediterranean breeds, as they own particular features that allow them to adapt to the Mediterranean environment (Toro *et al.* 2000; Reis 2003). The Bísaro breed belongs to a European/Celtic lineage like several northern European breeds (Reis 2003). Historical records indicate that it was extensively crossed with several imported breeds in an attempt to improve its performance (Miranda do Vale 1949). As a result, this breed was almost extinct, and currently it's under a strict conservation programme (Beja-Pereira *et al.* 2001). Mitochondrial DNA and microsatellite markers have been used to assess the genetic diversity of Iberian pigs and to establish their relationships with other European breeds (Toro *et al.* 2002; Alves *et al.* 2003; Fabuel *et al.* 2004). No studies concerning the Portuguese pig breeds were done so far.

Based on a 717 bp fragment of the mtDNA control region, we assessed the genetic diversity of 17 Iberian wild boar populations and of the local domestic Portuguese pig breeds, Bísaro and Alentejano. This study aims to provide new insights about the phylogenetic relationships between Iberian and other European and Asian wild boars and, for the first time, establishes the genetic relationships between Portuguese pig breeds and several other European domestic breeds.

Materials and methods

Sample collection and DNA extraction

Tissue and blood samples were collected from 138 hunted wild boars, comprising 129 animals captured from 17 populations in the Iberian Peninsula, 6 in France and 3 in Austria. Sampling sites and number of samples collected at each site are shown in Fig. 1. Twenty-two tissue samples were also obtained from the two domestic Portuguese breeds, Bísaro (Bis) and Alentejano (Ale). Total genomic DNA was extracted using standard protocols (Sambrook *et al.* 1989).

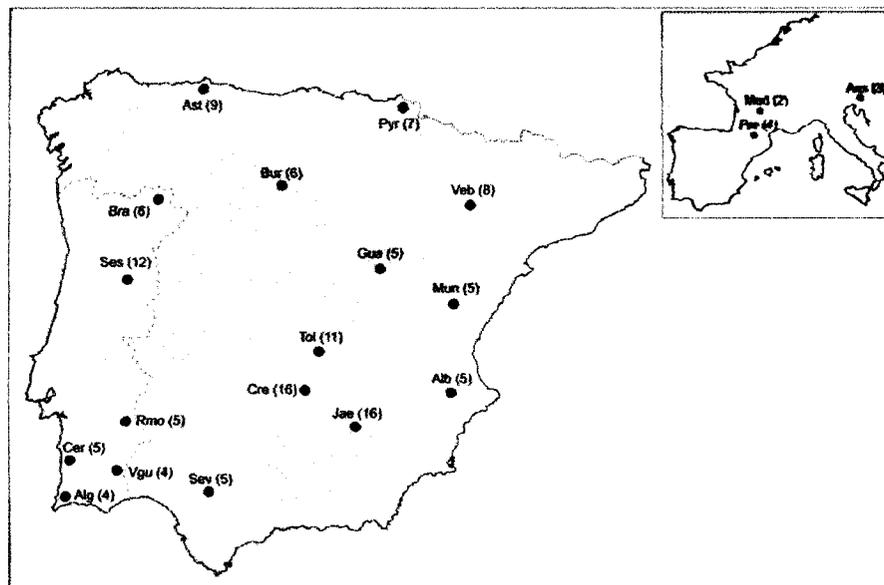


Fig. 1 Sampling sites of wild boar populations from Central Europe and Iberian Peninsula. In brackets are shown the number of samples collected in each one. (Aus) Austria; (Mad) Madine; (Pre) Prémian; (Pyr) Pyrenees; (Ast) Asturias; (Veb) Valle del Ebro; (Bur) Burgos; (Gua) Guadalajara; (Mun) Montes Universales; (Tol) Toledo; (Alb) Albacete; (Cre) Ciudad Real; (Jae) Jaén; (Sev) Sevilla; (Bra) Bragança; (Ses) Serra da Estrela; (Rmo) Reguengos de Monsaraz; (Cer) Cercal; (Vgu) Vale do Guadiana; (Alg) Algarve.

DNA amplification and sequencing

A 1244 bp fragment of the mtDNA control region, between sites 15 390 and 16 634, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with the following primers: 5' CGC CAT CAG CAC CCA AAG CT 3' and 5' ATT TTG GGA GGT TAT

TGT GTT GTA 3', forward and reverse, respectively (Alves *et al.* 2003). PCR was performed in a 13- μ l volume containing 100ng of DNA, 1x reaction buffer (Ecogen, Barcelona, Spain), 1.5 mM MgCl₂, 300 μ M of each dNTP, 0.15 μ M of each primer and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Ecogen). Thermocycling conditions were done as follows: 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 30 s, 62 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension of 72 °C for 5 min. PCR products were then purified using MicroSpin S-400 HR Columns (Amersham Biosciences) and used as sequencing templates. A second primer set - forward (5' CCG TGG GGG TTT CTA TTG A 3') and reverse (5' TGG GCG ATT TTA GGT GAG ATG GT 3') (Alves *et al.* 2003) - was used to determine the nucleotide sequence of a 717 bp fragment of the control region on an ABI 3100 DNA sequencer, using the BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. GenBank accession numbers for the haplotype sequences described in this work are ##### to #####.

Data analysis

Sequences were aligned by eye using BIOEDIT 5.0.9 (Hall 1999) and compared with the mtDNA pig reference sequence (GenBank accession number AJ002189) (Ursing & Arnason 1998). The tandem repeat motif of 10 bp inserted in the *D-loop* region was eliminated before the sequence analysis. Levels of molecular diversity such as haplotype (h) and nucleotide (π_n) diversities, mean number of pairwise nucleotide differences (π) and number of segregating sites (S) were calculated for wild boars and domestic breeds independently with ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Parameters π_n and π were computed according to Kimura 2-parameters distance method (Kimura 1980). Population genetic structure was estimated among and within populations by an analysis of molecular variance (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992). The variance components and its proportion of variation expressed as percentage were calculated. Moreover, the significance of the variance among populations and Φ_{ST} were tested by random permutation, under

the null hypothesis that all samples are drawn from a global population. These tests were also performed in ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000).

Intraspecific mtDNA phylogenies, particularly in the case of control region, are frequently difficult to obtain due to high rates of homoplasy, and median networks are often a better approach than phylogenetic trees (Bandelt *et al.* 1995). Furthermore, for large sample sizes or for a large number of haplotypes, the complexity of a network can be solved with a median-joining (MJ) network algorithm (Bandelt *et al.* 1999). Two MJ networks were constructed for the wild and domestic haplotypes in accordance with the methodology outlined by Bandelt *et al.* (1999) using NETWORK 4.1.0 (Röhl 2000). To build these networks, 66 sequences from wild and domestic pigs available in GenBank were added. A maximum parsimony (MP) calculation was used to eliminate non-parsimonious links (Bandelt *et al.* 1999).

The presence of widely distributed haplotypes can suggest demographic expansion. Nevertheless, other explanations can origin the same pattern, as these may be ancestral haplotypes or the result of translocations and reintroductions. Populations that experienced a demographic expansion usually present unimodal mismatch distributions, in opposite of populations at demographic equilibrium, which generate multimodal distributions (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992). The smoothness of the observed pairwise differences distribution can be quantified by the raggedness index, which takes larger values in stationary populations (Harpending 1994). A mismatch analysis was carried out for the Iberian wild boar populations, and the significance of the observed values was assessed after 10 000 replicates, using a parametric bootstrap approach, under the null hypothesis that the observed data fits the sudden expansion model (Schneider & Excoffier 1999). The mismatch analysis and the raggedness index were performed in ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000). The Fu's F_s and Tajima's D tests of neutrality were calculated, and their significance values were estimated after 5000 replicates, under the null hypothesis of selective neutrality and population equilibrium using ARLEQUIN 2.0 (Schneider *et al.* 2000). The Fu's F_s test

of neutrality is very sensitive to demographic expansion, generally leading to large negative values (Fu 1997). Tajima's D test of neutrality compares two estimators of the parameter theta (θ), the average number of pairwise nucleotide differences (π) and the number of segregating sites (S) (Tajima 1989a). This test, although less powerful than F_s , can be useful when trying to distinguish the effects of population expansion from mutation rate heterogeneity on pairwise differences distribution (mismatch). They have opposite effects on D , as sudden expansion leads to negative D values, while uneven mutation rates shifts it towards more positive values (Tajima 1989a, 1989b; Aris-Brosou & Excoffier 1996).

Results

Control region diversity and population structure

In a total of 160 sequences analysed, 27 haplotypes defined by 24 variable sites were found. These 24 variable sites comprise 22 transitions, 1 transversion and 1 insertion/deletion of 1 bp at nucleotide 15 578 (Table 1). The distribution of haplotypes per location and breed is shown in Table 2. Five different wild boar mtDNA haplotypes were found in Central Europe populations; however, two of them were also identified in the Pyrenees (H4) and in Algarve (H3). Some wild haplotypes have high frequencies and are widely distributed across the Iberian Peninsula (haplotypes 6, 7, 9 and 16). Nevertheless, some unique haplotypes are specific to some locations, such as haplotypes 12 in Albacete, 18 in Sevilla and 19 in Asturias. Haplotypes 13, 16 and 20 were already described in Spanish wild boars in previous works (Alves *et al.* 2003). When sequences from GenBank were aligned and compared with sequences from this study, 3 haplotypes shared between domestic and wild pigs were identified (haplotypes marked with * in Fig. 2). In the domestic Portuguese breeds, Bísaro shows the highest number of haplotypes and no common haplotypes were found between this breed and Alentejano pigs (Table 2). Many of the domestic haplotypes described in this work

are common not only to several Iberian pigs from Spain, as also to different European domestic breeds as Pietrain, Landrace, Duroc and Basque (Alves *et al.* 2003) (see Fig. 2B). Levels of gene diversity, number of segregating sites, mean number of pairwise differences and nucleotide diversity are shown in Table 3. The AMOVA analysis showed a significant genetic difference among wild boar populations ($P < 0.0001$) (Table 4). Though, a substantial amount of variation was also found within populations. In the domestic breeds, most of the haplotype diversity was found within each breed, but a considerable amount also separates them ($P < 0.0001$) (Table 4).

Table 1 Variable positions within the 717 bp fragments of the mtDNA control region in 20 wild (H1-H20) and 8 domestic (Hd1-Hd8) haplotypes. Sequence identities and indels are represented by dots and dashes, respectively. Nucleotide positions are numbered according to the reference sequence GenBank accession number AJ002189 (Ursing & Arnason 1998). H8 and Hd6 are the same haplotype, identified in wild boars and domestic pigs, respectively.

		Nucleotide positions																							
Haplotypes		15450	15558	15578	15588	15604	15616	15675	15683	15695	15714	15723	15741	15758	15822	15825	15878	15936	16010	16074	16091	16092	16127	16139	16141
Wild Haplotypes	AJ002189	T	A	-	C	G	T	T	G	C	T	A	C	T	A	C	A	A	A	A	A	C	A	A	A
	H1
	H2	.	.	.	T	G	G	.
	H3	.	T	.	.	.	C	.	.	.	C	.	.	C	G	.	.
	H4	C
	H5	C	.	T	G
	H6	C	C	.	.	C	.	.	G	G	G	.
	H7	C	.	.	C	G	.
	H8*	C	.	.	C
	H9	C	.	.	C	G
	H10	C	.	.	C	G
	H11	C	.	.	C	G	.	.	.	G	.
	H12	C	C	.	.	C	.	.	G	T	G	G
	H13	C	G	G	G
	H14	C	.	.	C	G	G	G
	H15	A	C	G	.	C	G	G	G
	H16	C	G	.	C	G	.	.	G	G	G
	H17	C	.	.	C	G	G	G
	H18	.	.	A	C	.	T	C	G	G
	H19	C	.	.	C	.	.	C	G	G
H20	C	C	G	G	
Domestic Haplotypes	Hd1	.	T	C	.	.	.	C	G	.	.
	Hd2	C	.	.	.	C	G	G
	Hd3	A	C	G	G	.	.
	Hd4	.	T	.	.	C	.	.	.	C	G	.	.
	Hd5	.	T	C	.	.	T	C	G
	Hd6*	C	.	.	.	C
	Hd7	T	C	.	.	C	G	G	G
	Hd8	C	.	.	C	G	G	G

Table 3 MtDNA control region molecular diversity calculated for wild boars and domestic pig breeds in Iberian Peninsula (IP) and Central Europe (CE); n , number of individuals sequenced; nh , number of haplotypes; h , haplotype diversity; S , number of segregating sites; π , mean number of pairwise differences; π_n , nucleotide diversity; standard deviations are given in brackets.

Pigs		n	nh	h	S	π	π_n
Wild boars	IP	129	17	0.92 (± 0.01)	18	3.24 (± 1.68)	0.005 (± 0.003)
	CE	9	5	0.89 (± 0.07)	9	3.97 (± 2.19)	0.006 (± 0.003)
	Total	138	20	0.93 (± 0.00)	19	3.41 (± 1.75)	0.005 (± 0.003)
Domestic breeds	Bísaros	12	5	0.83 (± 0.07)	10	3.55 (± 1.94)	0.005 (± 0.003)
	Alentejano	10	3	0.60 (± 0.13)	5	1.34 (± 0.90)	0.002 (± 0.001)
	Total	22	8	0.87 (± 0.04)	11	3.49 (± 1.85)	0.005 (± 0.003)

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) calculated for mtDNA control region of wild boars and domestic pig breeds.

	Source of variation	Variance of components	% of variation	Φ_{ST}	P
Wild boars	Among populations	0.93	53	0.53	<0.0001
	Within populations	0.83	47	-	-
Domestic breeds	Among breeds	0.92	42	0.42	<0.0001
	Within breeds	1.28	58	-	-

* After 10 000 random permutations.

Phylogenetic analysis and tests for population expansion

Figure 2 shows the MJ networks built from the wild (2A) and domestic (2B) haplotypes. Figure 2A represents one of the four MP trees, being the most plausible solution taking into account a compatibility criterion and downweighting highly mutable sites. In the two MJ networks, Fig. 2A and 2B, it is possible to identify two distinct clades separated by 12 and 11 mutations, respectively. These are the Asian and European clades. In both networks it is also notorious that sequences from Italian and German wild boars cluster within the Asian clade, being more closely related to Japanese (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu (*S. s. riukiuanus*) wild boars, two subspecies from Asia. All domestic and wild haplotypes from our survey cluster in the European clade, and no signs of Asian mtDNA introgression were found in both wild and domestic pigs.

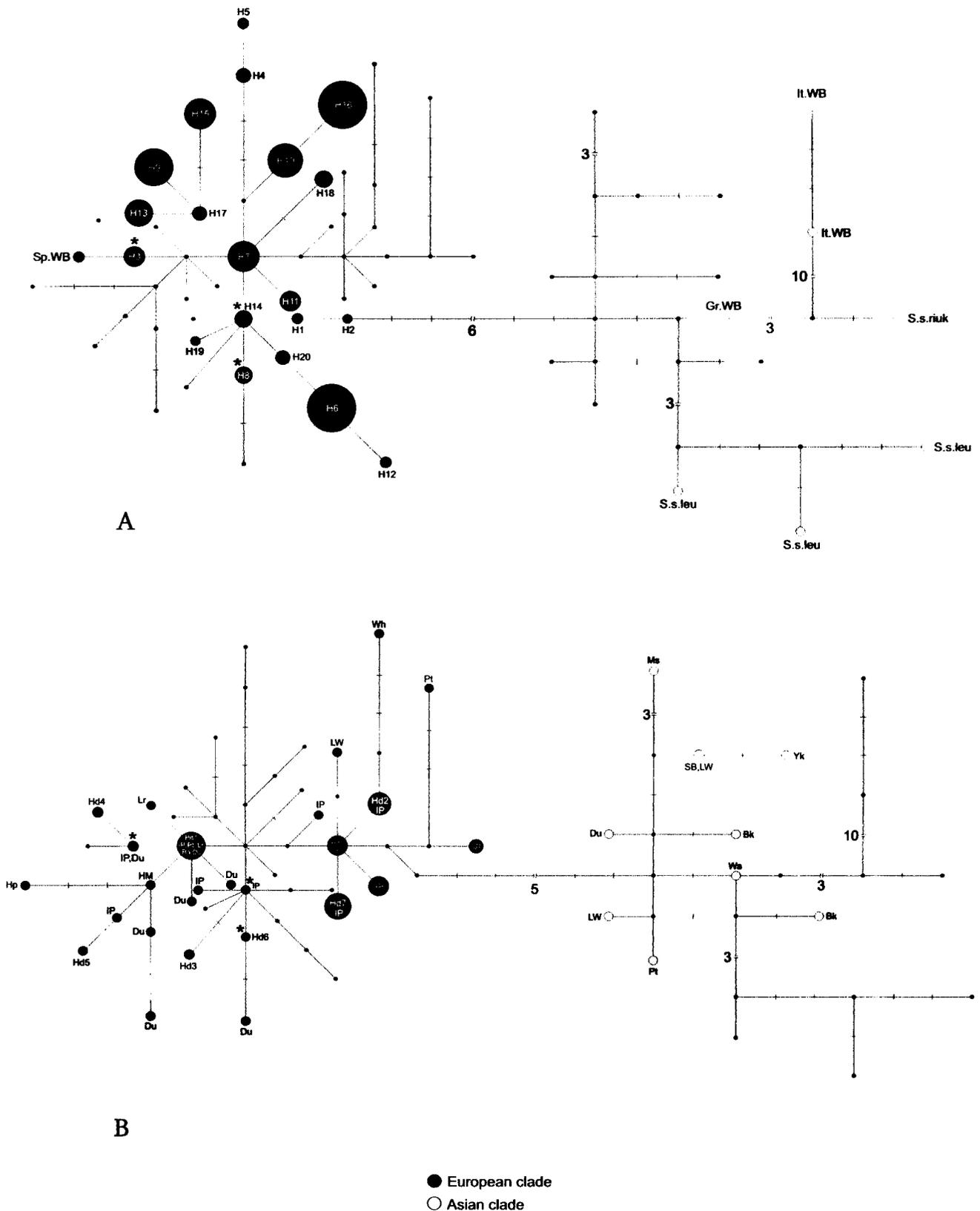


Fig. 2 Median-joining networks for the wild (A) and domestic pig haplotypes (B) based on mtDNA control region sequences. The MJ network in A represents one of the 4 MP networks; figure B represents the unique solution. Sp.WB, Spanish wild boar; It.WB, Italian wild boar; Gr.WB, German wild boar; S.s.leu, *S. s. leucomystax*; S.s.riuk, *S. s. riukiuanus*; Spanish breeds: IP, Iberian pigs; SB, Spotted Black Jabugo; Ba, Basque; European breeds: HM, Hungarian Mangalitzta; Lr, Landrace; LW, Large White; Du, Duroc; Hp, Hampshire; Pt, Pietrain; Bk, Berkshire; Wh, Welsh; Yk, Yorkshire; Asian breeds: Ms, Meishan; Wa, Wan'an. Sequences shared between wild and domestic pigs are denoted by *. Black dots represent median vectors or missing haplotypes, dashes represent mutations and areas of circles are proportional to the numbers of sampled individuals.

The bell-shaped mismatch distribution (Fig. 3) and the low and non-significant raggedness index (results not shown) obtained for Iberian wild populations are consistent with a demographic growth. However, when the validity of the sudden expansion model was tested, the null hypothesis that the observed data is compatible with the model was rejected ($P=0.0487$). Moreover, the Fu's F_s (-2.308) was not significant at the 5% level ($P=0.250$) and the Tajima's D test of neutrality (0.077) was not significantly different from 0 ($P>0.1$).

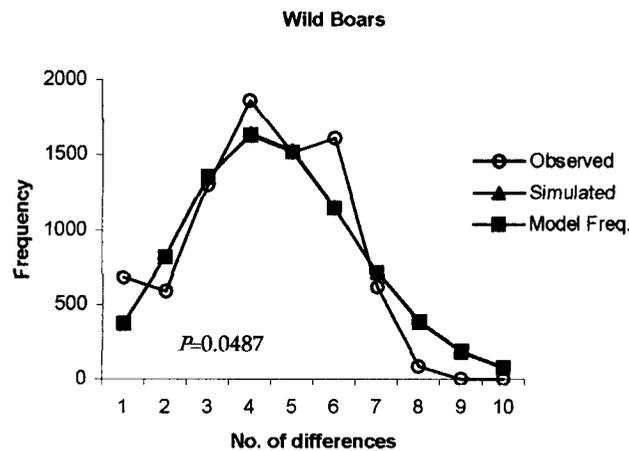


Fig. 3 Mismatch distribution of the mitochondrial DNA control region in wild boar populations. P -value represents the probability that the sum of square deviations (SSD) of simulated data set is larger or equal than the SSD of observed data set.

Discussion

Structure of wild boar populations

Sequencing analysis of the mitochondrial DNA control region revealed high levels of gene diversity in wild boars of Iberian Peninsula, as well as in Central Europe (Table 3). The results obtained by the AMOVA analysis (Table 4) show that most of the variation is observed among populations, a strong indication of the genetic structure of wild populations. It is also possible to recognize that a few haplotypes are exclusive to some geographic locations (see Table 2), providing evidence for this structure and for the uniqueness of some populations. This fact, allied to the

high levels of haplotype diversity obtained, are of great importance in conservation management. On the other hand, haplotypes such as 3, 6, 9, 11 and 16 have a wide distribution, which can suggest that these are ancestral haplotypes. Alternatively, they can result from expanding populations or from translocated animals. Considering that these haplotypes are at the tips of the network, they probably have a recent origin and the hypothesis that these represent ancestral haplotypes doesn't seem so reasonable (Fig. 2A). By the analysis of Table 2, it is also possible to realize that in Portugal the North is much more genetic diverse than the South. The Northern region of Bragança (Bra) was one of the few locations in which populations of wild boars remained intact during the drastic reductions that took place in the 20th century (Bugalho *et al.* 1984). The presence of only two haplotypes in four geographically distant locations is in agreement with a recent recolonization of Southern Portugal by populations that might have survived a severe bottleneck. The occurrence of one haplotype (H3) shared between populations from Algarve and Northern France is unexpected. This is most likely a result of translocated animals. The closest genetic relationship between H3 and other Iberian haplotypes, rather than with H4 and H5 from Southern France (see Table 2 and Fig. 2A), probably implies a translocation from Iberia to France.

Demographic expansion is an important signature of post-glacial episodes (Hewitt 1999, 2000; Lessa *et al.* 2003), and exponential population growth leads to a nearly Poisson distribution of pairwise differences (Slatkin & Hudson 1991). However, unimodal distributions can also result from high levels of homoplasy observed at nucleotide sites with very high mutation rates (Bertorelle & Slatkin 1995). This seems to be the case with the results obtained for Iberian wild boars. By the analysis of Fig. 3, it is possible to observe an almost unimodal mismatch distribution. However, the rejection of sudden expansion model and the non-significant tests of neutrality are consistent with a constant population size. Molecular diversity indices such as mean number of pairwise nucleotide differences (π) and number of segregating sites (S) are also consistent with this

result, since they take lower values with increasing mutation rate heterogeneity (Aris-Brosou & Excoffier 1996). But, inferring past demographic events from DNA sequences with uneven mutation rates remains a problem. The joint action of both mild expansions and mutation rates heterogeneity can result in non-significant values of Tajima's D and to moderate values of DNA polymorphism, and in this way be very difficult to distinguish from a stationary population (Aris-Brosou & Excoffier 1996). However, we concluded that altogether these facts confirm the hypothesis of no refugia for wild boars in the Iberian Peninsula.

Phylogenetic relationships between wild boars

The results obtained in this study are in agreement with previous works showing that wild boars from Iberian Peninsula belong to the main European group, as Iberian haplotypes are closely related with haplotypes found in France and Austria (Fig. 2A) (Alves *et al.* 2003). This close relationship between Iberian and Northern European samples, suggest a recent recolonization of Iberian Peninsula after the last post-glacial warming. But, some problems remain unsolved. No conclusions can be drawn about the source of this colonization, if it is from Northern European populations of wild boars or from Middle-Eastern populations. Further sampling from Northern Europe and from the Near East is needed to confirm these hypotheses. At a first glimpse, we can see that haplotypes from Austria have an internal position in the network, suggesting that these are ancestral haplotypes. Northern European origins for Iberian populations can't be ruled out, as there are evidences that cold-tolerant species could have survived in favourable areas in the North (Bilton *et al.* 1998; Stewart & Lister 2001; Brunhoff *et al.* 2003; Fink *et al.* 2004). Three main clades were already described for mitochondrial DNA in wild boars, two European groups EI and EII, and one Asian group, A (Giuffra *et al.* 2000; Kijas & Andersson 2001). Our results are in agreement with these findings. Nevertheless, by the analysis of Fig. 2 it is possible to recognize that although the two Italian sequences form a very distinct and divergent group, they cluster

within the Asian clade, as well as the German wild boar sequence. Thus, it seems that these sequences have a blended origin, and these individuals can have been crossed with foreign animals, and taken as pure European wild boars by mistake.

Domestic pig breeds

High levels of gene diversity were also found in the two domestic Portuguese breeds, although with slightly lower values, perhaps due to an inferior sample size, or as consequence of mtDNA lineage sorting reflecting the recent origin of breeds (Hall & Bradley 1995) (Table 3). These high values, especially in the Bísaro, and the large genetic variation within breeds (see Table 4) can be an evidence of extensive crossbreeding with imported animals. When comparing Portuguese pig sequences with other domestic breeds, it is possible to recognize that almost all the haplotypes are shared with Iberian Pigs from Spain. In one hand, this fact supports the ancestry of Iberian Pigs, as it is known that two Portuguese ancestral strains of Alentejano contributed to their origin (Rodrigáñez *et al.* 2000; Toro *et al.* 2000); but, on the other hand, it reveals the mixed origin of the Bísaro breed, enlightening the importance of this sort of studies in the genetic characterization of endangered strains. Nevertheless, taking a better look to Fig. 2B, it is also possible to observe that Hd1 is shared between Bísaro pigs and several other breeds. Considering its position in the network and the overall tree topology, we suggest that probably Hd1 is an ancestral haplotype, providing evidence for a common ancestry for European and Portuguese pig breeds. Historical records indicate that Red Iberian pigs and some animals from Alentejano breed were exported to the United States in the 19th century and contributed to the origin of Duroc-Jersey breed (Vaughan 1950; Nunes 1993). In 1962, this breed was imported to Spain and crossbreeding with Iberian pigs became frequent (Toro *et al.* 2000; Fabuel *et al.* 2004). This common maternal ancestry between Iberian and Duroc breeds was already suggested in previous studies based on mtDNA (Alves *et al.*, 2003). The MJ network on Fig. 2B clearly confirms this ancestry of Duroc breed

from Portuguese and Iberian pigs, since several sequences of this breed are shared with or derived from Iberian ones.

Introgression of Asian mtDNA, which occurred at about 200 years ago, shaped the genetic characteristics of several domestic pig breeds all over Europe (Giuffra *et al.* 2000; Kijas & Andersson, 2001; Okumura *et al.* 2001; Alves *et al.* 2003). For instance, Asian alleles from nuclear genes with favourable phenotypic effects seem to be fixed in some European breeds, as for example the *MC1R* allele for black coat color in Large Black breed (Kijas *et al.* 1998). Giuffra and collaborators (2000), taking into account historical records, and the fact that Asian mtDNA is present in numerous European breeds, suggested that probably females were used for crossbreeding. Haplotypes from nuclear genes with presumed Asian origin were already detected in both Portuguese domestic breeds (Ramos *et al.* 2003; Pinheiro and Godinho, unpublished results). The absence of Asian mtDNA haplotypes among the Portuguese pigs may suggest a male-mediated introgression in these breeds.

The presence of three common haplotypes between domestic pigs and wild boars (see Fig. 2) attest for the possibility of hybridization between them. However, considering their internal position in the network, these are probably ancestral wild haplotypes selected during the domestication process. Though, we cannot exclude other two hypotheses. First, man mediated hybridization can have taken place, where wild females were kept in captivity to hybridize with domestic pigs, even if crossbreeding between wild females and domestic males is unexpected. Or, as a second explanation, wild boars carrying haplotypes 3, 8 and 14 (see Fig. 2A) are feral, which is in agreement with the hybridization problem that has been described in several European countries (Randi 1995; Goulding 2001; Wilson 2004).

This work shows a comprehensive picture about the genetic diversity of wild boars in the Iberian Peninsula and their relationships with other European and Asian pigs, and it also provides a starting point for exploring the origins of Iberian wild boars. Notwithstanding, mtDNA only allows following the maternal

lineage and since there are huge differences between sexes in what concerns to dispersal and hybridization with domestic pigs, this study should also be extended to nuclear markers and the Y chromosome. SNPs (single nucleotide polymorphisms) are becoming a marker of choice in population ecology, evolution and conservation (Brumfield *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2004), and therefore they can provide new insights about the real amount of hybridization between wild and domestic pigs in the Iberian Peninsula, help to clarify their genetic relationships and to identify their genetic sources.

Acknowledgments

We thank to Pedro Santos from University of Évora (Portugal), to Klaus Hackländer from University of Veterinary Medicine (Vienna) and to the Office National de la Chasse (France) for providing samples from wild boars. Samples from Bísaro and Alentejano pigs were kindly provided by João Santos e Silva and Estação Zootécnica Nacional (Portugal), respectively.

References

- Alves E, Óvilo C, Rodríguez MC, Silió L (2003) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, **34**, 319-324.
- Apollonio M, Randi E, Toso S (1988) The systematics of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Italy. *Bollettino Di Zoologia*, **3**, 213-221.
- Aris-Brosou S, Excoffier L (1996) The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 494-504.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Bandelt HJ, Forster P, Sykes BC, Richards MB (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics*, **141**, 743-753.

- Beja-Pereira A, Bento P, Ferrand N, Brenig B (2001) Genetic polymorphism of the 17th exon at porcine RYR1 locus: a new variant in a local Portuguese pig breed demonstrated by SSCP analysis. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **118**, 271-274.
- Bertorelle G, Slatkin M (1995) The number of segregating sites in expanding human populations, with implications for estimates of demographic parameters. *Molecular Biology and Evolution*, **12**, 887-892.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S *et al.* (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **265**, 1219-1226.
- Bökönyi S (1974) *History of Domestic Mammals in Central and Eastern Europe*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Branco M, Monnerot M, Ferrand N, Templeton R (2002) Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed from Nested clade and Mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. *Evolution*, **56**, 792-803.
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **18**, 249-256.
- Brunhoff C, Galbreath KE, Fedorov VB, Cook JA, Jaarola M (2003) Holarctic phylogeography of the root vole (*Microtus oeconomus*): implications for late Quaternary biogeography of high latitudes. *Molecular Ecology*, **12**, 957-968.
- Bugalho JF, Carvalho JS, Borges JF (1984) Situation du sanglier au Portugal. *Symposium International sur le Sanglier*. Toulouse, France. *Les Colloques de l'INRA*, **22**, 112-121.
- Epstein H, Bichard M (1984) Pig. In: *Evolution of domesticated animals*. I. L. Mason Eds., pp. 145-162, London: Longman.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Fabuel E, Barragán C, Silió L, Rodríguez MC, Toro MA (2004) Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellite markers. *Heredity*, **93**, 104-113.

- Fink S, Excoffier L, Heckel G (2004) Mitochondrial gene diversity in the common vole *Microtus arvalis* shaped by historical divergence and local adaptations. *Molecular Ecology*, **13**, 3501-3514.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Genov P (1999) A review of the cranial characteristics of the wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus 1758), with systematic conclusions. *Mammal Review*, **29**, 205-238.
- Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V *et al.* (2000) The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, **154**, 1785-1791.
- Goulding MJ (2001) Possible genetic sources of free-living wild boar (*Sus scrofa*) in southern England. *Mammal Review*, **31**, 245-248.
- Hall SJG, Bradley DG (1995) Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 267-270.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Harpending HC (1994) Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, 591-600.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Kijas JMH, Andersson L (2001) A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *Journal of Molecular Evolution*, **52**, 302-308.
- Kijas JMH, Wales R, Tornsten A *et al.* (1998) Melanocortin receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, **150**, 1177-1185.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.

- Lessa EP, Cook JA, Patton JL (2003) Genetic footprints of demographic expansion in North America, but not Amazonia, during the late Quaternary. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, **100**, 10331-10334.
- Massei G, Genov P (2000) *Il Cinghiale*. Calderini Edagricole, Bologna.
- Massei G, Toso S (1993) Biologia e gestione del cinghiale. *INFS, Documenti Tecnici*, **5**.
- Miranda do Vale J (1949) *Gado Bissulco. Suínos, Bovinos, Arietinos e Caprinos*. Livraria Sá da Costa, Lisboa.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK and the SNP workshop group (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **19**, 208-216.
- Morais J (1979) *Introdução ao estudo de biologia do javali, Sus scrofa L. 1758, em Portugal*. Relatório de Estágio, Universidade Clássica de Lisboa.
- Nunes JL (1993) *Contributo para a Reintegração do Porco Alentejano no Montado*. Ph. D. Thesis, University of Évora.
- Office National de la Chasse (1988) Notes Techniques: *Le Sanglier*, fiche nº 45. Bulletin Mensuel de l'Office National de La Chasse, nº 123.
- Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E *et al.* (2001) Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*, **32**, 139-147.
- Ramos AM, Mestre R, Gouveia S *et al.* (2003) Use of type I DNA markers for initial genetic characterization of two Portuguese swine breeds. *Archivos de Zootecnia*, **52**, 255-264.
- Randi E (1995) Conservation genetics of the genus *Sus*. *IBEX Journal of Mountain Ecology*, **3**, 6-12.
- Reis J (2003). *Suínos*. (ed. Direcção Geral de Veterinária), ISBN, Portugal.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 83-109.
- Rodrigáñez J, Toro MA, Rodríguez C, Silió L (2000) Alleles survival from Portuguese and Spanish strains in a population of Iberian pig. In: *Tradition*

- and innovation in Mediterranean pig production* (ed. Afonso JA, Tirapicos JL), pp. 57-61. CIHEAM-EU, Zaragoza.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- Röhl A (2000) Network: Fluxus Technology Ltd., Clare, UK.
- Ruvinsky A, Rothschild MF (1998) Systematics and evolution of the pig. In: *The Genetics of the pig* (ed. Ruvinsky A, Rothschild MF), pp. 1-16. CAB International, Oxon, UK.
- Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**, 1079-1089.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *ARLEQUIN2.0. A Software for Population Genetic Data Analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponential growing populations. *Genetics*, **129**, 555-562.
- Spitz F, Valet G (1991) *Etude démographique des sangliers du Languedoc*. Bulletin Mensuel de l'Office National de La Chasse, n° 159, 28-39.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biot. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 608-613.
- Tajima F (1989a) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Tajima F (1989b) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 597-601.
- Tarbelet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **255**, 195-200.

-
- Toro MA, Barragán C, Óvilo C *et al.* (2002) Estimation of coancestry in Iberian pigs using molecular markers. *Conservation Genetics*, **3**, 309-320.
- Toro MA, Rodrigañez J, Silió L, Rodríguez C (2000) Genealogical analysis of a close herd of Black hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*, **14**, 1843-1851.
- Ursing BM, Arnason U (1998) The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *Journal of Molecular Evolution*, **47**, 302-306.
- Vaughan HW (1950) *Breeds of Live Stock in America*. Long's College Co.: Columbus, OH.
- Vernesi C, Crestanello B, Pecchioli E *et al.* (2003) The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **12**, 585-595.
- Watanobe T, Okumura N, Ishiguro N *et al.* (1999) Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analysed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, **8**, 1509-1512.
- Wilson CJ (2004) Rooting damage to farmland in Dorset, southern England, caused by feral wild boar *Sus scrofa*. *Mammal Review*, **4**, 331-335.
- Yalden D (1999) *The History of British Mammals*. Poyser, London.

3. GENES DA COR DA PELAGEM

3.1 Artigo 2

Diversidade genética do *MC1R* nas raças suínas portuguesas e no javali Ibérico.

Íris Pinheiro e Raquel Godinho

(Artigo em preparação para submissão)

3.2 Artigo 3

The Portuguese Bísaro pig with belt-like phenotype has not the Belt allele at the *Dominant White (I/KIT)* locus.

Íris Pinheiro e Raquel Godinho

(Artigo em preparação para submissão)

Diversidade genética do *MC1R* nas raças suínas portuguesas e no javali Ibérico

ÍRIS PINHEIRO^{1,2} e RAQUEL GODINHO¹

¹CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal ²Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto 4099-002 Porto, Portugal.

Resumo

A cor da pelagem é uma das principais características associadas à domesticação e o *MC1R* tem sido um dos *loci* mais estudados nos últimos anos nos porcos domésticos, sendo actualmente possível associar a um determinado conjunto de raças um alelo particular. As raças suínas portuguesas apresentam uma diversidade alélica considerável neste *locus*, tendo sido encontrados uma série de alelos responsáveis por fenótipos diferentes. Na raça Bísara este é um resultado que está de acordo com a sua enorme variabilidade fenotípica e com os inúmeros cruzamentos com raças exóticas a que foi sujeita. Mas, na raça Alentejana, por força da selecção a que tem sido submetida nos últimos anos para manter a sua coloração característica, este é um resultado inesperado. O *MC1R* é também um marcador ideal para detectar hibridação entre formas selvagens e domésticas de suínos, uma vez que as populações de javali possuem alelos únicos. As evidências de hibridação entre porcos domésticos e javalis da Península Ibérica foram escassas, tendo sido apenas detectado um indivíduo híbrido, proveniente de Espanha. Nos javalis foi também identificado o alelo característico das populações selvagens da Europa, uma evidência da sua proximidade filogenética e da forte selecção natural que pesa sobre este gene.

Palavras chave: *MC1R*, cor da pelagem, Bísaro, Alentejano.

Summary

Coat color is one of the main characteristics related with domestication, and *MC1R* has been one of the most important loci studied in the past few years in domestic pigs, being nowadays possible to associate a particular allele to a group of breeds. Portuguese swine breeds have significant allele diversity at this locus, and we've found different alleles responsible for different phenotypes. In the Bísaro breed this result is in accordance with its high phenotypic variability and with the numerous crosses with exotic breeds that have been made. But, in Alentejano breed, because it has been submitted to strong selection in order to maintain its characteristic coat color, this is an unexpected result. *MC1R* gene is also an ideal marker to detect hybridization between wild and domestic forms, since wild boar populations hold unique alleles. Evidences of crossbreeding between wild boars and domestic pigs from Iberian Peninsula are scarce, as only one individual originated from Spain was identified as a putative hybrid. In wild boars it was also found the allele characteristic of European wild populations, an evidence of their close phylogenetic relationship and of the strong natural selection that lies upon this gene.

Keywords: *MC1R*, coat color, Bísaro, Alentejano.

Introdução

Os animais domésticos constituem um modelo importante para estudar a função e a regulação dos *loci* que afectam a pigmentação, não só porque apresentam uma variabilidade imensa de pelagens, como também permitem estabelecer correlações genótipo/fenótipo únicas (Klungland e Våge, 2003). A cor da pelagem tem sido altamente seleccionada pelo homem, uma vez que é uma das principais características associadas à domesticação. Ao que tudo indica, nos últimos 1000 anos, a selecção tem sido dirigida no sentido da diversificação dos padrões de pigmentação. É provável que a cor da pelagem constitua um marcador visual capaz de distinguir, entre formas domésticas, aquelas que de alguma maneira possuem características favoráveis, como por exemplo, produção de leite de qualidade ou crescimento rápido (Andersson, 2003). Frequentemente, a inscrição de um animal doméstico no livro de registos requer uma cor correcta, estabelecida de acordo com os padrões da raça.

Nos mamíferos, três genes são essenciais na determinação da cor da pelagem: *MC1R* (*Melanocortin 1 Receptor*), *Agouti* e *I/KIT* (*Inhibition of color*). A regulação da síntese da eumelanina (pigmento castanho ou preto) e da feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho) nos melanócitos é controlada pelos *loci Extension (E)* e *Agouti (A)*, respectivamente (Jackson, 1994). O *locus Extension* é responsável pela codificação de uma proteína receptora que se expressa nos melanócitos (*MC1R*) à qual se liga a hormona α -MSH (α -melanocyte-stimulating hormone) (Robbins *et al.*, 1993). O gene *Agouti* codifica uma proteína – *ASIP* (*agouti signaling protein*) – antagonista do *MC1R*, uma vez que compete com a hormona α -MSH pela ligação ao receptor (Lu *et al.*, 1994). Assim, a α -MSH induz a síntese de eumelanina nos melanócitos e a proteína *ASIP* altera a produção para feomelanina (Geschwind, 1966; Silvers, 1979; Protá, 1992). No que respeita ao *locus E*, quando um alelo recessivo está presente em homocigotia há uma perda de função do receptor da α -MSH e conseqüentemente os animais apresentam pigmentação vermelha ou amarela. Em contraste, a presença de um alelo dominante resulta numa resposta hiperactiva deste receptor causando pigmentação preta (Robbins *et al.*, 1993; Jackson, 1997). Devido a esta forte relação genótipo/fenótipo, o *MC1R* tem sido exaustivamente estudado em inúmeros animais domésticos, como em bovinos, cavalos, porcos ou galinhas (Klungland *et al.*, 1995; Marklund *et al.*, 1996; Kijas *et al.*, 1998; Takeuchi *et al.*, 1997). Relativamente ao *locus I/KIT*, uma determinada mutação neste gene impede a migração dos precursores dos melanócitos para a pele, o que origina animais brancos, independentemente do seu genótipo para os outros dois *loci* (Mayer e Green, 1968).

Actualmente estão descritos nos suínos oito alelos para o *locus E/MC1R* (Figura 3.1.1). Os alelos *MC1R*1* e *MC1R*5*, responsáveis pelo fenótipo selvagem, são característicos das populações de javali da Europa e da Ásia, respectivamente (Kijas *et al.*, 1998; Giuffra *et al.*, 2000). Estes alelos diferem apenas por uma mutação sinónima no códon 121. A presença natural de um destes alelos num animal doméstico é rara ou mesmo nula, o que faz deste gene um excelente

marcador para detectar hibridação entre formas domésticas e selvagens, ou mesmo para certificar a origem de javalis criados em cativeiro com destino à produção de carne ou à caça (Kijas *et al.*, 1998; Andersson, 2003; Carrión *et al.*, 2003). O alelo *MC1R*3*, presente por exemplo na raça Hampshire, está associado a uma pelagem preta uniforme e difere do alelo selvagem por uma mutação não-sinónima no codão 124 (Kijas *et al.*, 1998). Os alelos *MC1R*2* e *MC1R*7*, porque partilham com o alelo *MC1R*5* a substituição presente no codão 121 são, por isso, de origem asiática. Estes alelos são responsáveis pela pelagem preta uniforme que se pode observar por exemplo nas raças Large Black e Meishan (Kijas *et al.*, 1998). O alelo *MC1R*7* foi detectado em alguns animais da raça Meishan e difere do *MC1R*2* por uma substituição no codão 122. No entanto, embora altere o aminoácido, esta substituição parece não provocar qualquer mudança de fenótipo (Gustafsson *et al.*, 2001).

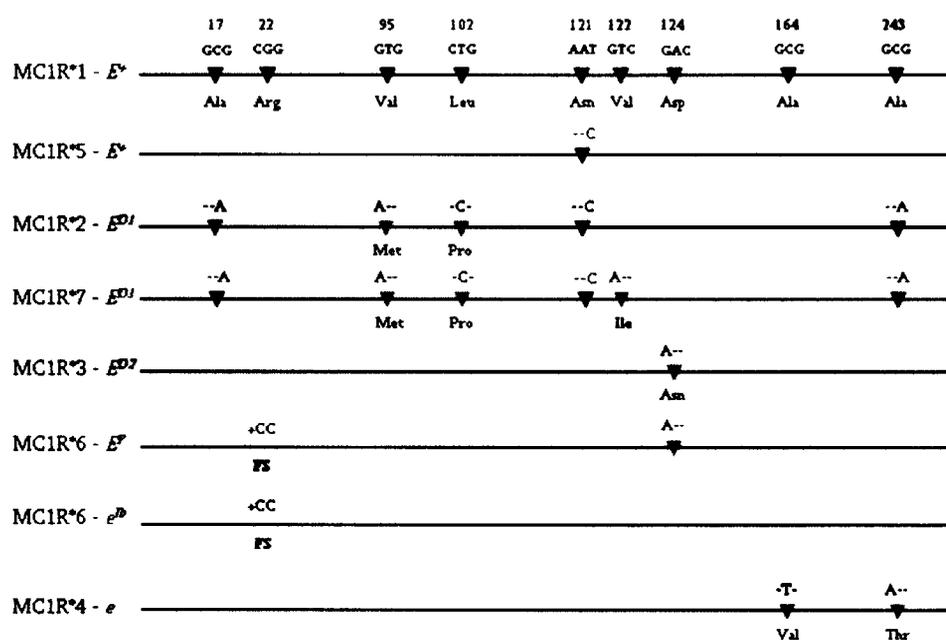


Figura 3.1.1 Representação dos alelos que estão actualmente descritos para o gene *MC1R* nos suínos. A azul indicam-se as mutações sinónimas e a laranja as mutações não-sinónimas. A numeração dos nucleótidos está de acordo com a sequência de referência do *GenBank* AF326520. FS indica uma mutação *frameshift*.

A expressão fenotípica do alelo *E^F* (*MC1R*6*) é extremamente variável, pois pode ser encontrado em animais de pelagem vermelha ou preta uniformes como é o exemplo das raças Tamworth e Berkshire. Também pode ser observado em

animais malhados (com manchas pretas em fundo branco ou vermelho), como por exemplo na raça Piétrain, ou mesmo em animais totalmente brancos como nas raças Large White e Landrace (Kijas *et al.*, 2001), embora neste último caso, o referido fenótipo se deva à presença do alelo dominante *I* no gene *KIT* (Marklund *et al.*, 1998). Esta grande variedade de fenótipos resulta de uma pressão selectiva diferente, já que em determinadas raças se pretendem animais com manchas e noutras animais de cor uniforme (Kijas *et al.*, 2001). O alelo *MC1R*6* caracteriza-se pela inserção de duas citosinas no codão 22. Esta mutação, do tipo *frameshift*, introduz um codão *stop* prematuro, traduzindo-se assim numa proteína não funcional. A presença de manchas pigmentadas nos animais homozigóticos *E^P/E^P* deve-se, provavelmente, à ocorrência de reversões somáticas nos precursores dos melanócitos, que deste modo restauram a função do receptor nestas áreas (Kijas *et al.*, 2001). O alelo *e^h*, até ao momento, foi detectado apenas na raça Ibérica Espanhola. Este alelo, que difere do alelo *E^P* porque não possui a transição G/A no codão 124, pode estar na origem dos fenótipos vermelho e castanho, característicos de algumas variedades de porco Ibérico (Carrión *et al.*, 2003). Por fim, o alelo recessivo *e* é característico da raça Duroc que possui uma pelagem vermelha uniforme (Kijas *et al.*, 1998).

A raça Portuguesa Bísara apresenta uma grande variedade de fenótipos, podendo apresentar animais malhados, animais de pelagem preta ou branca uniformes e animais com uma cinta branca em fundo preto. Já a raça Alentejana, por força da selecção, apresenta hoje em dia uma pelagem sobretudo de cor preta (Ramos *et al.*, 2003). Face ao exposto, este trabalho tem como principais objectivos avaliar a variabilidade genética existente ao nível do gene *MC1R* nas duas raças domésticas portuguesas e em javalis da Península Ibérica, confirmar a presença de alelos que deverão ser fruto dos cruzamentos que estas raças sofreram ao longo dos anos e, identificar eventuais indícios de hibridação entre estas duas raças e a forma selvagem.

Material e métodos

Neste trabalho foram utilizadas 18 amostras de tecido e sangue das duas raças suínas portuguesas, Bísara ($n=9$) e Alentejana ($n=9$). Adicionalmente, foram utilizadas 15 amostras de javali oriundas de diferentes localizações geográficas da Península Ibérica e de França, de forma a garantir por um lado uma amostragem global e por outro, a utilização de indivíduos não aparentados. O DNA foi extraído pelo método salino com digestão pela proteinase K (Sambrook *et al.*, 1989).

Com base na sequência completa do gene *MC1R* disponível no *GenBank* (AF326520, Kijas *et al.*, 2001), foram desenhados dois *primers* na região intrónica adjacente ao único exão deste gene de 963 pb. Um fragmento de 1282 pb foi então amplificado com os *primers*: MC1R/INT-F, 5' CTCTCCAGGGAAGACTTGG 3' e MC1R/INT-R, 5' GGACATCTCTGAAGGTATG 3' (Figura 3.1.2).

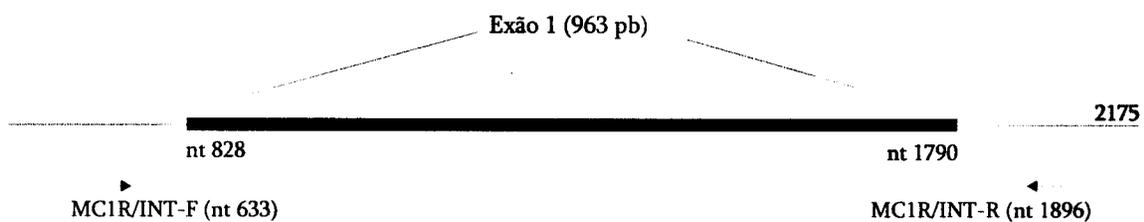


Figura 3.1.2 Esquema do gene *MC1R* com indicação do local onde foram desenhados os *primers*. A numeração dos nucleótidos está de acordo com a sequência de referência do *GenBank* AF326520; nt, nucleótido; pb, pares de bases.

A reacção de PCR (reacção da polimerase em cadeia) foi realizada num volume total de 14 μ l contendo 100ng de DNA, tampão de reacção 1 x (Ecogen, Barcelona, Espanha), 0,3 μ M de cada *primer*, 1,7 mM de $MgCl_2$, 500 μ M de cada dNTP, 1,0 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido, SIGMA) e 1 U de *Taq* polimerase (Ecogen). O perfil da reacção de PCR consistiu numa desnaturação inicial de 6 min a 94 °C, seguida de 40 ciclos de 40 s a 94 °C, 1 min a 55 °C e 1 min a 72 °C; a extensão final foi de 7 min a 72 °C. Os produtos do PCR foram purificados por limpeza com etanol e sequenciados por electroforese capilar num ABI PRISM 310 *genetic analyzer* (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA). As sequências obtidas, com

1106 pb, foram alinhadas e comparadas com a sequência de referência AF326520 utilizando o programa BIOEDIT v5.0.9 (Hall, 1999). Quando não foi possível determinar a fase dos haplótipos utilizou-se o programa PHASE v2.1 (Stephens *et al.*, 2001, 2003). A relação entre os haplótipos encontrados neste estudo foi representada através de uma rede, construída de acordo com o algoritmo *Median-Joining* delineado por Bandelt *et al.* (1999) e utilizando para o efeito o programa NETWORK 4.1.0 (Röhl 2000).

Resultados

Num total de 66 sequências analisadas foram encontrados cinco – $MC1R*1$ (E^+), $MC1R*2$ (E^{D1}), $MC1R*3$ (E^{D2}) e $MC1R*6$ (E^p e e^{pb}) – dos oito alelos já identificados no gene $MC1R$ (Tabela I), não tendo sido detectado nenhum novo alelo no que respeita à região codificante. No entanto, em todas as sequências obtidas neste trabalho observou-se uma posição (nt 833, no segundo codão da proteína), diferente da sequência de referência. Esta substituição corresponderia a uma mutação sinónima (substituição de uma citosina por uma timina na terceira posição do codão). O facto de esta mutação ter sido encontrada em todas as sequências, independentemente do alelo, levanta a hipótese de se tratar de um erro presente na sequência de referência. Nas regiões intrónicas encontraram-se 4 novos SNPs, (polimorfismos nucleotídicos simples) tratando-se de duas transições nos nucleótidos 759 e 802, uma transversão na posição 810 e uma deleção na transição entre o exão 1 e o intrão 2. Como não foi possível determinar por comparação as posições nucleotídicas na zona dos intrões, uma vez que não estão disponíveis sequências de referência completas para os diferentes alelos, a fase dos haplótipos foi estimada através da utilização do programa PHASE v2.1 (Stephens *et al.*, 2001, 2003). Esta análise determinou com probabilidade de 1,0 que a variação das posições intrónicas 759, 802 e 1797 pertence ao alelo E^{D1} , podendo assim assumir-se que este alelo possui uma adenina, uma timina e uma deleção nos referidos nucleótidos, respectivamente. A transversão da posição 810 foi encontrada apenas

num porco Bísaro, sendo este animal heterozigótico E^P/E^{D1} . Uma vez que não foi possível determinar com confiança qual dos dois alelos possui este polimorfismo ($P=0,51$), optou-se por representá-lo em dois haplótipos distintos, E^P*b e $E^{D1}*b$ (Tabela I).

Tabela I Alelos encontrados para o gene *MC1R* no javali e nas duas raças suínas autóctones portuguesas. O número de cromossomas, em que se detectou cada haplótipo encontra-se entre parêntesis. A numeração dos codões (a negrito) e das posições nucleotídicas está de acordo com a sequência de referência do *MC1R*. Não foi possível determinar com confiança a que alelo pertence a transverso indicada por M (A ou C), pelo que se optou por representá-la nos dois alelos E^P*b e $E^{D1}*b$. A região codificante do gene corresponde na tabela à área preenchida a cinzento.

Alelo (n)	Codões / posições nucleotídicas											
	759	802	810	833	878	895	1110	1132	1190	1197	1556	1797
AF326520 - E^r	A	T	C	C	G	--	G	T	T	G	G	A
E^r (29)	G	C	.	T
e^{lb} (5)	G	C	.	T	.	CC
E^P (14)	G	C	.	T	.	CC	.	.	.	A	.	.
E^{D2} (14)	G	C	.	T	A	.	.
E^{D1} (3)	.	.	.	T	A	.	A	C	C	.	A	.
E^P*b	G	C	M	T	.	CC	.	.	.	A	.	.
$E^{D1}*b$.	.	M	T	A	.	A	C	C	.	A	.

No presente trabalho, foram detectados os alelos E^{D1} (*MC1R*2*), E^{D2} e E^P na raça Bísara, os alelos E^{D2} , E^P e e^{lb} na raça Alentejana e os alelos E^r e e^{lb} nos javalis, com as frequências indicadas na Tabela II. O alelo e^{lb} foi encontrado apenas num javali, em heterozigotia com o alelo E^r .

Tabela II Frequências alélicas encontradas nos javalis e nas raças domésticas portuguesas para o gene *MC1R*.

	<i>MC1R*1</i> E^r	<i>MC1R*2</i> E^{D1}	<i>MC1R*3</i> E^{D2}	<i>MC1R*6</i> E^P	<i>MC1R*6</i> e^{lb}
Javali	0,967	-	-	-	0,033
Bísaro	-	0,222	0,556	0,222	-
Alentejano	-	-	0,222	0,556	0,222

Pela análise da Tabela II pode observar-se que o alelo presente na raça Bísara com uma frequência mais elevada é o E^{D2} e na raça Alentejana o E^P . O alelo presumivelmente de origem ibérica, o e^{lb} , foi apenas encontrado no Porco Alentejano. Na Figura 3.1.3 está representada a rede de haplótipos construída de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

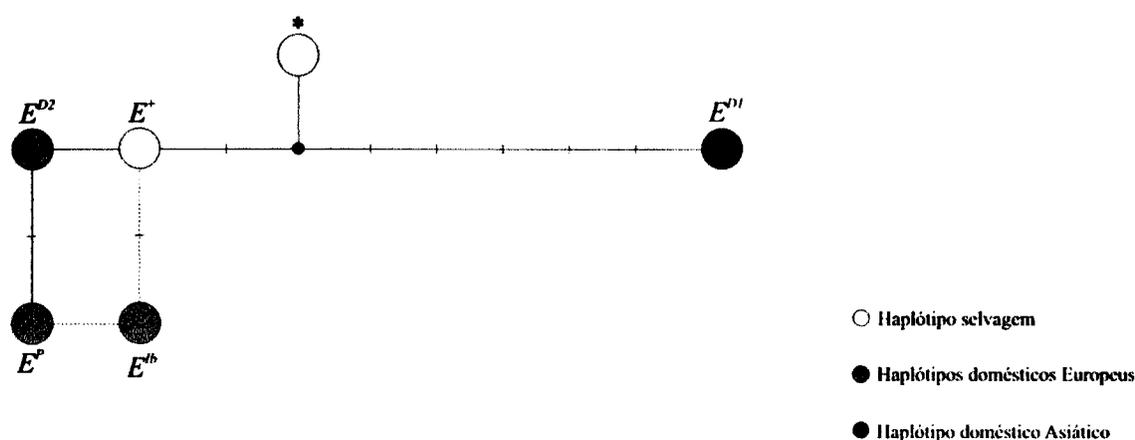


Figura 3.1.3 Rede de haplótipos construída de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho para o gene *MC1R*. A sequência de referência do *GenBank* está assinalada com um asterisco.

Discussão

Variabilidade alélica do MC1R

De uma forma geral, as raças domésticas de suínos apresentam padrões fenotípicos uniformes que as permitem distinguir de outras raças e atestar para a sua origem, sendo a cor da pelagem uma das características mais utilizadas para o fazer (Andersson, 2003; Klungland e Våge, 2003). Produtores e consumidores têm interesse na comercialização de produtos de qualidade e demarcados por certificados de origem, sendo para isso essencial encontrar marcadores genéticos capazes de atestar a “pureza” de uma determinada raça. A uniformidade fenotípica intra-raças traduz-se, muitas vezes, numa uniformidade genotípica, pelo que é frequentemente possível associar a uma determinada raça um genótipo particular. No que respeita ao *MC1R*, por exemplo, raças como a Piétrain, a Hampshire ou a Large Black caracterizam-se pela presença, em homozigotia, dos alelos E^P , E^{D2} e E^{D1} , respectivamente (Kijas *et al.*, 1998, 2001). No entanto, isto não significa que cada raça possui um alelo único, pois os mesmos alelos são partilhados por diversas raças, um indicativo de que as mesmas mutações foram disseminadas por migração

entre raças ou constituem polimorfismos ancestrais seleccionados durante a domesticação (Marklund *et al.*, 1996).

As raças suínas portuguesas, demonstraram, neste trabalho, apresentar uma série de alelos responsáveis por diferentes fenótipos. A raça Bísara, talvez devido aos inúmeros cruzamentos que sofreu com diversas raças exóticas durante décadas, apresenta hoje em dia uma grande variedade genotípica e fenotípica (Ramos *et al.*, 2003). Os alelos E^{D1} e E^{D2} , presentes nesta raça, são responsáveis pela pelagem preta uniforme que se pode observar em alguns animais e o alelo E^P está também de acordo com o fenótipo malhado. No entanto, considerando que este é o fenótipo que mais se observa nestes animais, seria de esperar a presença deste último alelo numa frequência mais elevada. O alelo E^{D1} foi detectado neste estudo pela primeira vez com uma frequência de 0,222 e a sua presença no porco Bísaro pode resultar do cruzamento com a raça Large Black, uma vez que este alelo se encontra fixado nesta raça. Os alelos E^{D2} e E^P tinham sido já detectados nesta raça em trabalhos anteriores, numa frequência muito elevada (0,99) (Ramos *et al.*, 2003), mas os autores não determinaram qual dos dois alelos, ou mesmo se ambos, estavam presentes, uma vez que o SNP presente no codão 124 (ver Figura 3.1.1) é comum aos dois alelos. Na raça Bísara tinham também sido já encontrados anteriormente os alelos e e E^r (Ramos *et al.*, 2003), o que não aconteceu neste trabalho talvez devido a uma menor amostragem. A presença destes dois alelos é relativamente inesperada uma vez que o primeiro é característico da pelagem vermelha que o porco Bísaro não apresenta. No entanto, embora este alelo possa ter sido introduzido pela raça Duroc, não há registos que atestem para o cruzamento entre estas raças (Miranda do Vale, 1949). Quanto ao alelo E^r , os autores não fazem a distinção entre este e o alelo e^{lb} , não sendo possível avaliar se o alelo em questão é de origem selvagem ou doméstica (Ramos *et al.*, 2003).

Tendo em consideração a pigmentação preta ardósia característica da raça Alentejana e a forte selecção a que tem sido sujeita para conservar este fenótipo, não era esperada uma diversidade alélica tão elevada como a que foi encontrada (alelos E^{D2} , E^P e e^{lb}). Pelo mesmo motivo, é também pouco esperado que o alelo

observado com maior frequência tenha sido o E^p . A presença deste e do alelo e^{lb} em homozigotia pode originar animais brancos ou vermelhos, o que poderá estar de acordo com o facto de alguns animais apresentarem uma pigmentação mais avermelhada, apelidada de variedade Ervideira ou ruiva. No entanto, é também importante considerar que a expressão fenotípica deste alelo é muito variável, podendo ir desde pelagens vermelhas uniformes, manchadas ou mesmo quase pretas. Por outro lado, os cruzamentos sofridos com as raças Yorkshire, Berkshire e sobretudo com a raça Landrace (Frazão, 1984), podem estar na origem do alelo E^p no porco Alentejano. O alelo e^{lb} foi encontrado pela primeira vez na raça Ibérica Espanhola, tendo sido por isso apelidado de ibérico. A sua presença na raça Alentejana suporta a relação que existe entre estas duas raças, uma vez que duas variedades ancestrais de porco Alentejano estiveram na origem do porco Ibérico (Rodrigañez *et al.*, 2000; Toro *et al.*, 2000; Carrión *et al.*, 2003). Ramos e colaboradores (2003) observaram ainda nesta raça os alelos E^{D1} e E^r . Não é clara a origem do alelo E^{D1} , já que os registos dos cruzamentos desta raça não mencionam a utilização de animais provenientes da Ásia ou da raça Large Black. Em relação ao alelo E^r , pelo mesmo motivo invocado anteriormente, não foi possível determinar se de facto foi observado este ou o alelo e^{lb} . Embora fosse de esperar uma frequência mais elevada do alelo E^{D2} , a sua presença está de acordo com o fenótipo característico da raça Alentejana.

Relativamente ao javali, o alelo encontrado ($MC1R^*1/E^r$) é característico das populações selvagens da Europa, sendo este alelo partilhado por animais provenientes de Portugal, Espanha e França. Este não é um facto inesperado, uma vez que se trata de uma região codificante e uma mutação nesta região pode implicar drásticas alterações do fenótipo, que possivelmente teriam menos sucesso na natureza. Dos 15 javalis analisados, apenas um indivíduo proveniente de Espanha tem provavelmente uma origem híbrida, sendo este animal heterozigótico E^r/e^{lb} . Nas raças suínas Bísara e Alentejana não foi detectado o alelo típico dos animais selvagens (E^r).

A origem do alelo e^b

O alelo *e^b* partilha uma mutação *frameshift* com o alelo *E^p*, mas não a mutação do codão 124, que por sua vez é partilhada com o alelo *E^{d2}*. Carrión e colaboradores (2003) classificam-no como um novo alelo de origem ibérica, o que implicaria que tivesse ocorrido uma mutação de novo nas posições 895 ou 1197 (ver Tabela I e Figura 3.1.3). Uma alternativa a esta explicação seria o alelo *e^b* ser fruto de recombinação entre os alelos *E^p* e *E^r*. Esta hipótese não implica a ocorrência de um mesmo evento mutacional duas vezes (a inserção de duas citosinas no codão 22, ou a transição G/A na primeira base do codão 124), o que tem uma probabilidade relativamente baixa de acontecer, ainda mais reforçado pelo facto de se tratar de uma região codificante. No entanto, apenas com os dados apresentados neste estudo não é possível determinar com certeza a possibilidade de se tratar de recombinação entre estes dois alelos, pelo que, esta hipótese teria de ser confirmada através da sequenciação mais alargada à região 3' do intrão.

Este trabalho faz uma primeira abordagem na caracterização genética das raças suínas portuguesas através da sequenciação de um dos genes da cor da pelagem mais importantes, o *MC1R*. Este gene tem sido exaustivamente estudado em inúmeras raças suínas Europeias, estando quase todas descritas do ponto de vista deste marcador. Estes estudos, para além de promoverem o conhecimento acerca das raças suínas, permitem entender os mecanismos moleculares e evolutivos associados ao *MC1R* e possibilitam aos criadores utilizar uma ferramenta no sentido de os ajudar a efectuar cruzamentos controlados e direccionados ao melhoramento genético dos seus animais.

Referências bibliográficas

- Andersson L (2003) Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig and chicken. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **994**, 313-318.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
- Carrión D, Day A, Evans G, Mitsuhashi T, Archibald A, Haley C, Andersson L, Plastow G (2003) The use of *MC1R* and *KIT* genotypes for breed characterisation. *Archivos de Zootecnia*, **52**, 237-244.
- Frazão TL (1984) O porco Alentejano melhorado. Boletim Pecuário – Ano L.
- Geschwind II (1966) Change in hair color in mice induced by injection of alpha-MSH. *Endocrinology*, **79**, 1165-1167.
- Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon JT, Andersson L (2000) The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, **154**, 1785-1791.
- Gustafsson AC, Kijas JMH, Alderborn A, Uhlén M, Andersson L, Lundeberg J (2001) Screening and scanning of single nucleotide polymorphisms in the pig melanocortin 1 receptor gene (*MC1R*) by pyrosequencing. *Animal Biotechnology*, **12**, 145-153.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98.
- Jackson IJ (1994) Molecular and development genetics of mouse coat color. *Annual Review of Genetics*, **28**, 189-217.
- Jackson IJ (1997) Homologous pigmentation in human, mouse and other model organisms. *Human Molecular Genetics*, **6**, 1613-1624.
- Kijas JMH, Moller M, Plastow G, Andersson L (2001) A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*, **158**, 779-785.
- Kijas JMH, Wales R, Törnsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L (1998) Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, **150**, 1177-1185.

- Klungland H, Våge DI (2003) Pigmentary switches in domestic animal species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **994**, 331-338.
- Klungland H, Våge DI, Gomez-Raya L, Adalsteinsson S, Lien S (1995) The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome*, **6**, 636-639.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocytes-stimulating-hormone receptor. *Nature*, **371**, 799-802.
- Marklund L, Johansson Moller M, Sandberg K, Andersson L (1996) A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*, **7**, 895-899.
- Marklund S, Kijas J, Rodriguez-Martinez H, Rönnstrand L, Funa K, Moller M, Lange D, Edfors-Lilja I, Andersson L (1998) Molecular basis for the dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Research*, **8**, 826-833.
- Mayer TC, Green MC (1968) An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and Sl loci in mice. *Development Biology*, **18**, 62-75.
- Miranda do Vale J (1949) *Gado Bissulco. Suínos, Bovinos, Arietinos e Caprinos*. Livraria Sá da Costa, Lisboa.
- Prota G (1992) *Melanins and Melanogenesis*. San Diego, CA: Academic Press.
- Ramos AM, Mestre R, Gouveia S, Evans G, Zhang Y, Cardoso A, Rothschild MF, Plastow G, Rangel-Figueiredo T (2003) Use of type I DNA markers for initial genetic characterization of two Portuguese swine breeds. *Archivos de Zootecnia*, **52**, 255-264.
- Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L, Baack E, Mountjoy KG, Cone RD (1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, **72**, 827-834.
- Rodríguez J, Toro MA, Rodríguez C, Silió L (2000) Alleles survival from Portuguese and Spanish strains in a population of Iberian pig. In: *Tradition*

and innovation in Mediterranean pig production. JA Afonso & JL Tirapicos Eds., pp. 57-61, CIHEAM-EU, Zaragoza.

Röhl A (2000) Network: Fluxus Technology Ltd., Clare, UK.

Sambrook E, Fritsch F, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.

Silvers WK ed. (1979) *The Coat Colors of Mice. A Model for Mammalian Gene Action and Interaction*. New York: Springer-Verlag.

Stephens M, Donnelly P (2003) A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, **73**, 1162-1169.

Stephens M, Smith N, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, **68**, 978-989.

Takeuchi S, Suzuki H, Yabuuchi M, Takahashi S (1997) A possible involvement of melanocortin 1-receptor in regulating feather color pigmentation in the chicken. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1308**, 164-168.

Toro MA, Rodrigañez J, Silió L, Rodríguez C (2000) Genealogical analysis of a close herd of Black hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*, **14**, 1843-1851.

The Portuguese Bísaro pig with belt-like phenotype has not the Belt allele at the *Dominant White (I/KIT)* locus

ÍRIS PINHEIRO^{1,2} and RAQUEL GODINHO¹

¹CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, Universidade do Porto, Campus Agrário de Vairão, 4485-661 Vairão, Portugal ²Departamento de Zoologia e Antropologia, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto 4099-002 Porto, Portugal.

Summary

The presence of two mutations at the *Dominant White (I/KIT)* locus was investigated by PCR-RFLP analysis in the Bísaro, a Portuguese autochthonous pig breed. The *Belt* allele (*I^{bc}*) holds a single nucleotide polymorphism at nucleotide 2678 in exon 19 and it's characteristic of Hampshire pigs. The *I* allele, responsible for the dominant white phenotype, is associated with a duplication of the entire *KIT* coding sequence and additionally has a splice mutation at the first nucleotide of intron 17 in one of the two *KIT* copies. Bísaro pigs have, among a wide variety of phenotypes, a white belt against a black coat color, but, in a total of 54 animals analysed, we did not detected the *I^{bc}* allele. The splice mutation associated with the white phenotype was found at a low frequency in this breed. This finding is consistent with previous studies and with a dominant white phenotype identified in some animals. However, this same allele was also observed in some spotted pigs. The Alentejano, another Portuguese autochthonous pig breed doesn't have any of these mutations, a sign of the strong selection for black coat color.

Introduction

The *KIT* gene encodes the mast/stem cell growth factor receptor and it's responsible for the dominant white phenotype in mice, horses and pigs (PULOS and HUTT 1969; NOCKA et al. 1990; JOHANSSON et al. 1992). A functional *KIT* expression is needed for normal migration and survival of neural crest-derived melanocytes precursors, and when inactivated leads to a lack of melanocytes in the skin (MAYER and GREEN 1968). Mutations in this gene can be lethal when homozygous, as for example in mice and horses, and exhibit several pleiotropic effects on melanocytes development, haematopoiesis and gametogenesis (JACKSON 1994; BARSH 1996). In pigs, the allele responsible for the dominant white phenotype has a more severe effect on pigmentation than in mouse, but it's completely viable and fertile when homozygous. However, animals carrying two copies of this allele show a reduced number of white blood cells (MARKLUND et al. 1998).

At least six different alleles at the *Dominant White (I/KIT)* locus were identified so far: the recessive wild type allele (*i*) for normal color, present in wild boars and colored breeds; the *Belt (I^{Bc})* allele responsible for a white belt across the shoulders and front legs against a black coat color, in Hampshire pigs; the *Dominant White (I)* allele, which has two more variants, causing a fully dominant white color in Landrace and Large White breeds and finally, the semidominant *Patch (P)* allele responsible for the patch phenotype, in which white and colored patches are separated by sharp borders (JOHANSSON MOLLER et al. 1996; MARKLUND et al. 1998; GIUFFRA et al. 1999). Both *I* and *P* alleles are associated with a duplication of about 450 Kb that includes the entire coding sequence of *KIT*. Additionally, the *I* allele holds a splice mutation (a G to A substitution) in the first nucleotide of intron 17 in one of the two *KIT* copies that leads to skipping of exon 17 (JOHANSSON MOLLER et al. 1996; MARKLUND et al. 1998; GIUFFRA et al. 2002).

The duplication is a regulatory mutation that affects expression of one or both copies of *KIT*, which consequently disturbs migration of melanocytes precursors. The splice mutation is a structural mutation that causes a receptor with impaired or absent tyrosine kinase activity (MARKLUND et al. 1998). The *I* allele has two more documented variants, *F* and *F*², which are associated with a triplication of the gene, showing one and two splice sites in one and two of the three *KIT* copies, respectively. *KIT* alleles with the duplication are therefore genetically unstable, and new alleles can be generated by unequal crossing over (PIELBERG et al. 2002). In Europe, the selective breeding for white coat color in commercial pig breeding is known since medieval times (WISEMAN 1986). Therefore, this mutation is nowadays spread throughout several European breeds due to this strong selection and for example, in Landrace and Large White breeds, pigs with pigmented spots are usually eliminated from breeding (PIELBERG et al. 2002).

The *Belt* allele does not contain the duplication or the splice mutation, and so far it was only identified in Hampshire pigs (MARKLUND et al. 1998; GIUFFRA et al. 1999). This allele carries a single nucleotide polymorphism (SNP) at position 2678 of exon 19 (a T to C substitution), but the entire coding sequence did not revealed a causative mutation for the belt phenotype, suggesting that it is probably due to a regulatory mutation (GIUFFRA et al. 1999).

The Bísaro pig is an autochthonous Portuguese breed, with historical records attesting for the existence of two ancient varieties, Galega and Beiroa, with white and black coat colors, respectively (REIS 2003). However, intensive crossbreeding with imported breeds has shaped the present day phenotype of Bísaro (RAMOS et al. 2003). Nowadays, among a wide variety of phenotypes, Bísaro pigs also have a white phenotype and a belt-like phenotype, in which animals exhibit a white belt across the shoulders and front legs against a black coat color. However, the majority of the animals have a spotted phenotype different from the patch, as they show irregular black spots against a white coat color.

In this work we investigated the presence of the mutation associated with the belt phenotype in the Bísaro pig, as well as the splice mutation present at the

Dominant White allele in animals with white phenotype. The Alentejano pig, a second autochthonous Portuguese breed that is characterized by a solid black coat color with red hair, and a few wild boars, were used as controls since they are not expected to have these two mutations.

Materials and Methods

Tissue and blood samples were collected from 54 Bísaros comprising different phenotypes: white belt against black color (12) (Fig. 1), spotted (15), almost entirely white (8) and 19 animals with unknown phenotype. Seven Alentejanos and 4 wild boars were also sampled to use as controls. DNA was extracted using standard protocols (SAMBROOK et al. 1989).



Fig. 1. Female of Bísaro breed with belt phenotype. Note that the white belt can vary in size (photography kindly provided by João Santos e Silva, Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho, Portugal)

Two fragments of the *KIT* gene were amplified by PCR (polymerase chain reaction). To test the presence of the SNP at nt (nucleotide) 2678 in exon 19, a fragment of 99-bp covering 60-bp of the 3' end of exon 19 and 39-bp of intron 19 was amplified with primers KIT-19F (5' CTA CAA GAT GAT CAA GGA GG 3') (AJ223231 nt 2625-2644) and KIT-H56R (5' GCG GAA ACA TCA TGC GAA GG 3') (adapted from primer KIT56 described by MARKLUND et al. 1998). A 175-bp fragment comprising the boundary between exon 17 and intron 17 of this same gene was amplified with primers KIT21 and KIT35 (MARKLUND et al. 1998). PCRs

were carried out in a 13 µl volume containing 100 ng of genomic DNA, 1x reaction buffer (Ecogen, Barcelona, Spain), 1.5 mM MgCl₂, 300 µM of each dNTP, 0.3 µM of each primer and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Ecogen). Thermocycling conditions were: 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 40 s, 56 °C (first fragment) and 62 °C (second fragment) for 45 s, and 72 °C for 40 s, with a final extension of 72 °C for 5 min.

Both fragments were analysed by PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) tests described by MARKLUND et al. (1998). The T to C substitution at nt 2678 in exon 19 was digested with the restriction endonuclease *Acl*I (New England BioLabs Inc.), which cuts once in the *Bel*t allele. The G to A splice site mutation in the first nucleotide of intron 17 was analysed using endonuclease *Nla*III (New England BioLabs Inc.), which cuts once in the normal form and twice in the splice mutant form. Five microliters of PCR products were digested in a 10 µl volume containing 1 x reaction buffer and 2 U of restriction enzyme. Both fragments were digested for 3 hours at 37 °C. Restriction fragments were separated by electrophoresis on a T10C5 native polyacrylamide gel and visualised by silver staining according to the manufacturer's instructions (Promega Corporation, Madison, WI, USA). To confirm the patterns obtained by electrophoresis, PCR fragments of exons 19 and 17 were sequenced in two and five Bísaro pigs, respectively. Sequences were obtained on an ABI PRISM 310 DNA sequencer, using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions, and were aligned with BIOEDIT 5.0.9 (HALL 1999).

Results

The results obtained for the T to C substitution at nucleotide 2678 of exon 19, and for the splice mutation at the first nucleotide of intron 17 are summarized in Table 1. In this table we have divided the Bísaro pigs in three phenotypic categories, in order to show a possible relationship between phenotype and genotype. In a

fourth category the phenotype of the animals is unknown. Among the 54 Bísaro pig samples analysed, and despite their color phenotype, we did not observed the characteristic allele of Hampshire pigs and responsible for the belt phenotype (I^{Bc}), not even when the animals clearly show a belt-like phenotype as depicted in Fig. 1. Within the phenotypic classes determined for the Bísaro pigs, all the white pigs are heterozygous for the splice mutation at intron 17, characteristic of the *Dominant White* allele (I). This mutation was not detected in the animals that show the belt-like phenotype, but it was observed in heterozygosity in two and three animals with spotted and unknown phenotypes, respectively.

As expected, given their colored phenotype, none of these mutations were detected in the Alentejano breed or in wild boars. Sequencing results fully confirm the patterns found by PCR/RFLP.

Table 1 *KIT* results for SNPs at exon 19 and intron 17 in Bísaro pigs, with three discriminated classes of phenotypes, Alentejano pigs and wild boars.

Samples	Phenotype	<i>n</i>	Exon 19 (T/C nt 2678)	Intron 17 (G/A splice mutation)
Bísaros	Belt	12	ND ¹	ND
	White	8	ND	8/16 (<i>f</i> = 0.500)
	Spotted	15	ND	2/30 (<i>f</i> = 0.067)
	Unknown	19	ND	3/38 (<i>f</i> = 0.079)
	Total	54	ND	13/108 (<i>f</i> = 0.120)
Alentejanos	Black	7	ND	ND
Wild boars	Wild	4	ND	ND

¹Not detected.

Discussion

Hampshire pigs carry a unique allele (I^{Bc}) responsible for their phenotype, a white belt against a solid black coat color (MARKLUND et al. 1998; GIUFFRA et al. 1999). This phenotype is likely to be caused by a regulatory mutation, instead of a structural mutation, but the I^{Bc} allele possesses a single nucleotide polymorphism at position 2678 in exon 19, which distinguishes it from the other alleles (GIUFFRA

et al. 1999). This SNP was not detected in our survey, indicating that this phenotype is genetically heterogeneous, a fact already questioned by GIUFFRÀ and co-workers (1999). However, this analysis should be extended to the complete sequence of the *KIT* gene. We cannot exclude the possibility that the allele found in Bísaro pigs can be identical to *i* or *P* alleles, which do not have the splice mutation or the SNP at exon 19. Another possibility would be that the *Belt* allele is not fully responsible for the belt phenotype, and other genes might be involved. There are numerous breeds in Europe with belt-like phenotype, such as Saddleback, Wessex, Essex or Cinta Senese, and even some Chinese pig breeds. It could be interesting to investigate if they carry the same mutation as *Belt* in Hampshire or if they have different alleles, and in this way try to recognize if any of these breeds is on the origin of this phenotype in the Bísaro pigs.

The presence of the splice mutation at intron 17, characteristic of *I* allele and responsible for the dominant white phenotype, was detected at a lower frequency than in previous studies (RAMOS et al. 2003), and no homozygous animals were found. Individuals with the splice mutation were in fact almost white. Nevertheless, the action of the *Dominant White* allele appears not to be always fully dominant, since some animals carry small-pigmented areas as it was stated in previous works (MARKLUND et al. 1998), or can actually be spotted as we show in this study. This pattern was already described in horses (MAU et al. 2004) and, according to MARKLUND and collaborators (1998), the presence of pigmented spots in *I/i* heterozygotes but not in *I/I* homozygotes implies a more severe *KIT* dysfunction in the developing melanoblasts of *I/I* animals. Several Bísaro pigs show large spotted areas and we do not know if this pattern is caused by the *Patch* (*P*) allele. Although we cannot exclude this hypothesis, the present study also doesn't confirm it. The Bísaro pig was extensively crossed with breeds such as Large White and Piétrain in the last thirty years (RAMOS et al. 2003), a fact which can justify the presence of *I* and *P* alleles in this breed.

The second Portuguese pig breed, Alentejano, probably carries the *i* allele, which is in accordance with its phenotype. Even though with a smaller sample

size, this study confirms previous works and the results are in accordance with the strong selection for black coat color that affects this breed (RAMOS et al. 2003).

Detection of the *Dominant White* allele is of great importance in pig industry, given its associated negative effects on hematopoiesis when present in homozygosity (*I/I*) (MARKLUND et al. 1998). Thus, this study provides new insights on the efforts that have been made in the last few years in order to improve Bísaro breed in Portugal, since it was almost extinct. Furthermore, it represents an important tool to detect signs of crossbreeding with breeds like Large White or Landrace, as these breeds carry the *I* allele (MARKLUND et al. 1998; CARRIÓN et al. 2003). Loci such as *Extension/MC1R* or *Agouti* also play a significant role in pigment synthesis, and we are currently studying the variation at the first locus in the two Portuguese pig breeds, aiming to understand what sort of genetic patterns are on the basis of their phenotypes.

Acknowledgments

We thank to Pedro Santos and Christian Gortázar for providing samples from wild boar, and to João Santos e Silva from DRAEM (Direcção Regional de Agricultura de Entre Douro e Minho) and to ANCPA (Associação Nacional dos Criadores de Porco de Raça Alentejana) – Estação Zootécnica Nacional (Portugal) – for providing samples from Bísaro and Alentejano pigs, respectively.

References

- BARSH, G. S., 1996: The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends Genet.* **12**: 299-305.
- CARRIÓN, D.; DAY, A.; EVANS, G.; MITSUHASHI, T.; ARCHIBALD, A.; HALEY, C.; ANDERSSON, L.; PLASTOW, G., 2003: The use of *MC1R* and *KIT* genotypes for breed characterisation. *Arch. Zootec.* **52**: 237-244.

- GIUFFRA, E.; EVANS, G.; TÖRNSTEN, A.; WALES, R.; DAY, A.; LOOFT, H.; PLASTOW, G.; ANDERSSON, L., 1999: The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant White (*I/KIT*) locus. *Mamm. Genome*. **10**: 1132-1136.
- GIUFFRA, E.; TÖRNSTEN, A.; MARKLUND, S.; BONGCAM-RUDLOFF, E.; CHARDON, P.; KIJAS, J. M. H.; ANDERSON, S. I.; ARCHIBALD, A. L.; ANDERSSON, L., 2002: A large duplication associated with dominant white color in pigs originated by homologous recombination between LINE elements flanking *KIT*. *Mamm. Genome*. **13**: 569-577.
- HALL, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**: 95-98.
- JACKSON, I. J., 1994: Molecular and development genetics of mouse coat color. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 189-217.
- JOHANSSON, M.; ELLEGREN, H.; MARKLUND, L.; GUSTAVSSON, U.; RINGMAR-CEDERBERG, E.; ANDERSSON, K.; EDFORS-LILJA, I.; ANDERSSON, L., 1992: The gene for dominant white color in the pig is closely linked to ALB and PDGFRA on chromosome 8. *Genomics*. **14**: 965-969.
- JOHANSSON MOLLER, M.; CHAUDHARY, R.; HELLMÉN, B.; HOYHEIM, B.; CHOWDHARY, B.; ANDERSSON, L., 1996: Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the *KIT* gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm. Genome*. **7**: 822-830.
- MARKLUND, S.; KIJAS, J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; RÖNNSTRAND, L.; FUNA, K.; MOLLER, M.; LANGE, D.; EDFORS-LILJA, I.; ANDERSSON, L., 1998: Molecular basis for the Dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Research*. **8**: 826-833.
- MAU, C.; PONCET, P. A.; BUCHER, B.; STRANZINGER, G.; RIEDER, S., 2004: Genetic mapping of dominant white (*W*), a homozygous lethal condition in the horse (*Equus caballus*). *J. Anim. Breed. Genet.* **121**: 374-383.
- MAYER, T. C.; GREEN, M. C., 1968: An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the *W* and *Sl* loci in mice. *Dev. Biol.* **18**: 62-75.
- NOCKA, K.; TAN, J. C.; CHUI, E.; CHU, T. Y.; RAY, P.; TRAKTMAN, P.; BESMER, P., 1990: Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine *c-kit*/white spotting locus: *W⁸⁷*, *W^v*, *W^{a1}*, and *W*. *EMBO J.* **9**: 1805-1813.

-
- PIELBERG, G.; OLSSON, C.; SYVÄNEN, A.-C.; ANDERSSON, L., 2002: Unexpectedly high allelic diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics*. **160**: 305-311.
- PULOS, W. L.; HUTT, F. B., 1969: Lethal dominant white in horses. *J. Hered.* **60**: 59-63.
- RAMOS, A. M.; MESTRE, R.; GOUVEIA, S.; EVANS, G.; ZHANG, Y.; CARDOSO, A.; ROTHSCHILD, M. F.; PLASTOW, G.; RANGEL-FIGUEIREDO, T., 2003: Use of type I DNA markers for initial genetic characterization of two Portuguese swine breeds. *Arch. Zootec.* **52** : 255-264.
- REIS, J., 2003: *Suínos*. (ed. Direcção Geral de Veterinária), ISBN, Portugal.
- SAMBROOK, E.; FRITSCH, F.; MANIATIS, T., 1989: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.
- WISEMAN, J., 1986: *A History of the British Pig*. Ebenezer Baylis & Son Ltd., Worcester, UK.

4. Discussão Geral

4.1 O javali na Península Ibérica

Algumas propriedades do DNA mitocondrial fizeram deste marcador molecular um dos mais utilizados nos últimos anos em estudos filogeográficos: não sofre recombinação, possui uma taxa de mutação elevada e transmite-se unicamente por via materna (Avice, 2000). No entanto, é sempre necessário ter em consideração que os estudos feitos com base nesta molécula contam apenas uma parte da história, que pode não ser coincidente com a das espécies (Ballard e Whitlock, 2004). Na Península Ibérica, o javali tem sido amplamente estudado do ponto de vista ecológico (Abaigar, 1990; Fernández-Llario, 1996; Santos, 2002). No entanto, os estudos genéticos são poucos, podendo destacar-se o trabalho de Alves e colaboradores (2003), onde se faz uma primeira abordagem à filogenia dos javalis Espanhóis e o trabalho de Santos (2002), que faz uma caracterização genética do javali Português com base em marcadores nucleares.

No presente estudo, a sequenciação da região de controlo do DNA mitocondrial, efectuada num total de 138 javalis distribuídos por 17 populações da Península Ibérica e 3 da Europa Central, revelou a existência de 20 haplótipos. Na Figura 4.1.1 pode ver-se o mapa de distribuição dos haplótipos, desenhado de acordo com os resultados que constam da Tabela 2 do Artigo 1. Como se pode observar, a distribuição dos haplótipos é bastante heterogénea, existindo haplótipos amplamente distribuídos, como é o exemplo dos haplótipos H6 e H9, e outros que são privativos de algumas regiões (ex. H12 em Albacete, H18 em Sevilha e H19 nas Astúrias). A grande diversidade que se pode observar no sudeste e noroeste da Península Ibérica é contrastante com a baixa diversidade do sudoeste, nomeadamente em Portugal, onde em 4 locais geográficos relativamente distantes

se encontraram apenas 2 haplótipos (H10 em Reguengos de Monsaraz, Cercal e Vale do Guadiana e H3 no Algarve).

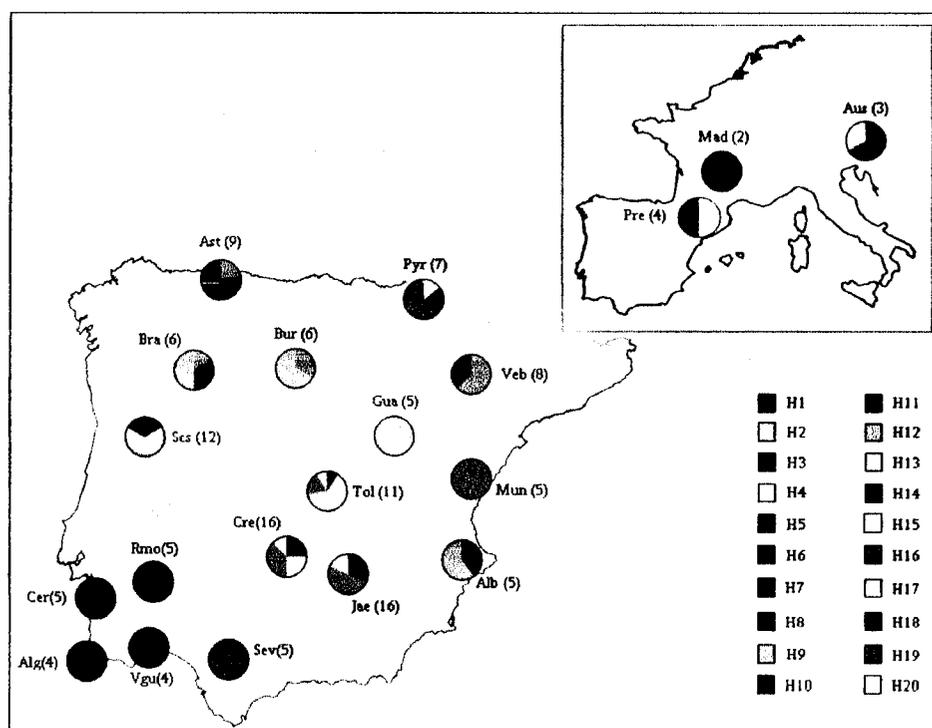


Figura 4.1.1 Mapa de distribuição dos haplótipos mitocondriais nas populações de javali da Península Ibérica e da Europa Central. Entre parênteses indica-se o número de indivíduos sequenciados. Para mais detalhes sobre os locais e os haplótipos ver Artigo 1.

Este facto poderá estar relacionado com a história demográfica do javali na Península Ibérica no início do século XX. Nesta altura, a distribuição do javali em Portugal estava circunscrita às zonas fronteiriças do Gerês, Montesinho, Malcata, S. Mamede, Barrancos e ainda às Serras Algarvias e algumas Tapadas Reais (Bugalho *et al.*, 1984). Actualmente encontra-se distribuído por todo o território (Morais, 1979). É a este facto que provavelmente se deve a baixa diversidade que se observa no sul de Portugal. Após uma acentuada redução demográfica, em que as populações de javali ficaram circunscritas às zonas fronteiriças portuguesas, a rápida expansão para as zonas do litoral poderá ter sido realizada à custa de um reduzido número de indivíduos. Contudo, de uma forma geral, a diversidade haplotípica dos javalis na Península Ibérica é elevada (ver Artigo 1). É ainda provável que as populações de javali tenham sido alvo de translocações e

reintroduções, como é sugerido pela presença do haplótipo H3 em Portugal e no Norte de França.

Relativamente ao DNA mitocondrial estão actualmente descritos dois grandes grupos na Europa, EI e EII, sendo o primeiro formado pelos javalis da Europa Central e o segundo por animais provenientes de Itália. Finalmente, estes dois divergem de um terceiro grupo, o Asiático (Giuffra *et al.*, 2000; Kijas e Andersson, 2001). Este estudo comprova que os javalis Ibéricos pertencem ao primeiro grupo Europeu uma vez que estão filogeneticamente relacionados com javalis provenientes da França e da Áustria (ver Figura 4.1.2 e Artigo 1).

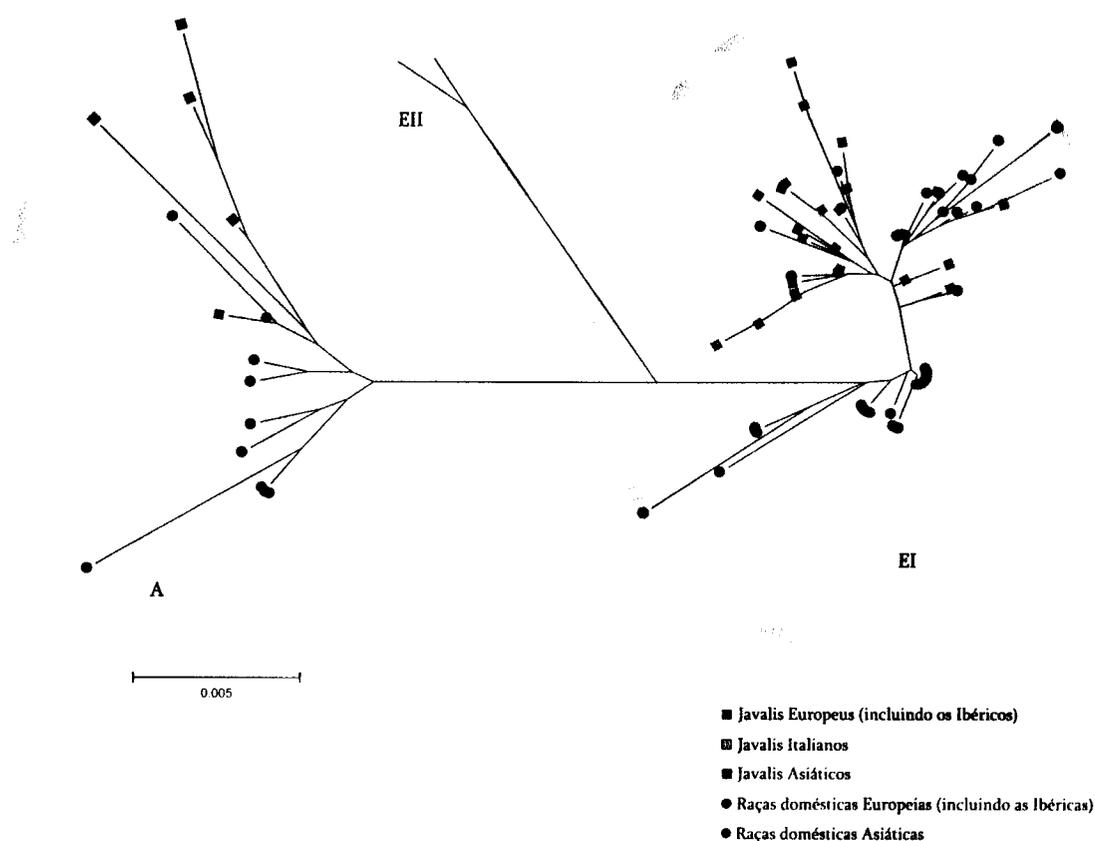


Figura 4.1.2 Dendrograma construído segundo o método de agrupamento *Neighbor-Joining* (Saitou e Nei, 1987) onde se podem ver os três clados mitocondriais previamente definidos (EI, EII e A). A presença de raças domésticas Europeias no clado Asiático deve-se à introgressão de mtDNA Asiático. Às sequências deste estudo foram adicionadas as mesmas sequências disponíveis no *GenBank* que foram utilizadas para construir as *networks* apresentadas no Artigo 1 (para mais detalhes ver Tabela A1 e Figura A1 em anexo). O dendrograma foi construído com base no modelo *Kimura-2-parameter* (Kimura, 1980) no programa MEGA v2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

O facto de as sequências de javali da Áustria ocuparem uma posição central na rede de haplótipos apresentada no Artigo 1 sugere que estes são haplótipos ancestrais, o que levanta a hipótese de os javalis Ibéricos descenderem de animais provenientes desta região. Uma vez que não se encontrou qualquer indicação de que a Península Ibérica tenha servido de refúgio para os javalis durante a última glaciação, é mais um facto que está de acordo com uma recolonização recente a partir da Europa Central. Esta relação próxima entre javalis Ibéricos e da Europa Central é ainda reforçada pelo facto de não se ter encontrado qualquer polimorfismo ao nível dos genes da cor da pelagem, nomeadamente no *MC1R*. Apesar de se tratar de um gene altamente seleccionado, e portanto não ser esperada variação na região codificante, a sua sequência parece ser partilhada por animais de toda a Europa.

4.2 As raças domésticas portuguesas

Nos últimos anos tem havido uma crescente preocupação com a caracterização genética das raças domésticas, nomeadamente com as raças suínas. Segundo a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), existem cerca de 3000 raças domésticas de bovinos, suínos, ovelhas, cabras, cavalos, burros e búfalos, das quais cerca de 23% se encontram actualmente em perigo de desaparecer (FAO, 1995). Segundo as estimativas de alguns autores, só no século XX desapareceram cerca de 600 raças, e muitas outras desaparecerão sem terem sido estudadas ou caracterizadas (Hall e Ruane, 1993; Ruane, 1999). Segundo a classificação da FAO (1992), a raça Bísara encontra-se em perigo de extinção e a Alentejana foi considerada rara. Na Europa existe ainda um grande número de raças suínas tradicionais, mas a sua caracterização genética está longe de estar completa, sendo assim importante proceder ao seu estudo. Actualmente, está em curso um grande projecto Eurasiático que pretende, durante os próximos anos, caracterizar geneticamente inúmeras raças suínas Europeias e Asiáticas, com o objectivo de aprofundar o conhecimento acerca da sua origem e do seu estado e, desta forma

concluir quais necessitam de medidas de conservação adequadas e urgentes (Blott *et al.*, 2003).

Ao nível da região de controlo do DNA mitocondrial, a diversidade haplotípica encontrada nas raças portuguesas é relativamente elevada (Artigo 1). Ambas são detentoras de haplótipos privativos, sendo os alelos Hd1 e Hd7 os mais frequentes nas raças Bísara e Alentejana, respectivamente (Figura 4.2.1). No entanto, embora não tenham sido encontrados alelos comuns, estas raças estão filogeneticamente relacionadas entre si (Figura 2B, Artigo 1). O facto de as raças suínas portuguesas agruparem num mesmo clado com inúmeras raças Europeias, aponta para uma origem materna comum (Figura 2B, Artigo 1).

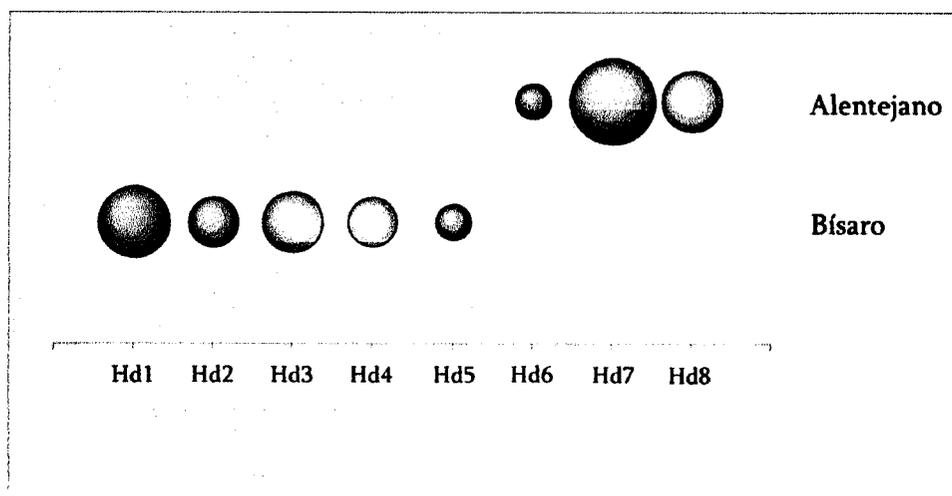


Figura 4.2.1 Frequência dos haplótipos da região de controlo do DNA mitocondrial encontrados para as raças suínas portuguesas. O tamanho dos círculos corresponde à frequência dos haplótipos.

Segundo Bökönyi (1974), as raças Europeias são originárias do Próximo Oriente, tendo chegado à Europa acompanhando as migrações humanas do Neolítico. Recentemente, foi sugerida uma domesticação independente do javali na Europa, a partir de pelo menos duas linhagens distintas (Larson *et al.*, 2005). De acordo com estes autores, a domesticação do javali Europeu ocorreu provavelmente na Alemanha, sendo as actuais raças Europeias descendentes destes animais. No entanto, o presente estudo não permite confirmar esta hipótese.

A elevada diversidade encontrada não só ao nível do DNA mitocondrial, mas também ao nível dos genes da cor da pelagem, sobretudo no porco Bísaro, é compatível com os inúmeros cruzamentos que foram efectuados entre esta raça e raças importadas. Nos genes *MC1R* e *KIT* foram detectados vários alelos, tendo-se encontrado três no primeiro e pelo menos dois no segundo. Esta elevada diversidade alélica está, por um lado, associada aos inúmeros fenótipos de cor da pelagem que esta raça apresenta e por outro, constitui uma confirmação dos cruzamentos que foram efectuados, por exemplo, entre o porco Bísaro e as raças Large White e Large Black. Estes cruzamentos sucessivos podem ter posto em risco a integridade genética do porco Bísaro, sendo actualmente difícil avaliar a “pureza” desta raça e de que forma devem ser direccionados os esforços que visam à sua conservação.

A raça Alentejana apresenta, de uma forma geral, baixos níveis de variabilidade genética, o que está de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores (Ramos *et al.*, 2003). Talvez por ter sido sujeita a uma pressão selectiva mais marcada e também devido ao facto de não ter sofrido cruzamentos tão acentuados como a raça Bísara, o porco Alentejano apresenta uma menor diversidade haplotípica ao nível do DNA mitocondrial. No entanto, embora seja exercida sobre esta raça uma forte selecção no sentido de conservar a sua coloração característica, ao nível do gene *MC1R* foram encontrados diversos alelos, o que é um facto inesperado dado o fenótipo padronizado que caracteriza esta raça. No que se refere ao gene *KIT* não se observaram os alelos *I* e *I^{bc}*. É provável que o alelo presente nesta raça seja o selvagem (*i*), associado às pelagens preta ou vermelha, já que uma mutação neste gene tem efeitos drásticos na pigmentação. Ainda que o porco Alentejano tenha sido cruzado, por exemplo, com a raça Landrace, conhecida por ter pigmentação branca e ser portanto portadora do alelo *Dominant White* (*I*), a selecção por uma pelagem preta não permitiu a fixação deste alelo. No entanto, estes resultados devem ser avaliados com precaução, uma vez que foi analisado um pequeno número de indivíduos da raça Alentejana.

4.3 Os híbridos

A utilização de javalis, ou de animais híbridos para reprodução em cativeiro com porcos domésticos é uma prática comum em Portugal. No presente estudo, apenas se encontraram três haplótipos mitocondriais comuns aos javalis e às raças domésticas Duroc, Alentejana e Ibérica. É possível que estes sejam haplótipos ancestrais e não fruto de hibridação, já que o cruzamento entre fêmeas de javali e machos domésticos é pouco provável. Numa segunda hipótese, também bastante plausível, os javalis portadores dos alelos 3, 8 e 14 poderão ser híbridos, dada a elevada frequência com que se efectuam cruzamentos entre javalis e porcos domésticos em cativeiro de forma deliberada, com posterior libertação ou fuga dos animais (ver Artigo 1). Também ao nível do gene *MC1R* apenas se encontrou um presumível híbrido selvagem, proveniente de Espanha. No entanto, este estudo baseou-se num número reduzido de animais, não sendo com certeza representativo do verdadeiro problema da hibridação. É provável que este problema tenha uma maior expressão, não só em Espanha, como também em Portugal. O alargamento deste estudo a um maior número, tanto de animais como de marcadores genéticos, é fundamental para se poder perceber a sua verdadeira dimensão. Marcadores nucleares do tipo SNP (polimorfismo nucleotídico simples) têm vindo a ganhar terreno nos últimos anos relativamente ao DNA mitocondrial ou aos microssatélites já que, as elevadas taxas de mutação que estes marcadores apresentam estão frequentemente associadas a altos níveis de homoplasia, o que limita a análise dos dados e consequentemente a interpretação dos resultados (Brumfield *et al.*, 2003; Morin *et al.*, 2004). No entanto, o uso de marcadores do tipo SNP, seja com o objectivo de estudar a história evolutiva das populações, seja como ferramenta de diagnóstico na detecção de híbridos, implica primeiro uma procura exaustiva ao longo do genoma e um grande número de SNPs (Morin *et al.*, 2004; Zhang e Hewitt, 2003).

O presente trabalho constitui uma primeira abordagem sobre a variabilidade genética das populações Ibéricas de javali, bem como das raças suínas

autóctones portuguesas. Deve portanto, representar um ponto de partida para estudos futuros que permitam não só compreender melhor as suas origens, como também estabelecer as relações filogenéticas com populações selvagens e domésticas de toda a Eurásia.

5. Referências bibliográficas

- Abaigar T (1990) Características biológicas y ecológicas de una población de jabalíes (*Sus scrofa* L.) en el SE Ibérico. Tese de Doutoramento, Universidade de Navarra, Pamplona.
- Almaça C (1971) Le caractèr particulier de la faune ibérique (vertébrés terrestres). *Bonner Zoologische Beitrage*, **22**, 90-100.
- Alves E, Óvilo C, Rodríguez MC, Silió L (2003) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, **34**, 319-324.
- Andersson L (2001) Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nature Genetics*, **2**, 130-138.
- Andersson L (2003) Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig and chicken. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **994**, 313-318.
- Andersson L, Georges M (2004) Domestic – Animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Genetics*, **5**, 202-212.
- Apollonio M, Randi E, Toso S (1988) The systematics of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Italy. *Bollettino Di Zoologia*, **3**, 213-221.
- Avise JC (2000) *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.

- Ballard JWO, Whitlock MC (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**, 729-744.
- Barsh GS (1996) The genetics of pigmentation: from fancy genes to complex traits. *Trends in Genetics*, **12**, 299-305.
- Blench RM (2000) A history of pigs in Africa. In: *The Origins and Development of African Livestock: archaeology, genetics, linguistics and ethnography*. R. M. Blench & K. C. MacDonald Eds., pp. 355-367, UCL Press, London.
- Blott S, Andersson L, Groenen M, SanCristobal M, Chevalet C, Cardellino R, Li N, Huang L, Li K, Plastow G, Haley C (2003) Characterisation of genetic variation in the pig breeds of China and Europe – the PigBioDiv2 project. *Archivos de Zootecnia*, **52**, 207-217.
- Bökönyi S (1974) *History of Domestic Mammals in Central and Eastern Europe*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Branco M, Monnerot M, Ferrand N, Templeton R (2002) Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed from Nested clade and Mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. *Evolution*, **56**, 792-803.
- Bruford MW, Bradley DG, Luikart G (2003) DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nature*, **4**, 900-910.
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV (2003) The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **18**, 249-256.

Bugalho JF, Carvalho JS, Borges JF (1984) Situation du sanglier au Portugal. *Symposium International sur le Sanglier*. Toulouse, France. *Les Colloques de l'INRA*, **22**, 112-121.

Carrión D, Day A, Evans G, Mitsuhashi T, Archibald A, Haley C, Andersson L, Plastow G (2003) The use of *MC1R* and *KIT* genotypes for breed characterisation. *Archivos de Zootecnia*, **52**, 237-244.

Darwin C (1868) *The variation of animals and plants under domestication*. John Murray Eds., London.

Epstein H, Bichard M (1984) Pig. In: *Evolution of domesticated animals*. I. L. Mason Eds., pp. 145-162, London: Longman.

Fabuel E, Barragán C, Silió L, Rodríguez MC, Toro MA (2004) Analysis of genetic diversity and conservation priorities in Iberian pigs based on microsatellite markers. *Heredity*, **93**, 104-113.

FAO Report (1992) Expert Consultation on the Management of Global Animal Genetic Resources. Rome, 7-10 Abril, 1992.

FAO (1995) World Watch List for Domestic Animal Diversity, 2nd edn. Scherf, B. (ed.), FAO, Rome.

Fernández-Llario P (1996) Ecología del jabalí del Doñana: biología reproductiva e impacto ambiental. Tese de Doutoramento, Universidade da Extremadura, Cáceres.

Frazão TL (1984) O porco Alentejano melhorado. *Boletim Pecuário – Ano L*.

- Genov P (1999) A review of the cranial characteristics of the wild boar (*Sus scrofa* Linnaeus 1758), with systematic conclusions. *Mammal Review*, **29**, 205-238.
- Giuffra E, Evans G, Törnsten A, Wales R, Day A, Looft H, Plastow G, Andersson L (1999) The Belt mutation in pigs is an allele at the Dominant White (*I/KIT*) locus. *Mammalian Genome*, **10**, 1132-1136.
- Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon J-T, Andersson L (2000) The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, **154**, 1785-1791.
- Goulding MJ (2001) Possible genetic sources of free-living wild boar (*Sus scrofa*) in southern England. *Mammal Review*, **31**, 245-248.
- Gustafsson AC, Kijas JMH, Alderborn A, Uhlén M, Andersson L, Lundeberg J (2001) Screening and scanning of single nucleotide polymorphisms in the pig melanocortin 1 receptor gene (*MC1R*) by pyrosequencing. *Animal Biotechnology*, **12**, 145-153.
- Hall SJG, Bradley DG (1995) Conserving livestock breed biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 267-270.
- Hall SJG, Ruane J (1993) Livestock breeds and their conservation – a global overview. *Conservation Biology*, **7**, 815-825.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87-112.

- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Hiendleder S, Mainz K, Plante Y, Lewalski H (1998) Analysis of mitochondrial DNA indicates that domestic sheep are derived from two ancestral maternal sources: no evidence for contributions from urial and argali sheep. *Journal of Heredity*, **89**, 113-120.
- Jackson IJ (1994) Molecular and development genetics of mouse coat color. *Annual Review of Genetics*, **28**, 189-217.
- Johansson M, Ellegren H, Marklund L, Gustavsson U, Ringmar-Cederberg E, Andersson K, Edfors-Lilja I, Andersson L (1992) The gene for dominant white color in the pig is closely linked to ALB and PDGFRA on chromosome 8. *Genomics*, **14**, 965-969.
- Johansson Moller M, Chaudhary R, Hellmén B, Hoyheim B, Chowdhary B, Andersson L (1996) Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the *KIT* gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mammalian Genome*, **7**, 822-830.
- Kijas JMH, Andersson L (2001) A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *Journal of Molecular Evolution*, **52**, 302-308.
- Kijas JMH, Moller M, Plastow G, Andersson L (2001) A frameshift mutation in *MC1R* and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs. *Genetics*, **158**, 779-785.

- Kijas JMH, Wales R, Törnsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L (1998) Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*, **150**, 1177-1185.
- Kim KI, Lee JH, Li K, Zhang YP, Lee SS, Gongora J, Moran C (2002) Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial DNA D-loop sequence polymorphism. *Animal Genetics*, **33**, 19-25.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**, 111-120.
- Klungland H, Våge DI (2003) Pigmentary switches in domestic animal species. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **994**, 331-338.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M (2001) *MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software*. Arizona State University, Tempe, Arizona.
- Larson G, Dobney K, Albarella U, Fang M, Matisoo-Smith E, Robins J, Lowden S, Finlayson H, Brand T, Willerslev E, Rowley-Conwy P, Andersson L, Cooper A (2005) Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, **307**, 1618-1621.
- Loftus RT, MacHugh DE, Bradley DG, Sharp PM, Cunningham P (1994) Evidence for two independent domestications of cattle. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, **91**, 2757-2761.
- Luikart G, Gielly L, Excoffier L, Vigne JD, Bouvet J, Tarbelet P (2001) Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats.

Proceedings of the National Academy of Science of the USA, **98**, 5927-5932.

MacDonald KC (2000) The Origins of African Livestock: indigenous or imported? In: *The Origins and Development of African Livestock: archaeology, genetics, linguistics and ethnography*. R. M. Blench & K. C. MacDonald Eds., pp. 2-17, UCL Press, London.

Marklund S, Kijas J, Rodriguez-Martinez H, Rönnstrand L, Funa K, Moller M, Lange D, Edfors-Lilja I, Andersson L (1998) Molecular basis for the Dominant white phenotype in the domestic pig. *Genome Research*, **8**, 826-833.

Massei G, Genov P (2000) *Il Cinghiale*. Calderini Edagricole, Bologna.

Massei G, Toso S (1993) Biologia e gestione del cinghiale. *INFS, Documenti Tecnici*, **5**.

Matos CAP (2000) Recursos genéticos animais e sistemas de exploração tradicionais em Portugal. *Archivos de Zootecnia*, **49**, 363-383.

Mayer TC, Green MC (1968) An experimental analysis of the pigment defect caused by mutations at the W and Sl loci in mice. *Developmental Biology*, **18**, 62-75.

Miller G (1912) *Catalogue of the mammals of Western Europe*. British Museum of Natural History, London.

Miranda do Vale J (1949) *Gado Bissulco. Suínos, Bovinos, Arietinos e Caprinos*. Livraria Sá da Costa, Lisboa.

- Morais J (1979) *Introdução ao estudo de biologia do javali, Sus scrofa* L. 1758, em *Portugal*. Relatório de Estágio, Universidade Clássica de Lisboa.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK and the SNP workshop group (2004) SNPs in ecology, evolution and conservation. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **19**, 208-216.
- Mundy NI, Kelly J, Theron E, Hawkins K (2003) Evolutionary genetics of the Melanocortin-1 receptor in vertebrates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **994**, 307-312.
- Office National de la Chasse (1988) Notes Techniques: *Le Sanglier*, fiche nº 45. Bulletin Mensuel de l'Office National de La Chasse, nº 123.
- Okumura N, Kurosawa Y, Kobayashi E, Watanobe T, Ishiguro N, Yasue H, Mitsuhashi T (2001) Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*, **32**, 139-147.
- Oliver WLR (1995) Taxonomy and conservation status of the Suiformes – An overview. *IBEX Journal of Mountain Ecology*, **3**, 3-5.
- Oliver WLR, Brisbin IL Jr, Takahashi S (1993) The Eurasian wild pig (*Sus scrofa*). In: *Pigs, Peccaries and Hippos: Status Survey and Action Plan*. W. L. R. Oliver Eds., pp. 112-121, Gland, Switzerland: IUCN.
- Pielberg G, Olsson C, Syvänen A-C, Andersson L (2002) Unexpectedly high allelic diversity at the *KIT* locus causing dominant white color in the domestic pig. *Genetics*, **160**, 305-311.

- Ramos AM, Mestre R, Gouveia S, Evans G, Zhang Y, Cardoso A, Rothschild MF, Plastow G, Rangel-Figueiredo T (2003) Use of type I DNA markers for initial genetic characterization of two Portuguese swine breeds. *Archivos de Zootecnia*, **52**, 255-264.
- Randi E (1995) Conservation genetics of the genus *Sus*. *IBEX Journal of Mountain Ecology*, **3**, 6-12.
- Reis J (1995) *Acerca do porco*. Federação Portuguesa de Associações de Suinicultores Eds., Portugal.
- Reis J (2003) *Suínos*. Direcção Geral de Veterinária Eds., ISBN, Portugal.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 83-109.
- Robins JH, Matisoo-Smith E, Ross HA (2003) The origins of the feral pigs on the Auckland Islands. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, **33**, 561-569.
- Rodrigáñez J, Toro MA, Rodríguez C, Silió L (2000) Alleles survival from Portuguese and Spanish strains in a population of Iberian pig. In: *Tradition and innovation in Mediterranean pig production*. JA Afonso & JL Tirapicos Eds., pp. 57-61, CIHEAM-EU, Zaragoza.
- Ruane J (1999) A critical review of the value of genetic distance studies in conservation of animal genetic resources. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **116**, 317-323.

- Ruvinsky A, Rothschild MF (1998) Systematics and evolution of the pig. In: *The Genetics of the pig*. A Ruvinsky & MF Rothschild Eds., pp. 1-16, CAB International, Oxon, UK.
- Saitou N, Nei M (1987) The Neighbour-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425.
- Santos AP (2002) Critérios para a gestão racional do javali, *Sus scrofa* Linneaus, 1758, em ecossistemas mediterrânicos. Tese de Doutoramento apresentada ao Departamento de Ecologia, Universidade de Évora.
- Serôdio H (1985) *Alguns estudos da biologia do javali (Sus scrofa L. 1758), em Portugal*. Relatório de Estágio, Universidade Clássica de Lisboa.
- Spitz F, Valet G (1991) *Etude démographique des sangliers du Languedoc*. Bulletin Mensuel de l'Office National de La Chasse, nº 159, 28-39.
- Tarbelet P, Bouvet J (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **255**, 195-200.
- Toro MA, Rodrigañez J, Silió L, Rodríguez C (2000) Genealogical analysis of a close herd of Black hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*, **14**, 1843-1851.
- Wilson CJ (2004) Rooting damage to farmland in Dorset, southern England, caused by feral wild boar *Sus scrofa*. *Mammal Review*, **4**, 331-335.
- Wiseman J (1986) *A History of the British Pig*. Ebenezer Baylis & Son Ltd., Worcester, UK.

Zhang D-X, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, **12**, 563-584.

ANEXOS

Tabela A1 Números de acesso do *GenBank* das sequências utilizadas para construir as *networks* do Artigo 1 e as árvores filogenéticas *Neighbor-Joining* das Figuras 4.1.2 e A1.

Código	Animal / Raça	Nº de Acesso do <i>GenBank</i>	Referência*
SWB1	Spanish Wild boar	AY232868	A
SWB2	"	AY232869	A
SWB3	"	AY232870	A
SWB4	"	AY232871	A
SWB5	"	AY232872	A
SWB6	"	AY232873	A
SWB7	"	AY232874	A
Gerwb	German Wild boar	AB059651	B
ItWB1	Italian Wild boar	AB015094	B
ItWB2	"	AB015095	B
S. leu1	Japanese Wild boar (<i>S. s. leucomystax</i>)	AB015084	B
S. leu2	"	AB015085	B
S. leu3	"	AB015086	B
S. riuk2	Ryukyu Wild boar (<i>S. s. riukiuanus</i>)	AB015090	B
H. Man	Hungarian Mangalitza	AY232892	A
Basq	Basque	AY232891	A
SbJa	Spotted Black Jabugo	AY232890	A
Piet1	Piétrain	AY230820	C
Piet2	"	AY232886	A
Piet3	"	AY232887	A
L. Wh1	Large White	AY230822	C
L. Wh2	"	AY232882	A
L. Wh3	"	AY232883	A
Land1	Landrace	AY232884	A
Land2	"	AY232885	A
Hamp	Hampshire	AY429460	D
Welsh	Welsh	AF276937	E
Berk1	Berkshire	AY429459	D
Berk2	"	AF276936	E
York	Yorkshire	AY243481	D
Meis1	Meishan	AY232888	A
Wan	Wan'an	AF276924	E
Dur	Duroc	AY243482	D
Dur1	"	AY232875	A
Dur2	"	AY232876	A
Dur3	"	AY232877	A
Dur4	"	AY232878	A
Dur5	"	AY232879	A
Dur6	"	AY232880	A
Dur7	"	AY232881	A
I.P1	Iberian pigs	AY232842	A
I.P2	"	AY232843	A
I.P3	"	AY232844	A

I.P4	“	AY232845	A
I.P5	“	AY232846	A
I.P6	“	AY232847	A
I.P7	“	AY232848	A
I.P8	“	AY232849	A
I.P9	“	AY232850	A
I.P10	“	AY232851	A
I.P11	“	AY232852	A
I.P12	“	AY232853	A
I.P13	“	AY232854	A
I.P14	“	AY232855	A
I.P15	“	AY232856	A
I.P16	“	AY232857	A
I.P17	“	AY232858	A
I.P18	“	AY232859	A
I.P19	“	AY232860	A
I.P20	“	AY232861	A
I.P21	“	AY232862	A
I.P22	“	AY232863	A
I.P23	“	AY232864	A
I.P24	“	AY232865	A
I.P25	“	AY232866	A
I.P26	“	AY232867	A

*Referências: A, Alves *et al.*, 2003; B, Okumura *et al.*, 2001; C, Yue GH (unpublished); D, Cho *et al.* (unpublished); E, Kim *et al.*, 2002.



Figura A1 Dendrograma construído no programa MEGA v2.1, de acordo com o método de agrupamento *Neighbor-Joining* com base no modelo *Kimura-2-parameter*. Este corresponde ao mesmo dendrograma apresentado na Figura 4.1.2, podendo observar-se detalhes sobre as sequências utilizadas e os haplótipos descritos no presente estudo. Os valores de *bootstrap* (superiores a 50, após 1000 réplicas) encontram-se indicados. Os códigos e respectivos números de acesso das sequências disponíveis no *GenBank* e utilizadas nesta análise encontram-se na Tabela AI em anexo.