



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**ÍTALA MAYARA SILVA ARAÚJO**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM EQUINO BAIXADEIRO  
COM BASE EM DNA MITOCONDRIAL E MARCADORES  
MICROSSATÉLITES**

São Luís  
2016

**ÍTALA MAYARA SILVA ARAÚJO**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM EQUINO BAIXADEIRO  
COM BASE EM DNA MITOCONDRIAL E MARCADORES  
MICROSSATÉLITES MOLECULARES**

Trabalho apresentado ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lígia Tchaicka

São Luís

2016

Araújo, Ítala Mayara Silva

Variabilidade genética em equino Baixadeiro com base em dna mitocondrial e marcadores microssatélites moleculares /Ítala Mayara Silva Araújo – São Luís, 2016.

64 folhas

Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2016.

Orientadora: Prof. Drº Ricardo de Macedo Chaves

1.Cavalo, 2.Marcadores moleculares, 3.Variabilidade, 4.Conservação, 5. Fenótipo, 6. Baixada maranhense.

CDU:636.293.2:616-002.5(812.1)

**ÍTALA MAYARA SILVA ARAÚJO**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM EQUINO BAIXADEIRO  
COM BASE EM DNA MITOCONDRIAL E MARCADORES  
MICROSSATÉLITES MOLECULARES**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves  
(Orientador)

---

Profª Drª Lígia Tchaicka  
(MEMBRO 1)

---

Prof. Dr. Claudio Nina Rodrigues  
(MEMBRO 2)

---

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade  
(MEMBRO 3)

*Á Deus todo poderoso e a minha família  
pelo incentivo e compreensão nos  
momentos de difíceis.*

## AGRADECIMENTOS

Á Deus, por ter me concedido, através de sua bondade infinita, o potencial de concretizar mais uma conquista em minha vida. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, Reginalda Silva Araújo e Ivanilson Pontes de Araújo por ter me educado, me ensinado valores morais e éticos, por sempre acreditar no meu potencial e me incentivam a ir mais longe. Para eles, o meu amor incondicional.

Aos meus irmãos, Mayana, Illa, Ítalo e Moises Neto por estarem ao meu lado, nos momentos tristes e alegres, pelos momentos de descontrações e brincadeiras. Para eles, o meu amor e carinho.

Aos meus familiares: avôs, avós, tios, tias, primos e primas. O meu agradecimento por estarem presentes em minha vida e por colaborar de forma direta ou indireta com as minhas conquistas.

Ao meu namorado Emerson, que de colega de turma se tornou um príncipe na minha vida, sempre companheiro, amigo, compreensivo, paciente (no meu caso é muito necessário) e carinhoso. Agradeço pelos incentivos, pelas ajudas e apoio nos momentos de desespero.

Aos colegas do mestrado Thayane, Luciana, Almerinda, Karol, Renata e Isadora por esses quase dois anos de muitos sorrisos, brincadeiras, companheirismo e muitas sociais. Pessoas que estarão no meu coração para sempre. Com certeza sem essa turminha o mestrado não seria o mesmo.

Ao Professor Ricardo de Macêdo Chaves, pela oportunidade, pela companhia nas coletas, paciência e orientação ao longo dessa jornada.

A professora Ligia Tchaicka pela orientação segura e competente, pela paciência e confiança, essenciais nesta etapa.

Aos dois, meus agradecimentos. Devo a vocês o meu crescimento como pesquisadora.

Aos meus amigos do GGC: Natanael, Joseane, Hanna, Thércia, Rhony e Gabriel pela ajuda, pela companhia nos vários sábados e feridos no laboratório, pelas brincadeiras e sorrisos.

Um agradecimento em especial a Ana Paula, pela sua alegria, companheirismo, simplicidade e por nunca ter me negado ajuda.

Aos companheiros de coleta, Thais, Gabriel e Vinício que me ajudaram nas aventuras de trabalhar com cavalo Baixadeiro.

Aos criadores de cavalos da baixada que com muita simplicidade e simplicidade contribuíram de forma direta para que hoje eu pudesse ter meus resultados.

Às pessoas que nos hospedaram e que nos alimentaram durante as viagens do mestrado; Aos profissionais da AGED que indicaram os locais com criações de cavalo; Ao seu Agnaldo e seu Marion, por ter conduzido a gente nas viagens e posteriormente se tornado um amigo; À Fran, secretária do mestrado, por ter me ajudado a resolver alguns pepinos.

À Universidade Estadual do Maranhão, local onde me graduei e tive a oportunidade de entrar no programa de Mestrado em Ciência Animal e por fornecer as condições necessárias para conclusão do Mestrado; A CAPES, por ter fornecido auxílio financeiro todo mês, de modo que pudesse me dedicar a este sonho.

A todos os demais que contribuíram direto ou indiretamente para que eu alcançasse meus objetivos e se por ventura não citei o nome, não é que sejam menos importantes. Mas são pessoas que estão dentro do meu coração, e é isso que importa.

Obrigada!

## LISTA DE TABELAS

|                 |                                                                                                                                                                |    |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Medias dos parâmetros analisados em 150 animais na BM.....                                                                                                     | 38 |
| <b>Tabela 2</b> | Origem geográfica dos haplótipos definidos por um fragmento de 556 pb da região controladora do DNA mitocondrial e número de indivíduo por haplótipo (NH)..... | 39 |
| <b>Tabela 3</b> | Painel de microssatélites utilizados.....                                                                                                                      | 42 |
| <b>Tabela 4</b> | Número de alelos obtidos para cada <i>locis</i> e variação do tamanho em pares de base para os alelos de cada <i>locis</i> .....                               | 46 |

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1  | Cavalo Baixadeiro em seu habitat natural.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 20 |
| Figura 2  | Mapa da Baixada Maranhense indicando os municípios de coleta dos animais utilizados no presente estudo.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| Figura 3  | Rede de haplótipos gerada pelo método de median-joining (BANDELT et al., 1999) a partir de sequencias da região D-loop do mtDNA do grupamento Baixadeiro de cinco municípios da BM. Os círculos representam as sequencias haplotipicas, sendo a área dos mesmos proporcionais a frequências do haplótipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplotipo, estando o número de mutações entre haplótipos indicado em vermelho (números).....                                                                                                                                                                            | 45 |
| Figura 4  | Network gerada pelo método de median-joining (BANDELT et al., 1999) a partir dos haplótipos obtidos para um fragmento de 516pb da região D-loop do DNA mitocondrial de cavalos do grupamento Baixadeiro e de 15 raças diferentes. Os círculos representam as sequencias haplotipicas, sendo a área dos mesmos proporcionais a frequências do haplotipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplotipo, estando o número de mutações grafado em vermelho. A figura está dividida em 4 haplogrupos (A, B, C e D), mostrando o compartilhamento de haplotipos entre o cavalo Baixadeiro e raças distintas de cavalo..... | 45 |
| Figura 5  | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> VHL20 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 47 |
| Figura 6  | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> HMS03 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 47 |
| Figura 7  | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> HTG06 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 48 |
| Figura 8  | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> HMS07 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 48 |
| Figura 9  | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> HMS02 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 49 |
| Figura 10 | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> UMO11 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 49 |
| Figura 11 | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> HTG07 nas populações para as cinco populações.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 50 |

|           |                                                                                                         |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 12 | Frequência dos diferentes alelos para o <i>locus</i> HTG08 nas populações para as cinco populações..... | 50 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATÖES

**MTDNA** – DNA mitocondrial

**HAP.** – Haplótipo

**MB** - Baixada Maranhense

## SUMÁRIO

|            |                           |           |
|------------|---------------------------|-----------|
| <b>1.</b>  | <b>APRESENTAÇÃO .....</b> | <b>14</b> |
| <b>2.</b>  | <b>OBJETIVOS.....</b>     | <b>15</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Específicos.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Geral.....</b>         | <b>15</b> |

### CAPITULO I

|              |                                                                        |           |
|--------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>    | <b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                      | <b>17</b> |
| <b>1.1</b>   | <b>Evolução e domesticação dos equinos.....</b>                        | <b>17</b> |
| <b>1.2</b>   | <b>Raças naturalizadas brasileiras e sua importância genética.....</b> | <b>18</b> |
| <b>1.2.1</b> | <b>Grupamento genético baixadeiro.....</b>                             | <b>20</b> |
| <b>1.3</b>   | <b>Diversidade genética ou variabilidade genética.....</b>             | <b>21</b> |
| <b>1.5</b>   | <b>Marcadores moleculares.....</b>                                     | <b>23</b> |
|              | <b>REFERENCIAS.....</b>                                                | <b>26</b> |

### CAPITULO II

|              |                                                     |           |
|--------------|-----------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.</b>    | <b>INTRODUÇÃO.....</b>                              | <b>35</b> |
| <b>2.</b>    | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                      | <b>36</b> |
| <b>2.1</b>   | <b>Local de coleta.....</b>                         | <b>36</b> |
| <b>2.2</b>   | <b>Amplificação do DNA mitocondrial.....</b>        | <b>39</b> |
| <b>2.2.1</b> | <b>Análises estatística.....</b>                    | <b>40</b> |
| <b>2.3</b>   | <b>Amplificação de microssatélites.....</b>         | <b>40</b> |
| <b>2.3.1</b> | <b>Análises estatística.....</b>                    | <b>41</b> |
| <b>3.</b>    | <b>RESULTADOS.....</b>                              | <b>42</b> |
| <b>3.1</b>   | <b>Análises fenotípica.....</b>                     | <b>42</b> |
| <b>3.2</b>   | <b>Região controladora do DNA mitocondrial.....</b> | <b>43</b> |
| <b>3.3</b>   | <b>Microssatélites.....</b>                         | <b>45</b> |

|       |                                                                                   |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.1 | Características dos <i>loci</i> analisados.....                                   | 45 |
| 3.3.2 | Estrutura populacional.....                                                       | 49 |
| 4.    | DISCUSSÃO.....                                                                    | 51 |
| 4.1   | Características fenotípicas.....                                                  | 51 |
| 4.2   | Origem do cavalo Baixadeiro e variabilidade genética para o DNA mitocondrial..... | 52 |
| 4.3   | Variabilidade genética por microsatelite.....                                     | 55 |
| 5.    | CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                                         | 59 |
|       | REFERENCIAS.....                                                                  | 60 |

## 1. APRESENTAÇÃO

O Brasil tem o terceiro maior plantel equino do mundo, com cerca de 5,3 milhões de animais, e o Nordeste o segundo maior efetivo, com 1,2 de cavalos (IBGE, 2013). Os remanescentes das espécies de equídeos do Nordeste brasileiro dizem respeito principalmente àquelas populações locais de cavalos e burros, distribuídas e adaptadas principalmente ao semiárido da Região Nordeste do Brasil (MELO *et al.*, 2011). Na zona rural, estes animais são utilizados em pequenas lavouras, no manejo com o gado e no transporte cargas e pessoas (TORRES, 1992).

Dentre as raças de cavalos criadas no Brasil, onze são naturalizadas. O grupamento genético Baixadeiro faz parte desse grupo de equinos naturalizados, porém não é reconhecido como raça. Atualmente possuem um rebanho de aproximadamente 4.000 animais (CHAVES, 2014). Os objetivos desse grupamento alcançados através do adestramento, são animais mais adaptados a lida do gado, descendentes de maior valor econômico e transporte de pessoas. A criação de cavalo Baixadeiro tem importância social e econômica na região da baixada maranhense (SERRA, 2004).

O presente trabalho está inserido no projeto Rebax 030/2013 que tem por objetivo promover o reconhecimento do grupamento Baixadeiro como uma raça naturalizada brasileira. Para avaliar a variabilidade genética foram utilizados marcadores microsatélites e DNA mitocondrial. O uso de marcadores polimórfico sem uma população permite a descrição de níveis de variabilidade genética, importantes para o manejo dos estoques. Estas estimativas poderão orientar programas de melhoramento, visando manutenção do máximo da variabilidade genética ancestral da raça. Além disto, a disponibilidade desses parâmetros, poderá orientar os cruzamentos e solucionar o problema do aumento do coeficiente de endogamia na população de cavalos Baixadeiro.

A dissertação está estruturada em dois capítulos. O primeiro apresenta uma revisão bibliográfica sobre a domesticação do cavalo, a importância da conservação genética dos animais domésticos e o uso de marcadores genéticos nos trabalhos de conservação. O segundo capítulo é constituído de um artigo que apresenta os resultados atingidos através do uso de marcadores moleculares para caracterizar a variabilidade genética dos cavalos Baixadeiros.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- ❖ Caracterizar a variabilidade genética do grupamento Baixadeiro gerando dados aplicáveis à sua conservação.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- ❖ Determinar e comparar o grau de variabilidade genética intra e interpopulacional do cavalo Baixadeiro utilizando loci de microssatélites;
- ❖ Obter informações genéticas que permitam inferir e compreender a influência dos processos históricos evolutivos do cavalo Baixadeiro através de sequências do DNA mitocondrial;
- ❖ Fornecer informações sobre a estrutura populacional, visando subsidiar programas de conservação e manutenção contínua da variabilidade genética, permitindo a consolidação deste grupo genético.



## Capitulo I

---

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Evolução e domesticações dos equinos

A posição dos cavalos na classificação dos mamíferos de acordo com Getty (1981) é: Subclasse: Theria, Infraclasse: Eutheria, Ordem: Perissodactyla, Subordem: Hippomorpha, Família: Equidae, Gênero: *Equus*. Os Perissodactyla são animais que se caracterizam por ter um número ímpar de dedos (um ou três) (HICKMAN et al., 2001). Além da família Equidae, a esta ordem pertence também as famílias Tapiridae e Rhinocerotidae, tendo sido a família Equidae a única que teve espécies submetidas ao processo de domesticação: o burro (*Equus asinus*) e o cavalo (*Equus caballus*) (OOM, 1992).

Os ancestrais do cavalo atual datam de 55 milhões de anos atrás. Durante o período Eoceno, os *Hyracotherium* ou *Eohippus* habitavam a Terra. Estes animais tinham cerca de 40 cm de altura, 70 cm de comprimento, quatro dedos e dorso arqueado, características que lhe davam agilidade para correr pelos campos e florestas tropicais à procura de alimentos e para fugir de predadores. Seus dentes eram adaptados para se alimentar de folhas tenras e brotos de plantas (CINTRA, 2011).

A disseminação dos equídeos teve início no médio Mioceno. Entretanto, o primeiro registro fóssil relacionado aos equídeos é do início do Eoceno. Esse animal apresentava diferenças tanto morfológicas quanto no hábito alimentar dos cavalos atuais, pois se alimentava apenas de brotos das pastagens (MACFADDEN et al., 1988). A partir do seu ancestral, o cavalo tem sofrido uma evolução gradual, através de milhões de anos, até chegar ao padrão que conhecemos (STAHL, 1985).

Os cavalos passaram a ser domesticados em 3500 a.C.. Embora suas origens exatas sejam obscuras, aceita-se que a domesticação aconteceu a partir de tipos selvagens como os cavalos Tarpan e Przewalski (GUÉRIN, 2002). Porém há controvérsias sobre o surgimento do *Equus caballus*. LEVINE (2005) define o *Equus* como aquelas espécies que formam o ramo lateral para os gêneros *Hippidion* e *Onohippidium*. Dessa forma, o gênero *Equus* teria aparecido a 4,5 milhões de anos atrás, originado do seu ancestral *Dinohhipus mexicanus* (OLSEN, 2003). O início de sua domesticação tem sido investigado por diversos pesquisadores, os quais também divergem em opinião, contestando evidências encontradas em sítios arqueológicos. Essa domesticação está ligada a crescente capacidade do cavalo de se movimentar, que possibilitou às pessoas se locomoverem por distâncias maiores e de maneira mais rápida. Elas podiam explorar

terrenos amplos e diversificados, manter famílias grandes e aumentar seus contatos para escambo, além de alcançar regiões inabitadas. E como um homem a pé não se compara com um homem montado a cavalo, as implicações militares da domesticação desse animal também foram revolucionárias (LEVINE, 1999).

O cavalo exerceu um papel importante na formação econômica, social e política mundial. Conhecer sua evolução nos permite entender todos os processos pelos quais seus ancestrais foram submetidos para chegar à forma atual do cavalo. Antes do desenvolvimento de armas de fogo o cavalo foi de importância crucial para a guerra, e antes da invenção do motor a vapor, ele era a forma mais rápida e confiável de transporte em terra (ROSA, 2013).

Os cavalos eram utilizados como alimento e meio de transporte, nos campos de batalha, no trabalho de fazendas, bem como em esportes que exigiam agilidade, resistência e velocidade. Esta ligação entre o homem e os equinos impôs a estes uma seleção, gerando várias raças morfologicamente diferentes, dependendo de sua utilização e cruzamentos que as originaram (GUÉRIN, 2002).

### **3.2 Raças naturalizadas brasileiras e sua importância genética**

O Brasil possui diversas raças de animais domésticos que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses logo após o descobrimento. Ao longo desses cinco séculos, estas raças foram submetidas à seleção natural em determinados ambientes, a ponto de apresentarem características específicas de adaptação a tais condições (MARIANTE et al., 2011). Assim, no Brasil as raças bovinas, equinas, asininas, caprinas, ovinas, e suínas ocuparam novos nichos ecológicos, desenvolvendo características únicas de tolerância a estresses climáticos, resistência a doenças e ectoparasitas (MARIANTE et al., 2011; EGITO, et al., 2001; SILVA, 2000).

As raças locais, muitas vezes consideradas como “menos produtivas”, são mais adaptadas às condições extremas de meio e são um reservatório de genes imprescindíveis para atender demandas futuras do homem, decorrentes das mudanças climáticas bruscas e do surgimento de novas doenças que são fortes ameaças às raças e tipos mais especializados (FAO, 2007).

Os primeiros cavalos foram trazidos para o Brasil pelos colonizadores no século XVI. Admite-se que tenham entrado no país através dos colonizadores, principalmente portugueses e espanhóis (BRAGA, 2000). Santos et al. (1992) citaram que as primeiras raças introduzidas eram basicamente de origem hispânica, mas também foram trazidos

animais de origem inglesa, bárbara, árabe e turca, influenciadas pelas condições locais deram origem a várias raças naturalizadas. Estas se adaptaram aos mais diferentes ambientes naturais, como as terras altas do sul (Campeira no Estado de Santa Catarina), tropical norte do Brasil (Lavradeira em Roraima e grupo genético Baixadeiro no Maranhão), o Pantanal, a oeste, central (Pantaneira no Pantanal Mato-Grossense) e sudeste (Mangalarga Machador em Minas Gerais). Grande parte foi originada a partir da dispersão de manadas pelo país, sendo produtos dos diferentes processos de seleção natural, adaptação aos ecossistemas e, mais recentemente, de cruzamentos direcionados pelo homem (MARIANTE et al., 2003; GIACOMONI, 2008; MARIANTE et al., 2009; SILVA et al., 2012). Essas raças são usadas no manejo com o gado em pastagens nativas (MCMANUS et al., 2005; 2008) e alterações na sua composição genética podem afetar a sua utilidade em sistemas de produção.

A busca por raças mais produtivas fez com que, a partir do final do século XIX e início do século XX, houvesse importação de raças consideradas exóticas, que embora fossem altamente produtivas haviam sido selecionadas em regiões de clima temperado. Estas raças, por cruzamentos absorventes, causaram uma rápida substituição e erosão nas raças locais; as quais apresentam níveis de produção mais baixos, mas distinguem-se destas por estarem totalmente adaptadas aos trópicos, onde sofreram uma longa seleção natural (EGITO et al., 2002).

As raças naturalizadas brasileiras estão sendo gradualmente substituídas por raças comerciais, e encontram-se assim, em sua maioria, ameaçadas de extinção. Neste contexto a erosão genética é um problema preocupante nos âmbitos nacional e internacional. Os equinos (23%), seguido pelos coelhos (20%), suínos (18%) e bovinos (16%), são as espécies de mamíferos com mais altas proporções de raças em situação de risco (FAO, 2007; EMBRAPA, 2010a).

Desta forma, o armazenamento de material genético das raças naturalizadas, com suas características únicas, em um Banco de Germoplasma é fundamental para a segurança alimentar do país (MARIANTE et al., 2011).

Os animais domésticos são produtos de processos de seleção, melhoramento e domesticação (SANTOS et al., 2003). A pressão de seleção a que estão submetidos forçou populações a se adaptarem a nichos ecológicos específicos. Esses animais também têm sofreram os efeitos da deriva genética, mutação e seleção artificial (SANTOS et al., 2003). Portanto, a preservação e conservação dessas raças são de valor significativo para a natureza e para os seres humanos.

Com o auxílio de várias organizações e de diversos países (entre os quais o Brasil), em 1991 a FAO iniciou um levantamento a nível mundial sobre a situação das principais espécies de animais domésticos.

Desde então, programas mundiais de conservação têm sido desenvolvidos devido à preocupação com a perda da diversidade genética causada pela extinção de raças e populações, especialmente para os equinos cujas populações vêm sendo reduzidas gradativamente no mundo inteiro. Pesquisadores acreditam que essa “discreta” ameaça é decorrente de alterações no estilo de vida das pessoas e no processo de mecanização agrícola (GLOWATZKI-MULLIS et al., 2005; BEHL et al., 2007; LING et al., 2010). A redução no tamanho populacional tem um impacto sobre a variação genética e aumento da endogamia, que são fatores de suma importância em programas de conservação (FRANKHAM et al., 2002; ALLENDORF et al., 2007).

### **3.2.1 Grupamento genético Baixadeiro**

O cavalo Baixadeiro é provavelmente oriundo do cruzamento de equino de origem Ibérica, dos cavalos Garrano e Berbere introduzido no Brasil no período colonial. É um grupo de cruzamento centenário restrito a região da Baixada Maranhense, onde constitui importante meio de transporte para as comunidades, sendo muito utilizado na lida com o gado (GAZOLLA et al., 2009).

Possui características de rusticidade e adaptabilidade adquiridas através da seleção natural (MC MANUS et al., 2010), ocasionadas pelas adversidades climática e geográfica do ecossistema da região Norte do estado do Maranhão, marcado por estações inundáveis alternadas com secas. Esse equino é amplamente utilizado na região, especialmente na lida com o gado e, além disso, é um grupamento naturalizado que se encontra no Brasil há séculos e, por isso, uma fonte potencial de genes de interesse para programas de melhoramento genético animal (EMBRAPA, 2005).

O cavalo Baixadeiro apresenta pequeno porte com altura média de 1,28 (macho) e 1,23 (fêmea), robusto, leve em sua aparência geral e de musculatura definida; cabeça de tamanho médio, de perfil subconvexo para retilíneo, olhos médios e vivos e orelhas bem implantadas; ossatura seca e forte, tendões delicados, pele e pelos finos; constituição forte e sadia e temperamento ativo (SERRA, 2004). Pelagem predominantemente tordilha, castanho ou baio.

Estima-se que a população de equinos tipicamente Baixadeiros esteja em torno de quatro mil exemplares, que influenciam de maneira marcante as condições

socioeconômicas dos habitantes da baixada maranhense (CHAVES, 2015). De acordo com Mariante et al. (2008), o cavalo Baixadeiro está inserido no Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animal.

De acordo com SILVA et al. (2012), dados moleculares mostram que o cavalo Baixadeiro se encontra geneticamente distinto das outras raças existentes no Brasil, tais como a Campeira, Mangalarga Machador, Lavradeiro e o Pantaneiro. Acredita-se que o cavalo Baixadeiro tenha contribuição genética da raça Puruca, pois apresenta características fenotípicas semelhantes (MC MANUS et al., 2010).



Figura 1. Cavalo Baixadeiro em seu habitat natural

#### **2.4 Diversidade genética ou variabilidade genética**

A diversidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos presentes em um determinado grupo, e a natureza faz uso dessa variação para que a evolução e consequente perpetuação de uma determinada espécie aconteçam, mediante as mudanças do meio (FRANKHAM et al., 2008). O declínio na diversidade genética reduz diretamente o poder adaptativo das populações (FRANKHAM et al., 2008).

Segundo Egito (2002) a diversidade genética das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variação presente dentro de cada uma delas. O método mais utilizado para quantificar esta diversidade genética é a análise dos genótipos de indivíduos não aparentados entre si, selecionados de uma população sobre investigação (GROENEN et. al., 2003). Essa variação pode ser mensurada através das medidas de heterozigosidade, da avaliação do polimorfismo genético, da diversidade

alélica (número de alelos), da riqueza alélica e do número efetivo de alelos (HEDRICK, 2005).

Compreender a evolução e diversidade genética dos equídeos, assim como classificar as suas populações de acordo com a respectiva prioridade como unidades de conservação, é crucial para o desenvolvimento de um plano de gestão apropriado, tanto para populações selvagens como para populações domésticas (OAKENFULL et al., 2000). Nesse sentido, a necessidade de se medir a variabilidade genética dos animais é inegável, pois segundo GAMA (2004), a conservação dos recursos genéticos está efetivamente relacionada à manutenção da variabilidade inter-racial, evitando a extinção de raça e evitando a erosão genética.

Segundo Ollivier (2005) existem três níveis fundamentais que determinam a diversidade gênica de uma espécie: variação genética dentro de indivíduos (heterozigosidade); diferenciação genética de indivíduos dentro de uma população; e as diferenças genéticas entre populações. O heterozigoto é o organismo que apresenta diferentes alelos em um dado locus, quando há déficit de heterozigoto é indício de que acasalamentos entre indivíduos mais aparentados estejam acontecendo com considerável frequência, sendo isso comum em populações com número efetivo de animais reduzido - como em populações estruturalmente divididas e isoladas, populações fragmentas e isoladas (HEDRICK, 2005).

A perda de um único tipo ou raça compromete o acesso a seus genes e/ou combinações genéticas, pois cada raça ou população representa, provavelmente, uma combinação única de genes que pode ser útil no futuro. Assim, convém-se manter a máxima diversidade de pool genético de cada espécie (EGITO et. al., 2002). Deste modo, a visão atual é a de manter a diversidade genética máxima de cada espécie prevendo necessidades imprevistas para o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis, uma vez que não é possível prever com objetividade quais características podem ser necessárias no futuro (BARKER, 1992, 1994; DANELL, 1994; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993).

Em 1995 a Food Agriculture Organization (FAO) juntamente com a International Society of Animal Genetics (ISAG) formaram um grupo de consultores que elaboraram diretrizes e recomendações técnicas para a avaliação da diversidade genética em raças de animais domésticos. Através de um projeto intitulado Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD) ([http://www.fao.org/dad\\_is](http://www.fao.org/dad_is)) selecionaram uma lista de loci de microsatélites para estudos de diversidade genética, caracterização de raças de bovinos,

ovinos, suínos e aves. No ano de 2004, a lista foi ampliada com a inclusão de novos marcadores (FAO, 2004).

Os programas de conservação devem proteger todos esses componentes de diversidade genética, de forma a reter o máximo da variação total e manter a estrutura genética natural da população. Mais especificamente, a detecção da variabilidade entre raças é resultante de longos processos evolutivos e pode ser válida para prever mudanças no próprio meio ambiente (GANDINI et. al., 2004).

## **2.5 Marcadores moleculares.**

O DNA equino está distribuído em 31 pares de cromossomos autossômicos, além dos cromossomos X e Y. Estima-se que este genoma tenha aproximadamente 50.000 a 70.000 cópias de genes e que ele seja, na maioria, composto por sequências repetidas (BINNS et al. 2000). Essas sequências podem ser de diferentes tipos como os minissatélites, microssatélites, SINEs, LINEs, entre outras, apresentando papel importante nos estudos que utilizam marcadores moleculares para identificação individual, análises de parentesco, mapeamento genético e estudos de evolução de raças de cavalos (BINNS et al. 2000).

Os primeiros marcadores moleculares de DNA foram desenvolvidos na década de 1980. Marcador molecular é definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou não de um segmento específico de DNA. Atualmente, os marcadores moleculares são as principais ferramentas em estudos de diversidade genética, localização de genes de interesse econômico e construção de mapas genéticos (FERREIRA et. al., 1998). Milach (1998) cita que marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdados geneticamente.

Os marcadores moleculares podem ser derivados de qualquer tipo de dado molecular, que forneça um polimorfismo detectável entre os organismos a serem comparados. Devido ao desenvolvimento no campo da biologia molecular aliada à genética, uma grande variedade de técnicas para analisar polimorfismos genéticos tem sido disponibilizada. Estes marcadores podem diferir com respeito a características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos *locus*, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (EMBRAPA, 2003).

Basicamente, os marcadores de DNA podem ser classificados em dois grupos: marcadores dominantes e codominantes. Os marcadores dominantes (ex.: RAPD, AFLP)

permitem obter dados de loci aleatórios do genoma, enquanto que os codominantes (ex.: RFLP, sequência de DNA, microssatélites) revelam alelos de loci específicos do genoma (FREELAND, 2005).

Marcadores codominantes, tais como microssatélites, permitem distinguir indivíduos heterozigotos de homozigotos e calcular frequência de alelos (FREELAND, 2005). Eles estão localizados em regiões do DNA que não codificam para proteínas muito utilizadas como marcadores moleculares em estudos de genética de populações (JARMAN et al., 2002). Oferecem as vantagens de serem marcadores neutros, ou seja, não se encontram sob seleção natural, serem muito informativos em virtude de sua alta taxa de mutação e heterozigosidade, e serem facilmente obtidos pela técnica de PCR – *Polimerase Chain Reaction* (SCHLÖTTERER, 2004; OLIVEIRA et al., 2006)

Estudos em Bancos de Dados mostram que a frequência que é distribuição dos microssatélites difere em plantas e animais. O genoma de plantas contém, em média, dez vezes menos microssatélites do que o genoma humano (RAFALSKI et. al., 1996). Os microssatélites estão presentes em regiões codificadoras e não codificadoras. (ZANE et. al., 2002).

Marcadores moleculares codominantes, como os microssatélites ou "Simple Sequence Repeats" (SSR) são importantes na verificação das mudanças nos parâmetros genéticos das populações ao longo dos ciclos de seleção, já que identificam alterações e perdas alélicas em cada loco individualmente (OLIVEIRA et. al., 2005). Esse tipo de marcador tem sido utilizado com sucesso nos estudos dos efeitos da seleção recorrente na estrutura genética das populações sob seleção (PINTO et. al., 2003).

Marcadores autossômicos, com herança bi-parentais, como os microssatélites, são também comumente utilizados para a identificação genética de indivíduos e análises de parentesco (EGITO et al., 2005; CHAMBERS et al., 2000).

Outros marcadores muito utilizados no estudo de populações silvestres baseiam-se em sequências de DNA mitocondrial (mtDNA). Este é constituído de uma molécula pequena de fita dupla circular que codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (NAHUM, 2001). Seu tamanho é de aproximadamente 16.500 pares de base (pb), onde são descritos 37 genes, dos quais 13 codificam proteínas, 2 codificam RNAs ribossomais e 22 codificam RNAs transportadores (MEYER, 1993). A molécula do mtDNA presente em cópias múltiplas por célula (102-140) é de herança materna, replica sem recombinação e evolui mais rapidamente que o genoma nuclear (AVISE et al., 1994; SACCONI et al., 2000).

A D-loop, cujo tamanho varia entre 880bp e 1400bp (sendo de 960bp no cavalo) possui a maioria dos elementos regulatórios de replicação e expressão do genoma mitocondrial (SABISA, 1997). Evolui 4-5 vezes mais rápido que o restante mtDNA, pelo que é recomendada para estudos populacionais (BROWN et al., 1993; SABISA et al. 1997).

Esta molécula tem sido usada como ferramenta para determinação de passados demográficos e evolutivos em populações ou espécies próximas (MACGAHERN et al., 2006). Esta região tem sido bem-sucedida no estudo de equídeos, tanto no estudo da diversidade genética, com particular relevância para fins conservacionistas (VILA et al., 2001; KAVAR et al., 2002; LUIS et al., 2002; COZZI et al., 2004; LOPES et al., 2005), bem como na execução de estudos filogenéticos, por determinação, agrupamentos e reconstrução da evolução das linhas maternas (JANSEN et al., 2002; ROYO et al., 2005; SECO-MORAIS, 2007).

O DNA mitocondrial também vem sendo utilizado para aferir o grau de diversidade genética das espécies e estimar a variabilidade genética entre populações. Isto se deve a algumas vantagens, como, a facilidade em ser isolado, tamanho reduzido, herança uniparental, ausência de recombinação e elevada taxa de mutação (AVISE et al., 1994).

Segundo Spritze (2003), caracterização genética por meio de marcadores é importante para programas de conservação de recursos genéticos animal, pois é útil na avaliação da distância entre as populações em estudo e pode auxiliar na escolha dos animais a serem utilizados na conservação *ex situ* e *in situ*, a partir da estimativa de índices de similaridade entre os indivíduos analisados. Além disso, possibilita a indicação de acasalamentos ou cruzamentos que favorecerão a manutenção da máxima variabilidade genética e evita esforços na manutenção de amostras que geneticamente seriam similares (EGITO et al., 2001). Têm sido utilizados em análise genética de várias situações como na identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, na estimativa de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (EMBRAPA, 2003).

## REFERENCIAS

- ALLENDORF F. W. LUIKART G. **Conservação e da genética de populações**. Blackwell Publishing; Malden: 2007. P.642.
- AVISE, J. C.; NEIGEL, J. E.; ARNOLD, J. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. **Journal of Molecular Evolution**, v. 20, p. 99-105, 1994.
- BARKER, G. C. Microsatellite Dna: A tool for population genetic analysis. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene**, V. 96, P. S1/21 - S1/24, 1992.
- BEHL, R. et al. **Genetic relationships of five Indian horse breeds using Microsatellite markers**. *Animal*, v.1, p.483-488, 2007.
- BINNS, M.; SWINBURNE, J.; BREEN, M. Molecular genetics of the horse. In: Bowling A & Ruvinsky A (eds.) **The genetics of the horse**. Califórnia. CABI Publishing, 2000. p:109-121.
- BORBA, R. S. Genetic structure of the ornamental tetra fish species *Piabucus melanostomus* Holmberg, 1891 (Characidae, Iguanodectinae) in the Brazilian Pantanal wetlands inferred by mitochondrial DNA sequences. **Biota Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 42-46, 2013.
- BRAGA, R.M. (2000). Cavalo Lavradeira em Roraima: Aspectos Históricos, Ecológicos e de Conservação. **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, Brasília, 39-87.
- BROWN, J. R., BECKENBACH, A. T., SMITH, M. (1993) Intraspecific DNA Sequence Variation of the Mitochondrial Control Region of White Sturgeon (*Acipenser transmontanus*) **Mol. Biol. Evol.**, 10 (2), 326-341.
- CINTRA, A. G. C. **O cavalo: características, manejo e alimentação**. Editora Roca – São Paulo, 2011, p. 3-12.
- CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Review Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.126, p.455–476, 2000.
- COZZI, M. C., STRILLACCI, M. G., VALIATI, P., BIGHIGNOLI, B., CANCEDDA, M., ZONOTTI, M. (2004) Mitochondrial D-loop sequence variation among Italian horse breeds. **Genet. Sel. Evol.**, 36, 663-672.
- DANELL, B. 1994. Methods of conservation of farm animals. 102-111. In: **Genetic Resources in Farm Animals and Plants. Report from Research Symposium** 27-29 May, Ed. The Nordic Council of Ministers.
- EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, n.193- 194 p.39-52, 2002.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Desenvolvimento e Aplicação de Marcadores Microssatélites em Maçaranduba** - Circular técnica, 20. Brasília, 2003.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA. **Situação mundial dos recursos genéticos animais para agricultura e alimentação**. Brasília, DF, 2010a.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Lasituación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y lanagricultura –Resumen**. Editado por Daffydd Pilling e Barbara Rischkowsky. Roma, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2004. Secondary Guidelines for Developmen of National Farm Animal Genetic Resources Managemente Plans: Meaasurement of Domestisc Animal diversity (MoDAD). **Recommended Microsatellite Markers**. Roma, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Global plan of action for animal genetic resources and the interlaken declaration**. Rome, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Guidelines for Development of National Management of Farm Animal Genetic Resources Plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers**, Rome, Italy, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization. **The state of the world's animal genetic resources for food and agriculture**. Rome: FAO, 2007. 511p.

FRANKHAM R., BALLOU J.D., BRICOE D.A. **Introdução a Conservação genética**. Cambridge University Press; Cambridge: 2002. P.617.

FRANKHAM R; BALLOU J.D.; BRISCOE D.A. 2008. Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: **Sociedade Brasileira de Genética**. 280p.

FREELAND, J. R. (2005). **Molecular Ecology**. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCid: 548581.

GAMA, L.T. Manutenção da variabilidade genética em programas de seleção. In: Simpósio internacional de conservação de recursos genéticos (raças nativas para o semiárido), 2004, Recife. **Anais...** Recife: 2004. P.38-44.

GANDINI, G. C.; OLLIVIER, L.; DANELL, B; DISTL, O.; GEORGOUDIS, A.; GROENEVELD, E; MARTYNIUK, E.; VAN ARENDONK, J. A. M.; WOOLLIAMS, J. A. Criteria to assess the degree of endangerment of livestock breeds in Europe. **Livestock Production Science**, v. 91, p. 173-182, 2004.

GAZOLLA, A. G.; SERRA, O. R.; LIMA, F. C. PELAGENS DO CAVALO DA RAÇA BAIXADEIRA. In: **46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2009. Maringá-PR, 14 a 17 de julho de 2009, p.1-3.

GETTY, R. **Anatomia dos animais domésticos**, SISSON & GROSSMANN. V.1 e 2. Rio de Janeiro: Interamericana, 5.1981.

GIACOMONI, E.H., G.P; STOLZ, F; FREITAS, T. R. O. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. **Genetics and Molecular Research** 7 (1): 261-270 (2008).

GLOWATZKI-MULLIS, M.L. et al. Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-Montagnes breed. **Animal Genetics**, v.37, p.33–39, 2005.

GROENEN, M.A.M.; JOOSTEN, R.; BOSCHER, M-Y.; AMIGUES, Y.; RATTINK, A.; HARLIZIUS, B.; VAN DER POEL, J.J.; CROOIJMANS, R. The use of microsatellite genotyping for population studies in the pig using individual and pooled DNA samples. **Archivos de Zootecnia**, v. 52, p. 145-155, 2003.

GUÉRIN, G; BAILLEY, E; BERNOCO, D. AND ANDERSON, I (2002). The second generation of the international equine gene mapping workshop half-sibling linkage map. **International Society Animal Genetics**. 34: 161-168.

HEDRICK, P.W. **Genetics of Populations**. 3rd ed. Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers. 2005. 736p.

HICKMAN, C. P., ROBERTS, L. S., LARSON, A. (2001) **Integrated Principles of Zoology (11th edition)**. McGraw Hill.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2013. **Produção Pecuária 2013**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf)>. Acesso em: 15.09.2015.

JANSEN, T., FORSTER, P., LEVINE, M. A., OELKE, H., HURLES, M., RENFREW, C., WEBER, J., OLEK, K. (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. **PNAS**, 99, 10905-10.

JARMAN, S. N., WARD, R. D., & ELLIOTT, N. G. (2002). Oligonucleotide primers for PCR amplification of coelomate introns. **Journal of Marine Biotechnology**, 4(4), 347-355. Doi: 10.1007/s10126-002-0029-6.

KAVAR, T.; BREM, G.; HABE, F. et AL. History of lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 635-648, 2002.

LEVINE, M. A. LEVINE, M. A.; RASSAMAKIN, Y. Y.; KISLENKO, A. M.; TARAEINTSEVA, N. S. **The origins of horse husbandry on the Eurasian steppe**. In: Late Prehistoric Exploitation of the Eurasian Steppe. Cambridge University Press, 1999b, p.5–58.

LEVINE, M. A. **The Domestic Horse: The Origins, Development, and Management of its Behaviour**, Cambridge University Press, 2005, p. 1: 6-22.

LING, Y.H. et al. Evaluation of the genetic diversity and population structure of Chinese indigenous horse breeds using 27 microsatellite markers. **Animal Genetics**, v.42, p.56–65, 2010.

LOPES, M. S., CYMBRON, T., VALERA, M., COSTA-FERREIRA, J.D. The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. **Animal Genetics**, 36, 196-202, 2005.

LUIS, C., GOTHAN, E. G., OOM, M.M. (2002b) Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. **Genetics and Molecular Biology**, 25 (2), 131-134.

LUIS, C., BASTOS-SILVEIRA, C., COTHAN, E. G., OOM, M.M. (2002a) Variation in the mitochondrial control region sequence between the two maternal lines of the Sorraia horse breed. **Genetics and Molecular Biology**, 25(3), 309-311.

MACFADDEN, B.J. The Miocene horse *Hipparion* from North America and from the type locality in southern France. **Paleontology** 23:617-634, 1980.

MCGAHERN, A., BOWER, M. A., EDWARDS, C. J., BROPHY, P. O., SULINOVA, G., ZAKHAROV, I., VIZUET- FORSTER, M., LEVINE, M., LI, S., MACHUGH, D. E., HILL, E.W. (2006) Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations . **Animal Genetics**, 37 (5), 494-497.

MACHADO, T.M.M.; PIRES, L.C.; ARAUJO, A.M. Conservação e melhoramento genético de caprinos com o auxílio de caracteres morfológicos e biométricos. In: Caprinos e Ovinos: **Tecnologias para Produção Lucrativa no Nordeste**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2010, v.2.

MARIANTE A.S.; ALBUQUERQUE M.S.M.; RAMOS A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.64-68, abr./jun. 2011.

MARIANTE, A.; CAVALCANTE, N. (2009) Animais do Descobrimento – raças domésticas da história do Brasil. 2ª ed. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, 274p.

MARIANTE, A.S. et al. Situação atual da conservação de recursos genéticos animais no Brasil. In: **Simpósio de Recursos Genéticos para América Latina e Caribe**. 2. 1999 Brasília, DF. Mesa Redonda... Brasília, DF: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia 1999. 5. CD-ROM.

MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C; MENDONÇA, J.F.B. (ORG.). 2003. Country Report on the State of Animal Genetic Resources: Brazil. Brasília, **Embrapa Genetic Resources and Biotechnology**. Documentos, 99, 93p.

MCMANUS, C.M.; FALCÃO, R.A.; SPRITZE, A; COSTA, D. et al. (2005). Caracterização morfológica de equinos da raça Campeira. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 34: 1553-1562.

MCMANUS, C.M; SANTOS, S.A.; SILVA, J.; LOUVANDINI H. (2008). Body indices for the Pantaneira horse. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**. 45: 362-370.

MCMANUS; PAIVA, J.R.F.M.S.; SEIXAS, L. Cavalos Marajoaras e Puruca. **Série Técnica: Genética**. Publicado “on line” em animal. unb.br. 2010.

MELO, J. B. **Caracterização zoométrica do remanescente da raça equina Nordestina nos estados de Pernambuco e Piauí**. 2011. 118f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife 2011.

MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v. 2, p. 1-38, 1993.

NAHUM, L. A. Evolução dos Genomas. In: Mاتيoli, **Biologia Molecular e Evolução**. **Ribeirão Preto**, Holos Ed., 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1993. **Managing global genetic resources. Livestock. Committee on Managing Global Genetic Resources: Agricultural Imperatives**. Ed. National Academic Press.Washington, D.C. 276 p.

OLSEN SL. (2003) A exploração de cavalos em Botai Cazaquistão. In: **Prehistoric Steppe Adaptação e do Cavalo** (Ed by. M.Levine,C.Renfrew & K.Boyle), pp. 83 - 103. McDonald Instituto para Investigação Arqueológica, Cambridge, Reino Unido.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M.L.C. **Origin, evolution and genome distribution of microsatellites**. *Genetics and Molecular Biology*, v.29, p.294-307, 2006.

OLLIVIER, T. L.; FOULEEY, J-L. Aggregate diversity: New approach combining within and between breed genetic diversity. **Livestock Production Science**, v.95, p.247-254, 2005.

OOM, M. D. M. J. F. O Cavalo Lusitano, uma raça em recuperação (**Tese de PhD**). Lisboa: Universidade de Lisboa, Portugal, 281 pp, 1992.

PINTO, L.R.; VIEIRA, M.L.C.; SOUZA JUNIOR, C.L. de; SOUZA, A.P. Reciprocal recurrent selection effects on the genetic structure of tropical maize populations assessed at microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.355-364, 2003.

RAFALSKI, J.A.; VOGEL, J.M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S.V. 1996. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B., LAI, E. (eds.). Analysis of non-mamalian genomes – a practical guide. **Academic Press**, New York, pp 75-134.

ROSA S. C. L. O DESENVOLVIMENTO DO EQUUS CABALLUS E SUA INFLUÊNCIA NAS CIVILIZAÇÕES ANTIGAS (**Dissertação de mestrado**). Faculdade de Agronomia e Veterinária Graduação, Brasília – 2013.

ROYO, L. J., ALVAREZ, I., BEJA-PEREIRA, MOLINA, A., FERNANDEZ, I., JORDANA, J., GOMEZ, E. (2005) The Origins of Iberian Horses Assessed via Mitochondrial DNA. **Heredity**, 96 (6) 663-669.

SABISA, E., TANZARIELLO, F., REYES, A., PESOLE, G., SACCONI, C. (1997) Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. **Gene**, 205, 125-140.

SACCONI, C. et al. Evolution of the mitochondrial system: an overview. **Elsevier Science**. Gene, v. 261, p. 153-159, 2000.

SANTOS, E.G. Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesaloniaceae). Piracicaba, 2003. 114p. (**Dissertação de Mestrado**) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SECO-MORAIS, J. The Evolution of the Horse (*Equus caballus* L., 1758) in the Iberian Peninsula: a molecular approach (**PhD dissertation**). Lisboa: Universidade de Lisboa, Portugal, 219 pp.2007.

SERRA, O.R. Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do grupamento genético equino baixadeiro, 2004. Dissertação (**Dissertação de Mestrado**) - Universidade Estadual do Maranhão, 2004. 84p.

SILVA A.C.M., PAIVA S.R., ALBUQUERQUE M.S.M., EGITO A.A., SANTOS S.A. LIMA F.C., CASTRO S.T., MARIANTE A.S., CORREA P.S., MCMANUS C.M. **Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers**. Genetics and Molecular Research 11 (2): 881-890 (2012).

SILVA, R.M. Sistema reprodutivo, fluxo gênico e paternidade em roça de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Piracicaba, 2000. 131p. (**Tese Doutorado**) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SCHLÖTHERER C (1998) Microsatellites. In: **Hoelzel A Molecular genetics analysis of populations: a practical Approach**. Oxford University Press Inc, New York. p:237-261.

SPRITZE, A.; EGITO, A.A.; MARIANTE, A.A.; MCMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. vol.38 n10 Brasília, 2003

STAHL, B. J. **Vertebrate history problems in evolution**. New York: Dover Publications, p. 503. 1985.

TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; PORTO, J. I. R. Molecular signature of the Região Controle in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 110-124, 2012.

TERENCIO, M. L. et al. **Structure and organization of the mitochondrial DNA control region with tandemly repeated sequence in the Amazon ornamental fish.** Mitochondrial DNA, v. 24, p. 74-82, 2013.

VILA, C., LEONARD, J. A., GOTHERSTROM, A., MARKLUND, S., SANDBERG, K., LIDEN, K., WAYNE, R. K., ELLEGREN, H. (2001) Widespread Origins of Domestic Horse Lineages. **Science**, 291, 474-477.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, 11: 1-16.



## CAPÍTULO II

---

## Variabilidade genética dos equinos “Baixadeiro” com base em DNA mitocondrial e marcadores microssatélites.

Ítala Mayara Silva Araújo<sup>1</sup>; Ligia Tchaicka<sup>2</sup>; Ricardo de Macedo Chaves<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. <sup>2</sup>Autor correspondente ([ligiatchaicka@yahoo.com.br](mailto:ligiatchaicka@yahoo.com.br)) Bairro Tirirical, São Luís, Maranhão, Brasil. CEP: 65055-970. Caixa Postal 09. <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Recursos Aquáticos e Pesca, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA.

### RESUMO

O cavalo Baixadeiro constituem-se em um ecótipo equino encontrado na Baixada Maranhense. Cruzamentos com outras raças, pressões seletivas de manejo e do ambiente, tem conferido a estes indivíduos características fenotípicas diferenciadas. O principal objetivo deste trabalho foi caracterizar a variabilidade genética do grupamento Baixadeiro gerando dados aplicáveis à sua conservação, através de marcadores moleculares de DNA nuclear e DNA mitocondrial. Foram utilizadas 150 amostras de sangue de cinco municípios da Baixada Maranhense. Dezesete sequencias de cavalo Baixadeiro foram utilizadas para análise DNA mitocondrial, além de 49 sequencias oriundas do *Genbank* de raças distintas. Para a região controladora do DNA mitocondrial foram analisados fragmentos de 516 pb, as análises indicaram a existência de 95 sítios variáveis, a partir dos quais foram definidos 31 haplótipos ( $Hd=0,967$  e  $\pi=0,02037$ ). Para estudos de microssatélite foram usadas 150 amostras e 8 *loci* de microssatélites, os microssatélites mostraram-se polimórficos, apresentando um total de 259 alelos. A média de alelos por município foi de 8,74 (variando de 0,83 para 1,50), o Equilíbrio de Hardy Weinberg considerando as populações e os loci separadamente, obtivemos valores de  $F(is)$  entre 1 e 0,01. Quando consideradas todas as populações, observou-se valores médio de  $F(st)=0,5790$  e  $Rho(st)=0,6592$  ( $p<0,05$ ). Podemos inferir que o “Baixadeiro” provavelmente recebeu material genético de diferentes raças em seu processo de formação. Apesar da variabilidade genética apresentar-se elevada e o tamanho populacional ser ainda considerável, registramos subestruturação populacional, índices elevados de endocruzamento.

**Palavras Chaves:** Cavalo, Marcadores moleculares, Variabilidade, Conservação, Fenótipo, Baixada Maranhense.

### ABSTRACT

The Baixadeiro horse are in an equine ecotype found in Baixada Maranhense. Crosses with other breeds, selective pressures of management and the environment, has given these individuals differentiated phenotypic characteristics. The main objective of this study was to characterize the genetic variability of Baixadeiro grouping generating data applicable to conservation through molecular markers of nuclear DNA and mitochondrial DNA. They used 150 blood samples from five municipalities of Maranhão Lowlands. Seventeen Baixadeiro horse sequences were used to analyze mitochondrial DNA, and 49 sequences derived from *Genbank* of different races. To control region of the mitochondrial DNA of 516 bp fragments were analyzed, the analysis indicated the

existence of 95 variable sites, from which were defined 31 haplotypes ( $H_d = 0,967$  e  $\pi = 0.02037$ ). To study microsatellites were used 150 samples and 8 microsatellite loci, microsatellites shown to be polymorphic, with 259 alleles. The average number of alleles per municipality was 8.74 (range 0.83 to 1.50), the Hardy Weinberg equilibrium considering the populations and loci separately obtained values of  $F(s)$  from 1 to 0.01, all significant ( $p < 0.005$ ) for the statistical analysis. When taken all populations observed average values of  $f(st) = 0.5790$  and  $Rho(st) = 0.6592$  ( $p < 0.05$ ). We can infer that the "Baixadeiro" probably received genetic material of different races in the process of formation. Although genetic variability is present high and the population size is still considerable, recorded population substructures, high levels of inbreeding.

**Keywords:** Horse, Molecular markers, Variability, Conservation, Phenotype, Baixada Maranhense.

## 1.INTRODUÇÃO

Todos os animais domésticos são produtos de processos de seleção, melhoramento e domesticação que forçaram as raças e populações a se adaptarem a nichos ecológicos peculiares a cada região do planeta. Como consequência sofreram também efeitos da deriva genética e mutação (SANTOS et al., 2003). Portanto, a preservação e conservação dessas raças são de valor significativo para a natureza e para os seres humanos (GIACOMONI, 2008).

Os primeiros cavalos foram trazidos para o Brasil pelos colonizadores no século XVI e posteriormente evoluíram e se adaptaram às condições dos diferentes habitats encontrados no país (BRAGA, 2000; EGITO, 2002). Dentre esses, o "grupamento genético baixadeiro" é provavelmente proveniente de cavalos ibéricos introduzido no estado do Maranhão, norte do país, durante o período colonial. Desde então, eles desenvolveram características que lhes permitiram viver em áreas que permanecem alagadas durante toda a estação chuvosa (EMBRAPA, 2005).

Nos últimos anos, no entanto, como acontece com outras raças naturalizadas, a integridade do grupamento genético cavalo Baixadeiro encontra-se ameaçada devido a cruzamentos com animais de raças exóticas e ao processo de endogamia (GAZOLA et al., 2009). Carece, assim, de estudo sobre sua distribuição geográfica, caracterização genética e programas de conservação, visando manter os genes únicos que uma raça naturalizada apresenta (SILVA 2012; GIACOMONI, 2008).

No âmbito da conservação, a caracterização genética é um pré-requisito para o gerenciamento de recursos genéticos (BJORNSTAD et. al., 2002), e tem implicações para estratégias de melhoramento futuro.

Atualmente os marcadores moleculares são as ferramentas mais eficazes para essa caracterização, especialmente para o melhoramento genético das espécies de interesse econômico. Dentre os marcadores disponíveis, destacam-se os microssatélites e as sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) como uma fonte de informações históricas sobre populações e processos evolutivos (GOLDSTEIN et al., 1999; BOWLING et al., 2000; VILA et al., 2001; MIROL et al., 2002; KIVISILD et al., 2004; MATISOO-SMITH, et al., 2009; GLAZEWSKA, 2010; GUASTELLA et al., 2011).

O objetivo deste estudo foi caracterizar a variabilidade genética do grupamento Baixadeiro, descrevendo características fenotípicas, e através do sequenciamento da região D-loop do DNA mitocondrial e de 8 loci de microssatélites gerando dados úteis ao manejo do grupamento e ao seu reconhecimento como raça.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Coleta de amostras**

Foram analisadas amostras provenientes de cavalos Baixadeiro de cinco municípios da Baixada Maranhense (figura 2): Pinheiro (n = 30), Bacurituba (n = 30), Viana (n = 30), São João Batista (n = 30) e Arari (n=30), com um total de 150 amostras. Os municípios foram escolhidos pela facilidade de contatos com os criadores e pelo tamanho das tropas, onde temos tropas maiores nos municípios de Pinheiro, Viana e Arari, e tropas menores nos municípios de Bacurituba e São João Batista.

Os cavalos foram escolhidos pelo perfil fenotípico, apresentando características, específicas do grupamento Baixadeiro, como: pelagem tordilha, castanha, rosilho ou baio; porte pequeno, robusto, leve em sua aparência geral e de musculatura definida; cabeça de tamanho médio, de perfil subconvexo para retilíneo, olhos médios e vivos e orelhas bem implantadas; ossatura seca e forte, tendões delicados, pele e pelos finos; temperamento ativo (SERRA, 2004). Foram anotadas as informações relativas à idade, peso, altura, pelagem e relação de parentesco entre os indivíduos.

Para análise genética foi usado sangue de cavalo Baixadeiro das maiores e das menores tropas identificadas (considerando o isolamento geográfico entre os grupos). Foram anotadas as informações relativas à idade, peso, altura, pelagem e relação de parentesco entre os indivíduos. De cada animal foram coletados 4 ml de sangue mediante venopunção jugular, em frasco de 5 mL contendo tampão de easy blood ou EDTA. O

DNA foi extraído segundo protocolo de Medrano et al., (1990) com precipitação por NaCl e armazenados a -20°C.

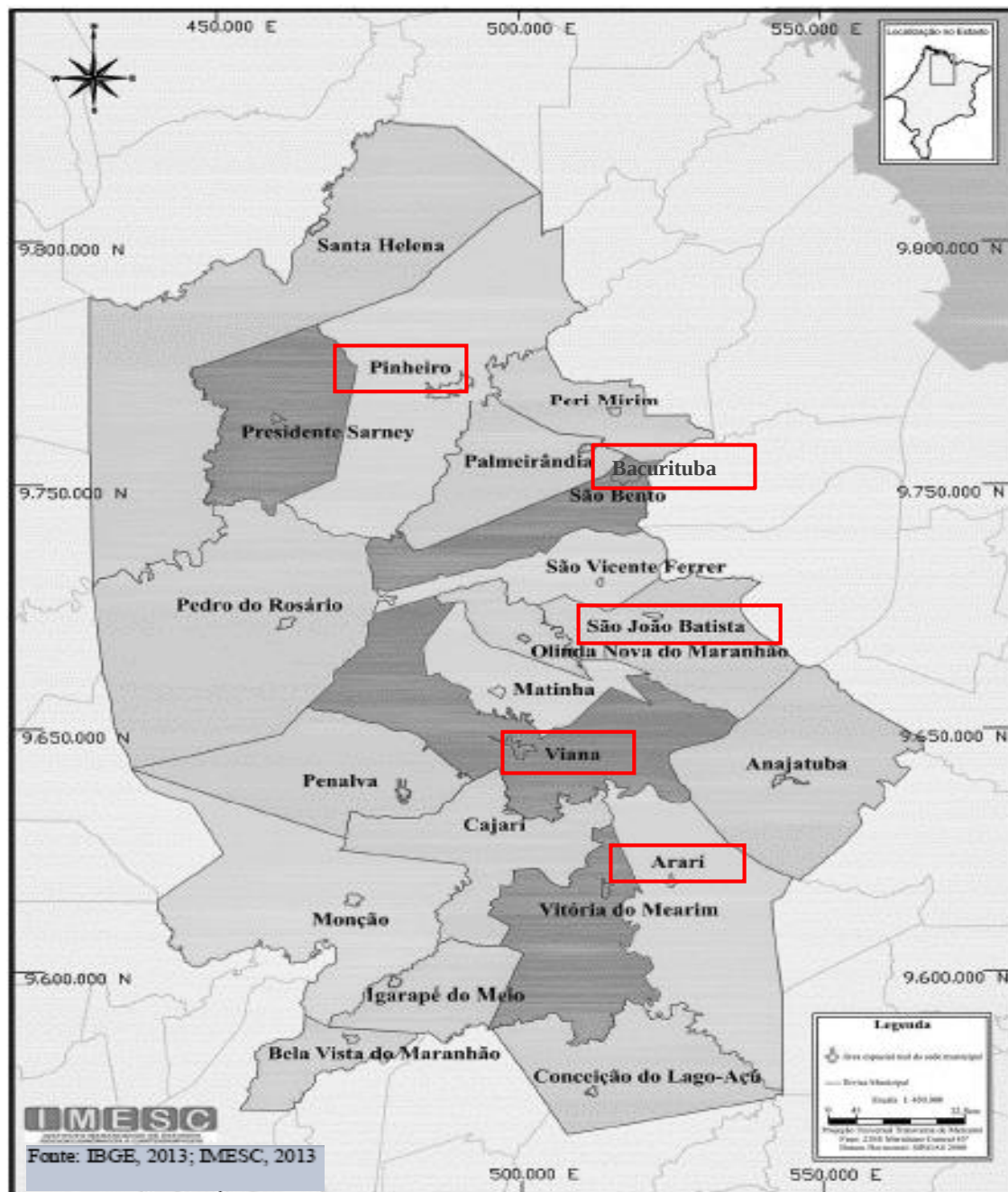


Figura 2. Mapa da Baixada Maranhense indicando os municípios de coleta dos animais utilizados no presente estudo.

Tabela 1. Origem geográfica dos haplótipos definidos por um fragmento de 516pb da região controladora do DNA mitocondrial de *Equus caballus* e número de indivíduo por haplótipo (NH).

|                 |                   | POPULAÇÕES          |              |                              |               |        |                                                                    |                                                                                                |
|-----------------|-------------------|---------------------|--------------|------------------------------|---------------|--------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <sup>1</sup> NH | <sup>2</sup> Freq | Pinheiro            | Bac.         | Viana                        | S. J. Batista | Arari  | Raças                                                              | Origem                                                                                         |
| Hap1            | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Garrano 1                                                          | AY246235.1                                                                                     |
| Hap2            | 2                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Garrano 2 e Kazakh 2                                               | AY246232.1<br>JQ710922.1                                                                       |
| Hap3            | 7                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Garrano 3, Guizhou1, Irish 6, Shetland 1 e 2, Ponei de Gales 1 e 2 | AY246233.1<br>JQ710929.1<br>DQ327941.1<br>AY246255.1<br>AY246256.1<br>AY246216.1<br>AY246214.1 |
| Hap4            | 8                 | -                   | Ec 35        | Ec63<br>Ec64<br>Ec68<br>Ec69 | -             | Ec125  | Garrano 4, Baise 1                                                 | AY246234.1<br>GQ203132.1                                                                       |
| Hap5            | 2                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Garrano 5 e Cheju 1                                                | AY246231.1<br>KR361848.1                                                                       |
| Hap6            | 2                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Cheju 2 e Pônei de Gales 3                                         | AF354440.1<br>KR361871.1                                                                       |
| Hap7            | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Guizhou 2,                                                         | JQ710927.1                                                                                     |
| Hap8            | 4                 | -                   | -            | -                            | Ec 95         | Ec 125 | Guizhou 3, Debao 3,                                                | JQ710932.1                                                                                     |
| Hap9            | 2                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Guizhou 4                                                          | JQ710933.1                                                                                     |
| Hap10           | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Kazakh 1                                                           | JQ710924.1                                                                                     |
| Hap11           | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Kazakh 3                                                           | JQ710923.1                                                                                     |
| Hap12           | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Ningqiang 1                                                        | JQ710912.1                                                                                     |
| Hap13           | 1                 | -                   | -            | -                            |               |        | Baise 2                                                            | GQ203129.1                                                                                     |
| Hap14           | 1                 | -                   | -            |                              | -             | -      | Baise 1                                                            | GQ203130.1                                                                                     |
| Hap15           | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Debao 1                                                            | FJ392570.1                                                                                     |
| Hap16           | 1                 | -                   | -            | -                            | -             | -      | Debao 2                                                            | FJ392580.1                                                                                     |
| Hap17           | 9                 | Ec1 Ec3<br>Ec4 Ec15 | Ec34<br>Ec35 | -                            | -             | -      | Irish 1 e 2, Lusitano 1                                            | AJ413742.2<br>AY246247.1<br>DQ327943.1                                                         |

|       |   |      |      |   |   |       |                       |                                        |
|-------|---|------|------|---|---|-------|-----------------------|----------------------------------------|
| Hap18 | 2 | -    | -    | - | - | -     | Irish Draught 1 e 2   | DQ327942.1<br>DQ327940.1               |
| Hap19 | 2 | -    | -    | - | - | -     | Irish 5 e Luisitano 4 | DQ327938.1<br>AY246248.1               |
| Hap20 | 1 | -    | -    | - | - | -     | Shetland 3            | AY246253.1                             |
| Hap21 | 1 | -    | -    | - | - | -     | Lusitano 2            | AJ413743.2                             |
| Hap22 | 2 | -    | -    | - | - | -     | Lusitano 3            | AY246244.1                             |
| Hap23 | 2 | -    | -    | - | - | -     | Exmoor 1 e 3          | AY246224.1<br>AY246220.1               |
| Hap24 | 1 | -    | -    | - | - | -     | Exmoor 2              | AY246223.1                             |
| Hap25 | 2 | -    | -    | - | - | -     | Cáspio 1 e 2          | AY246197.1<br>AY246196.1               |
| Hap26 | 3 | -    | -    | - | - | -     | Árabe 1, 3 e 4        | AY246185.1<br>AY246182.1<br>AY246183.1 |
| Hap27 | 2 | Ec12 | -    | - | - | -     | Árabe 2               | AY246180.1                             |
| Hap28 | 1 | -    | -    | - | - | -     | Akhal teke 1          | AY246175.1                             |
| Hap29 | 1 | -    | -    | - | - | -     | Akhal teke 2          | AY246176.1                             |
| Hap30 | 1 |      | Ec32 | - | - | -     | -                     |                                        |
| Hap31 | 1 | -    |      | - | - | Ec124 | -                     |                                        |

<sup>1</sup>NH = número de haplótipos, <sup>2</sup>Freq = frequência Hap = haplotipo, Ec = *Equus Caballus* Bac=Bacurituba

## 2.2 Amplificação da região controle do mtDNA.

Para obtenção de fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial, foram realizadas reações de PCR (Reação em cadeia da polimerase) utilizando os primers descrito por KAVAR et al., (2002): HDF (5'-AGTCTCACCATCAACACCCAAAGC-3') e HDR (5'ACTCATCTAGGCATTTTCAGTG-3').

Cada reação realizada teve o volume final de 20µL contendo 50µl do DNA total extraído, 20µM dNTPs, 1 X PCR DE TAMPÃO, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4U Taq Polymerase e 10 pmol de primers HDF e HDR. A amplificação foi realizada no PxE 0.2 Thermal Cycler Thermo com os seguintes ciclos termais: desnaturação por 2 min a 94°C, anelamento de 49°C por 60 s e extensão final por 2 min a 72°C. O resultado da PCR foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo e posteriormente visualizado em transiluminador ultravioleta. Os fragmentos amplificados

foram purificados utilizando o Kit de Purificação Wizard/Promega seguindo o protocolo e recomendações do fabricante.

O sequenciamento de amostras foi feito na empresa na ACTGene Analises Molecular Ltda (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre – RS) utilizando o sequenciador automático *ABR-PRISM* 3100 Genetic Analyzer armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (applied biosystem).

### **2.3.1 Análises estatísticas**

Foram utilizadas 17 sequências de DNA mitocondrial de cavalo baixadeiro que foram visualmente verificadas, corrigidas manualmente, e posteriormente alinhadas através do CLUSTAW/MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013).

Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram calculados através do Programa DNA sp v.5 (LIBRADO et al., 2009) e obtidas pelo programa MEGA 6.0. Para essas últimas análises consideramos tanto o total das amostras obtidas (n=17) quanto as sequencias obtidas a partir do NCBI *Genbank* (n=48), sob números de acesso (tabela 1): AY246235.1, AY246232.1, JQ710922.1, AY246233.1 JQ710929.1 DQ327941.1 AY246255.1 AY246256.1 AY246216.1 AY246214.1, AY246234.1 GQ203132.1, AY246231.1 KR361848.1, AF354440.1, KR361871.1, JQ710927.1, JQ710932.1, JQ710933.1, JQ710924.1, JQ710923.1, JQ710912.1, GQ203129.1, GQ203130.1, FJ392570.1, FJ392580.1, AJ413742.2, AY246247.1, DQ327943.1, DQ327942.1, DQ327940.1, DQ327938.1, AY246253.1, AJ413743.2, AY246244.1, AY246224.1, AY246220.1, AY246223.1, AY246197.1, AY246196.1, AY246248.1, AY246185.1, AY246248.1, AY246182.1, AY246183.1, AY246180.1, AY246175.1 e AY246176.1.

Foram criadas duas redes de haplotipos, a primeira com sequencias pertencentes ao grupamento Baixadeiro (n=17) e a segunda rede relacionando o grupamento Baixadeiro com sequencias de raças de cavalo (n=48) de diferentes origens geográficas, perfazendo um total de 65 amostras analisadas, através do programa Network 4.6.1.0 (<http://fluxus-engineering.com>).

### **2.4 Amplificação dos microssatélites**

Oito *loci* de microssatélites foram utilizados neste estudo (tabela 2): VHL20, UM011 (VAN HAERINGEN et al., 1994); HMS02, HMS03, HMS06, HMS07 (GUÉRIN et al 1984.); HTG7, HTG06 (ELLEGRÉN et al.1992), para 150 cavalos Baixadeiro dos 5 municípios da Baixada Maranhense estudados nesse trabalho. Os critérios utilizados para

selecionar esses loci foram o alto nível de heterozigosidade, grande número de alelos e amplificação fácil.

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas em um volume final de 10 µl contendo: 2,5 µl de cada iniciador (Primer), 3µl de máster mix Promega, 1 µl de água ultrapura Promega e 1µl de DNA. Submetidos em um Termociclador com temperatura inicial de 95°C por 5 minutos e 36 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e, finalizando a uma temperatura de 72°C por 5 minutos. Os produtos de amplificação foram verificados em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Os primers para os loci utilizados foram marcados com os fluorocromos FAM e HEX e genotipados em sequenciador automático na empresa Helixxa - Genomics Service Provider.

Tabela 2 - Pannel de microssatélites utilizados.

| LOCUS | REFERENCIAS                | TEMPERATURAS DE ANELAMENTO |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| HMS02 | GUÉRIN et al 1984          | 56                         |
| HMS03 | GUÉRIN et al 1984          | 56                         |
| VHL20 | VAN HAERINGEN et al., 1994 | 60                         |
| UMO11 | VAN HAERINGEN et al., 1994 | 57                         |
| HTG07 | ELLEGREN et al.1992        | 55                         |
| HTG06 | ELLEGREN et al.1992        | 56                         |
| HTG08 | ELLEGREN et al.1992        | 55                         |
| HMSO7 | GUÉRIN et al 1984.         | 57                         |

#### 2.4.1 Análises estatísticas

O programa GeneMArker foi utilizado para analisar e classificar o tamanho dos alelos. A partir dos dados obtidos para os *loci* de microssatélites foi efetuado o cálculo das frequências alélicas em cada população. Para estimar a variabilidade genética foram observados o número de *locus* polimórficos, número de alelos por *locus* e número de diferentes alelos por população. A existência de desequilíbrio de ligação entre os *loci* foi testada para todos os pares de *locus*.

Para determinação de desvios ao HWE, tanto para os núcleos individualmente, como para o total dos indivíduos, recorreu-se ao programa GENEPOP v 4.0 (RAYMOND, 1995b), usando o Teste exato de HW de Weir (1996) e deficiência de heterozigotos. Neste, o valor de p é determinado segundo dois algoritmos, o de Loris e Dempsta – quando o número de alelos é inferior a 5 – e o de cadeia de Markov, que estima

um valor de p sem enviesamento (GUO et. al., 1992) – quando o número de alelos é igual ou superior a 5.

Para estimar a estruturação entre as populações, foi usada a estatística F (WRIGHT, 1965) através de dois de seus estimadores: F(st) (WEIR et. al., 1984) e Rho(st) (ROUSSET, 1996).

Todas as análises acima foram processadas no programa GENEPOP 4.30 (RAYMOND et. al., 1995). Os valores de F(st) e F(is) para os dois estimadores tiveram sua significância testada através do teste de X<sup>2</sup> ( $X^2 = F_{st} \times 2N(k-1)$ ;  $X^2 = (F_{is})^2 \times N(k-1)$ ).

### 3.RESULTADOS

#### 3.1 Análise Fenotípica

Para o cavalo Baixadeiro encontramos valores diferentes dos encontrados em outro trabalho (SERRA, 2004), com médias de alturas maiores tanto para macho como para fêmea (tabela 3). A pelagem predominante foi a tordilha, embora encontramos animais nas pelagens baio e castanho. Foram incluídos animais de diferentes idades, todos adultos, com idade variando de 2,0 a 15 anos.

É bastante escassa na literatura a caracterização fenotípica e genotípica, em equinos, especialmente de raças naturalizadas brasileiras, impossibilitando a realização de muitas comparações.

Tabela 3. Médias dos parâmetros analisados em 150 animais na Baixada Maranhense.

| PARÂMETROS      |            |           |           |           |          |      |          |
|-----------------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|------|----------|
|                 | Idade/anos | Peso/kg   | Altura    |           | Pelagem% |      |          |
|                 |            |           | Fêmea     | Macho     | Tordilha | Baio | Castanho |
| Valores min-max | 2.0-15.0   | 134 – 290 | 1,16-1,30 | 1,18–1,32 | 36,6     | 33,3 | 30,1     |
| Médias          | 6.5        | 250,0     | 1,30      | 1,32      |          |      |          |

### 3.2 Região controladora do DNA mitocondrial

O fragmento obtido resultou em uma sequência de 516 pb, apresentando um total de 31 haplotipos (Tabela 1) registrando uma diversidade nucleotídica  $\pi$  de 0,02037 e diversidade haplotípica  $H_d$  de 0,967. Um total de 95 sítios foram polimórficos e 55 sítios informativos para parcimônia.

O grupamento Baixadeiro apresentou 6 haplótipos, os quais também foram compartilhados com as demais raças comparadas, com exceção dos haplótipos H30 e H31, que não haviam sido descritos no conjunto de sequências extraídas do *GenBank*, encontrados apenas nos animais de Viana e Arari respectivamente. A frequência dos haplótipos observada para todas as raças comparadas e para o grupo Baixadeiro pode ser visualizada na Tabela 1.

Visando comparação e maiores esclarecimentos a respeito do cavalo Baixadeiro e sua herança genética a partir de diferentes raças, foram construídas duas redes de haplótipos. Nas redes (networks) da Figuras 3 e 4 podem ser observados compartilhamentos de haplótipos entre as populações dos diferentes municípios de BM.

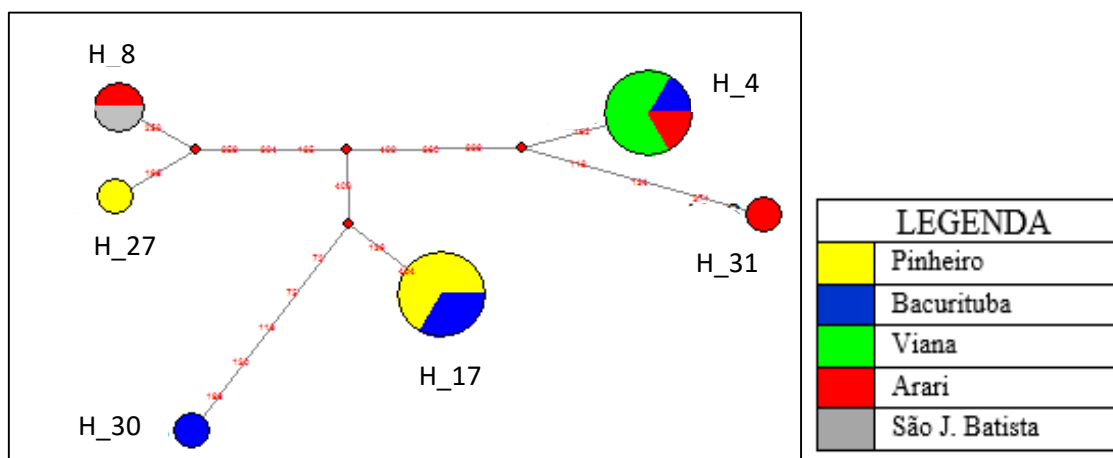


Figura 3. Rede de haplótipos gerada pelo método de median-joining (BANDELT et al., 1999) a partir de sequências da região D-loop do mtDNA do grupamento Baixadeiro de cinco municípios da BM. Os círculos representam as sequências haplotípicas, sendo a área dos mesmos proporcionais a frequências do haplótipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo, estando o número de mutações entre haplótipos indicado em vermelho (números).

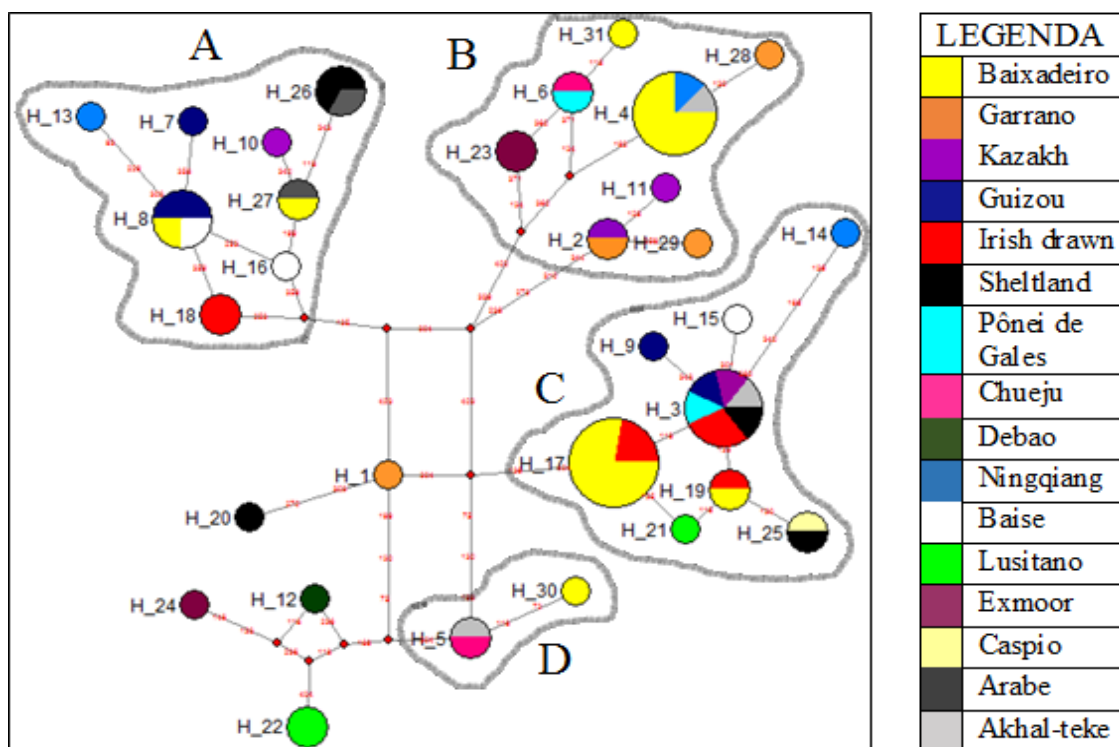


Figura 4. Network gerada pelo método de median-joining (BANDELT et al., 1999) a partir dos haplótipos obtidos para um fragmento de 516pb da região D-loop do DNA mitocondrial de cavalos do grupamento Baixadeiro e de 15 raças diferentes. Os círculos representam as sequencias haplotípicas, sendo a área dos mesmos proporcionais a frequências do haplotipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplotipo, estando o número de mutações grafado em vermelho. A figura está dividida em 4 haplogrupos (A, B, C e D), mostrando o compartilhamento de haplotipos entre o cavalo baixadeiro e raças distintas.

O primeiro network (Fig. 3), mostra que os haplotipos H4 e H17 foram os mais compartilhados, onde observou-se uma predominância nas populações de Viana e Pinheiro respectivamente e haplotipos menos frequentes foram H8, H27, H30 e H31.

O segundo network (Fig. 4) construído com base nas sequencias obtidas para os 66 indivíduos analisados mostrou 4 haplogrupos, nomeadamente haplogrupos A, B, C e D, apresentando indivíduos do grupamento genético Baixadeiro dividindo haplótipos com raças de cavalos de diferentes origens. Os haplogrupos B e C são os que apresentaram maior frequência de indivíduos, com  $n=18$  e  $n=22$  respectivamente. Verificando-se que no haplogrupo C estão incluídos quase metade dos indivíduos analisados ( $n=22$ ). O haplogrupo menos representado, no total de indivíduos em análise, foi o D. Vários haplótipos apresentam ramificação em estrela (Hap2, Hap3, Hap8, Hap17, Hap19 e Hap27), ou seja, tem mais do que um haplotipo derivado (Figura 4).

### 3.3 Microsatélite

#### 3.3.1 Características dos *loci* analisados

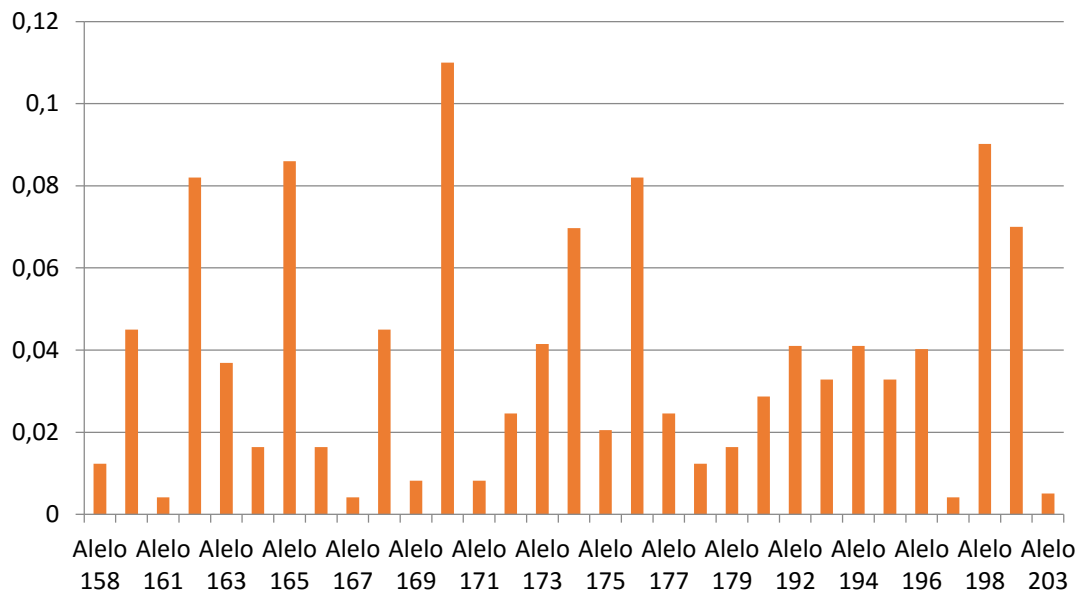
Todos os oito *loci* analisados mostraram-se polimórficos, apresentando um total de 259 alelos para os 150 animais analisados. A média de alelos por município foi de 8,74 (variando de 0,83 para 1,50) tabela 4.

Considerando-se os oito *loci*, o HMS07 foi o com maior número de alelos (n=45), e o *loci* com menor número foi UMO11 com (n=25) diferentes alelos.

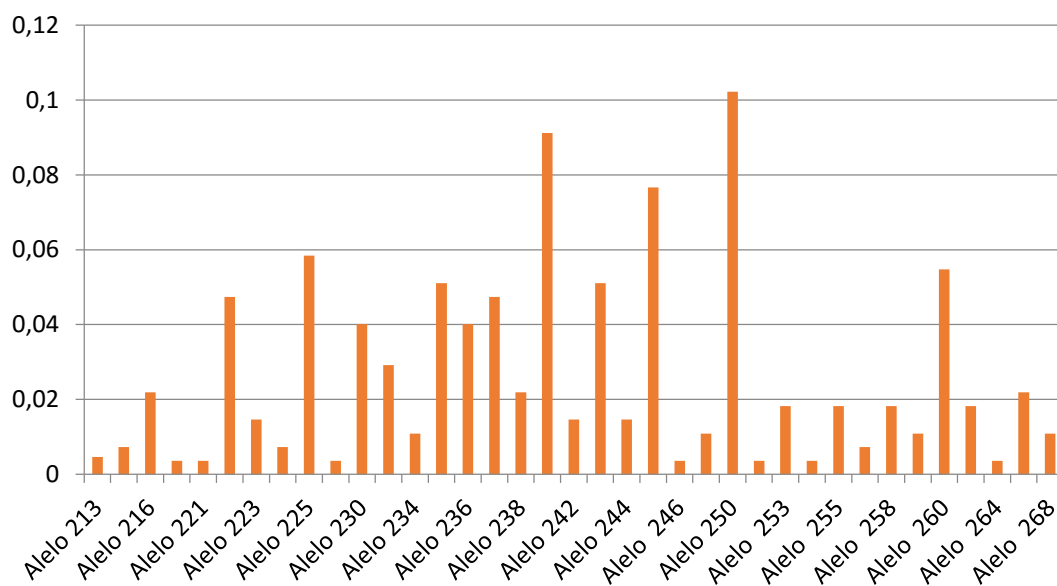
**Tabela 4.** Número de alelos obtidos para cada *locus* e variação do tamanho em pares de base para os alelos de cada *locus*.

| LOCI  | NÚMERO DE ALELOS | TAMANHO DOS ALELOS |
|-------|------------------|--------------------|
| VHL20 | 31               | 163 – 178          |
| HMS03 | 37               | 213 – 237          |
| HTG06 | 30               | 160 – 175          |
| HMS07 | 45               | 208 – 237          |
| HMS02 | 35               | 158 – 199          |
| UMO11 | 25               | 215 – 250          |
| HTG07 | 28               | 156 – 197          |
| HTG08 | 32               | 206 – 243          |

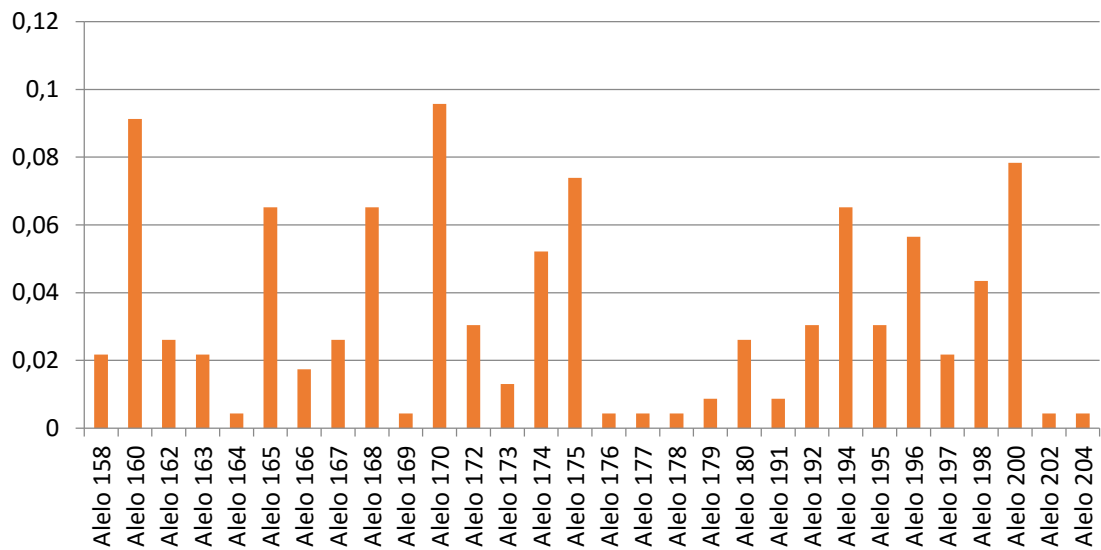
Os gráficos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 mostram as frequências alélicas para os 8 *loci* de microsatélites analisados.



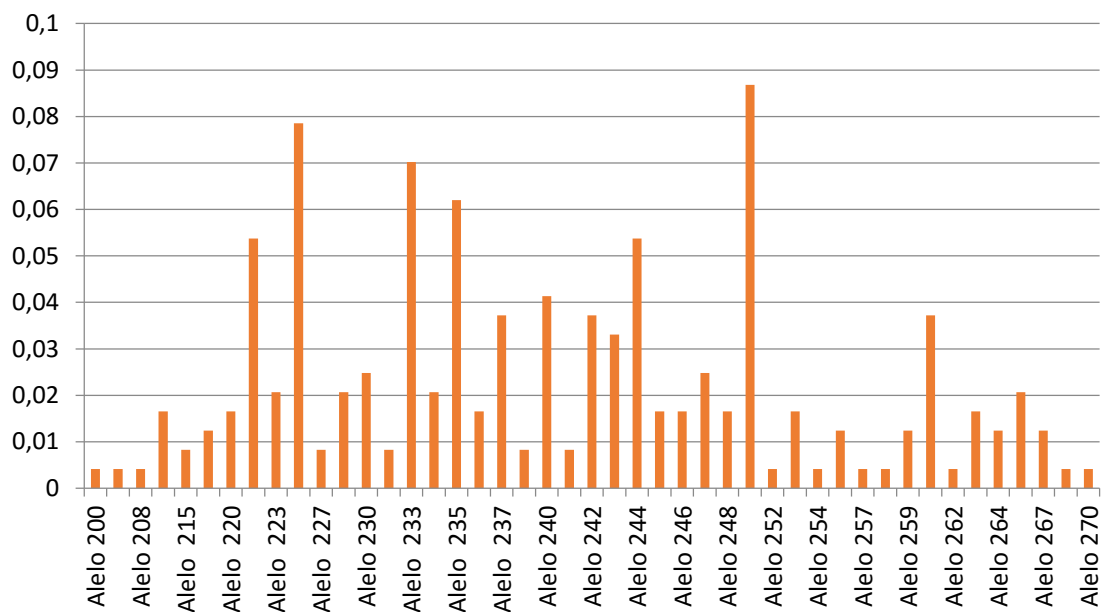
**Figura 5.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* VHL20 nas populações para as cinco populações.



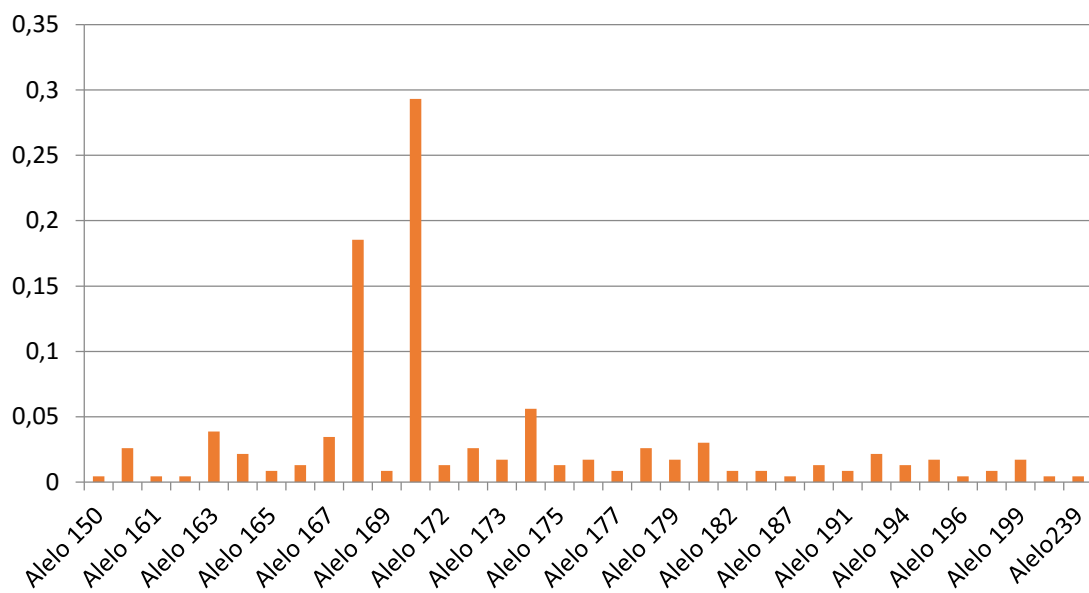
**Figura 6.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* HMS03 nas populações para as cinco populações.



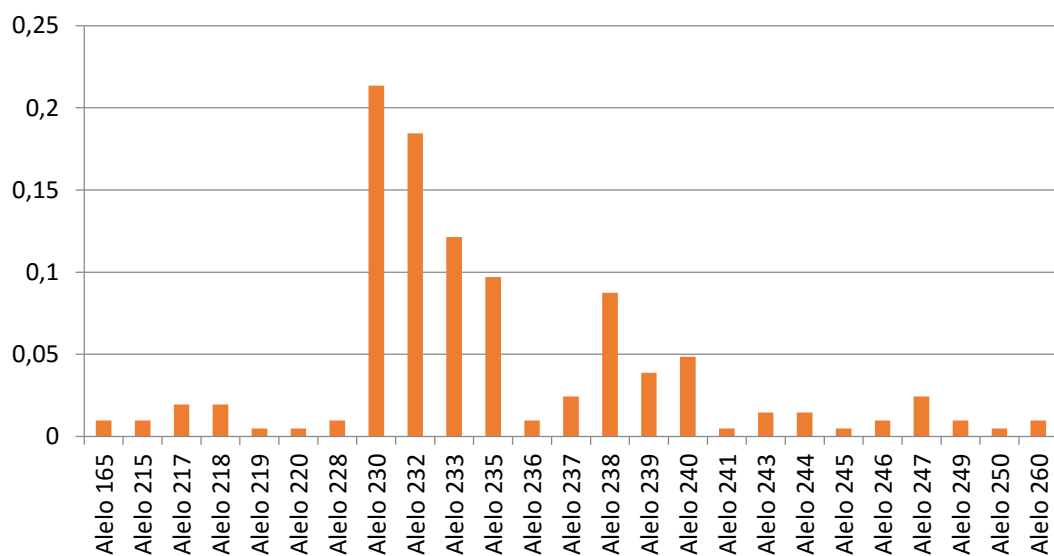
**Figura 7.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* HTG06 nas populações para as cinco populações.



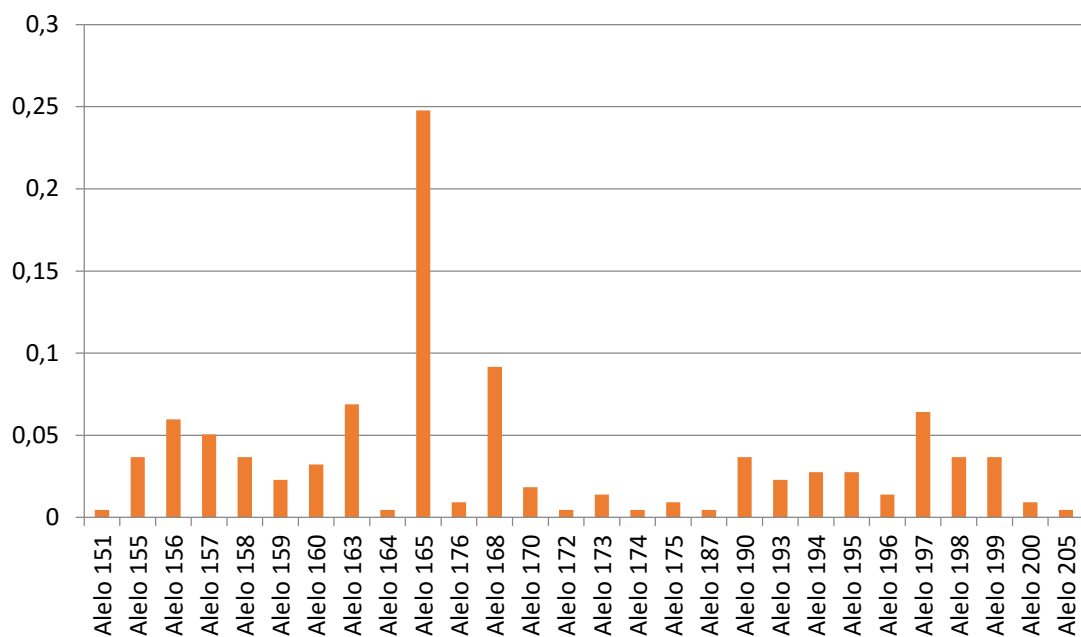
**Figura 8.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* HMS07 nas populações para as cinco populações.



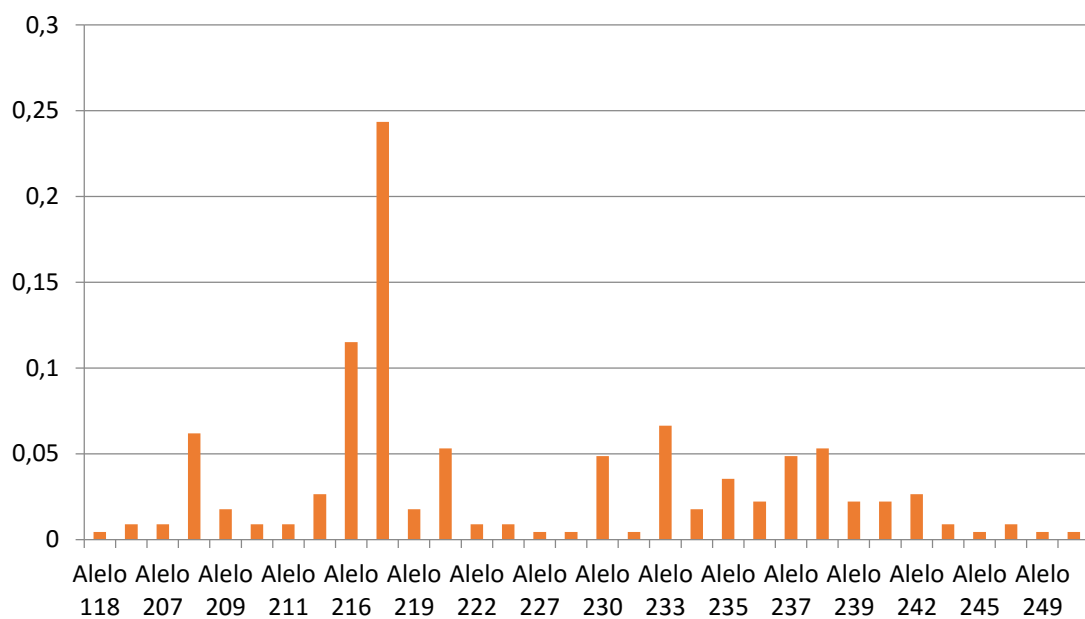
**Figura 9.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* HMS02 nas populações para as cinco populações.



**Figura 10.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* UMO11 nas populações para as cinco populações.



**Figura 11.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* HTG07 nas populações para as cinco populações.



**Figura 12.** Frequência dos diferentes alelos para o *locus* HTG08 nas populações para as cinco populações.

### 3.3.2 Estrutura populacional

O teste para o desequilíbrio de ligação indicou que nenhum dos loci está ligado na amostra (após correção de BONFERRONI, menor valor de  $p$  considerado  $< 0,0005$ ).

Quando testados os loci quanto ao Equilíbrio de Hardy Weinberg considerando as populações e os loci separadamente, obtivemos valores de  $F(is)$  (deficit de heterozigotos indicativo de endocruzamento) entre 1 e 0,01, todos significativos ( $p < 0,005$ ) para o teste estatístico. Na análise que englobou todos os cavalos em uma única população também houve significância para a deficiência de heterozigotos para todos os loci ( $p < 0,005$ ). Os valores para o coeficiente de endocruzamento para a análise global dos loci em cada população, através dos estimadores  $F(is)$  e  $Rho(is)$  estão nas tabelas 5 e 6.

Quando consideradas todas as populações, observou-se valores médio de  $F(st)=0,5790$  e  $Rho(st)=0,6592$  ( $p < 0,05$ ). Para estimador  $Rho(st)$ , considerando-se apenas as populações mais próximas entre si, a estruturação mostrou-se mais forte entre as populações de Arari e Viana (0.8044) sendo significativo o valor obtido para  $Rho(st)$  ( $p < 0,05$ ). Os menores valores de  $F(st)$  e  $Rho(st)$ , diferentes de zero (0,4144 e 0,1834 respectivamente) foram obtidos nas populações de Arari e entre Arari e Viana. Para as populações de Arari existe maior concordância entre os diferentes estimadores, com valor de  $F(st)$  de 0.4144 e  $Rho(st)$  de 0.4482 (tabela 5 e 6).

Tabela 5. Valores de  $Rho(st)$  (ROUSSET, 1996) entre os pares de populações.

| Populações          | Pinheiro | Bacurituba | Viana  | São J.<br>Batista |
|---------------------|----------|------------|--------|-------------------|
| Bacurituba          | 0.3389   |            |        |                   |
| Viana               | 0.7251   | 0.5670     |        |                   |
| São João<br>Batista | 0.7149   | 0.5730     | 0.1824 |                   |
| Arari               | 0.5752   | 0.4482     | 0.8044 | 0.6865            |

Tabela 6. Valores de F(is) (WEIR et, al., 1984) e de Rho(is) (ROUSSET, 1996), para os *locus* em conjunto, considerando cada população.

| POPULAÇÕES       | FIS    | RHO (IS) |
|------------------|--------|----------|
| Pinheiro         | 0.6564 | 0.9268   |
| Bacuritua        | 0.6401 | 0.6714   |
| Viana            | 0.6641 | 0.4730   |
| São João Batista | 0.5201 | 0.7730   |
| Arari            | 0.4144 | 0.4520   |

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização fenotípica

As raças nativas ou naturalizadas são constituídas por animais que se encontram por longo período sob ação da seleção natural em determinados ambientes, a ponto de apresentarem características fenotípicas específicas dessas condições (BICALHO, 1985). O fenótipo diz respeito à interação entre genótipo e ambiente e é expresso através de caracteres quantitativos e qualitativos, cor da pelagem em equinos, entre outros. De acordo com Domingues (1960), as características, que dizem respeito ao exterior do animal, são os mais importantes na diferenciação racial, por serem os mais prontamente distinguíveis, mais fáceis de serem classificados, e em geral também os de maior transmissibilidade genética.

A análise fenotípica realizada em 150 cavalos Baixadeiros (tabela 3), mostra que as médias de alturas encontradas foram diferentes dos valores relatados por SERRA (2004), que para o cavalo Baixadeiro relatou altura média de 1,28 (macho) e 1,23 (fêmea). Para os cavalos analisados no presente estudo encontramos valores médio altura de 1,30 para fêmea e 1,32 dois para machos. Pelas médias de altura o cavalo Baixadeiro pode ser considerado animal de pequeno porte, porém, parece estar passando por um processo de mudança de porte, característica que remete a introdução de raças de pônei bastante resistentes na ilha de Marajó para cruzamento com o cavalo Marajoara e formação da raça Puruca, que historicamente contribuiu geneticamente formação do cavalo Baixadeiro (MCMANUS, 2010).

Essas diferenças podem estar atribuídas ao processo de melhoramento genético que esses animais vêm sofrendo, com a introdução de reprodutores de importantes raças

comerciais como Quarto de milha (média de altura 1,57), Mangalarga Machador (média de altura 1,42) e Apaluza (média de altura 1,55) (observado *in loco*), visando maior porte, beleza fenotípica, importância econômica e maior produtividade.

Quando comparadas com as raças melhoradas, as nativas apresentam menor produtividade, porém não existem dúvidas quanto à sua capacidade de adaptação às condições mais inóspitas de clima e geografias diversas, associados à rusticidade, que o torna adapta as condições (MARIANTE et al., 2002, 2009; EGITO et al., 2002).

A predominância da pelagem tordilha (Tabela 3), encontrada neste trabalho (36,3%), pode estar associada a preferência de alguns criadores e proprietários, pois consideram que são animais mais resistentes e dispostos para a lida diária. Além desse aspecto, sabe-se da ocorrência de dominância da pelagem tordilha em relação as pelagens baio e castanho, uma vez que, o alelo dominante da série G responsável pela pelagem tordilha é epistático, ou seja, sempre que estiver presente no genótipo, vai se manifestar no fenótipo (REZENDE et. al., 2007).

#### **4.2 Origem do cavalo Baixadeiro e variação genética para o DNA mitocondrial**

Há um amplo debate e diferentes linhas de pesquisa em torno de 'quando e onde' ocorreu a domesticação do cavalo (OLSEN, 2003). Acredita-se que Península Ibérica pode ter servido como um importante refúgio glacial para o cavalo e que esta região também pode ter sido o local de domesticação (LOPES et al., 2005).

Segundo Primo (1993) o Brasil foi o único país do continente americano que recebeu raças de origem portuguesa. Houve também introdução de animais de origem espanhola (MAZZA et al., 1994).

O cavalo Baixadeiro é oriundo do cruzamento de equino de origem Ibérica, provavelmente dos cavalos Garrano e Berbere introduzido no Brasil no período colonial. É um grupo de cruzamento centenário restrito a região da Baixada Maranhense (GAZOLLA et al., 2009). Trata-se de uma raça local que vem sendo explorada comercialmente, estando sujeita a pressões seletivas frequentes.

A presença de seis haplótipos de mtDNA para 17 animais analisados reflete (tabela 1), em termos de linhas maternas, uma base genética bastante variável no grupamento Baixadeiro, e quando observada a distribuição geográfica desses haplótipos percebe-se a ausência de estruturação populacional. Este elevado número de haplótipos não pode ser atribuído a cruzamentos contemporâneos com outras raças, pois as introduções são normalmente mediadas por machos, não sendo detectadas na análise do

mtDNA. Pode derivar do sistema de criação, sem seleção restritiva dos animais, e da distribuição metapopulacional da raça (dividido em pequenos núcleos), permitindo a manutenção de um elevado número de haplótipos.

Na rede (network) da Figura 3 podem ser observados o possível fluxo gênico entre as populações. Isso pode ser percebido pelo intenso compartilhamento de haplotipos entre os cinco municípios estudados, porém se torna mais acentuada entre os municípios de maior proximidade (figura 2). Segundo Luikart et al., (2001) uma fraca estruturação genética e geográfica é característica de raças domésticas e tem sido atribuída ao extensivo transporte multicontinental destes animais desde o momento da sua domesticação.

O conhecimento da estruturação populacional de animais domésticos pode fornecer orientações valiosas para estratégias de conservação e gestão, especialmente para pequenas populações (LOPES, 2012), como é o caso do cavalo Baixadeiro.

Quando incluídas sequências de animais de 15 raças provenientes de diferentes regiões do planeta, um total de 31 haplótipos (Tabela 2) foi descrito. Muitos desses são compartilhados por diferentes raças e são muito frequentes, como é o caso do H4 e H17 (tabela 2), encontrado em 6 municípios da Baixada e em raças distintas como Garrano, Baise, Irish Draught e Lusitano, representando prováveis haplótipos ancestrais. Trabalhos anteriores também verificaram uma grande heterogeneidade de linhas maternas em distintas raças de cavalos e grande compartilhamento de haplótipos entre elas (HILL et al., 2002; JANSEN et al., 2002; SECO-MORAIS 2007). Os dados apresentados nesse trabalho confirmam esses estudos, uma vez que os haplótipos da Baixada são compartilhados com raças de diferentes origens. Essa falta de diferenciação racial pode ser atribuída ao curto período de tempo decorrido desde a seleção dos animais em diferentes raças, que não foi suficiente para acumular mutações diferenciais. Neste caso, não significa que os dados de sequências sejam insuficientes, apenas não conseguem refletir a origem recente das raças e caracterizá-las como entidades discretas (Bradley, 1996). Outros autores, no entanto apoiam que este cenário se deve ao fato de que cavalos foram domesticados a partir de várias populações selvagens (LISTER et al., 1998; VILÁ et al., 2001).

Considerando tal discussão, a região D-loop do mtDNA não seria conclusiva para investigar se há mais de uma origem materna para a formação do grupamento Baixadeiro, ou ainda se podem ter existido momentos distintos de introgressão de equinos nesse grupo, mesmo sendo essa a região mais informativa do DNA mitocondrial, conforme

BRUFORD et. al., (2003). Embora seja extremamente informativo, o mtDNA possui suas limitações como marcador para estudos filogenéticos em animais domésticos e no estudo da dinâmica dos rebanhos da atualidade (BRUFORD et. al., 2003).

De qualquer forma, a análise da sequência da região *d*-loop do mtDNA de cavalo Baixadeiro representa um primeiro passo na elucidação de questões a respeito da origem deste grupamento genético no Brasil. É possível notar que muitos haplótipos são exclusivos para as diferentes raças, inclusive nos animais da Baixada como H27, H30 e H31 presentes nas populações de Pinheiro, Bacurituba e Arari respectivamente. Tais haplótipos indicam uma tendência à diferenciação entre as populações, e alertam para a importância de preservar a variabilidade genética nesses animais, pois os haplótipos raros estão sujeitos a um maior risco de extinção por deriva genética.

Observa-se também três haplótipos mais frequentes (H4, H8 e H17). Segundo Avise (2000) se espera que os haplótipos mais antigos estejam em maior frequência que os mais recentes, sendo mais provável que um haplótipo raro seja derivado de um comum do que de outro raro.

É possível inferir ainda, que dentre as linhagens incluídas na rede de haplótipos, o haplogrupo C é o mais representativo, considerando tanto o número de haplótipos quanto o número total de indivíduos e a distribuição em diferentes raças, maiores que os valores encontrados para o haplogrupos A e C.

No haplogrupo C há alta prevalência de raças da Europa e Ásia de onde vieram as raças formadoras das raças nativas brasileiras. Dados históricos demonstram que as brasileiras derivam principalmente de raças ibéricas. Estudos relatam que a maioria das raças europeias tem origem a partir do tronco asiático (ADAMETZ, 1943; EPSTEIN, 1984; CAMAC, 1989), o que elucidaria esta proximidade das raças naturalizadas com as raças asiáticas.

Segundo Primo (1993) o Brasil foi o único país do continente americano que recebeu raças de origem portuguesa. Esses animais foram introduzidos através do porto de São Vicente no ano de 1534 (LIMA et al., 1990) e com desembarque de animais na costa de Pernambuco e na Bahia (MARIANTE et al., 2006). Além das raças portuguesas, houve a introdução de animais de origem espanhola (MAZZA et al., 1994).

Quanto a diversidade haplotípica obtida para os cavalos Baixadeiros, esta mostrou-se inferior ao número observado para o Lusitano  $H=0,84$  (LOPES et al., 2005), os Cavalos Ibéricos  $H=0,924$  (LUIS et al., 2006), e para o Pura Raça Espanhola  $H=0,90$  (LOPES et al., 2005). No entanto, estes valores são superiores aos apresentados pela raça

portuguesa Sorraia  $H=0,43$  (LOPES et al., 2005). Essa redução do número da diversidade haplótica da raça Sorraia, pode ser explicada pelo efeito gargalo que essa raça passou, com uma intensa redução do seu efetivo. É importante enfatizar que em animais domésticos a diversidade genética é moldada por intervenções humanas, principalmente com fins de produtividade.

#### **4.3 Variabilidade genética por microsatélites.**

Os marcadores microsatélites, por apresentarem um alto grau de polimorfismo, são amplamente utilizados para caracterizar a variabilidade genética em espécies domésticas tais como: bovinos, ovinos, suínos, asininos e equinos podendo ser usados com confiabilidade na caracterização dos rebanhos (KUMAR e et. al., 2000; BRUFORD e et. al., 2003).

No Brasil ainda são poucos os estudos de variabilidade em equinos naturalizados, porém, onde prevalece o uso de técnicas moleculares há destaque para análises com microsatélites, como nos trabalhos de Silva et al., (2012) que estudaram a variabilidade genética em sete raças de cavalo de diferentes estados do Brasil, incluindo o cavalo Baixadeiro, utilizando onze loci de microsatélites. O estudo mostrou que as raças naturalizadas são grupos genéticos distintos, com razoável variabilidade genética, mostrando níveis elevados de endogamia.

Giacomini et. al., (2007) caracterizaram equinos da raça Pantaneiro de diferentes fazendas de Mato Grosso utilizando 10 loci microsatélites, as análises das relações genéticas mostraram que existe preocupações imediatas sobre perda de variação dentro do Pantaneiro. Costa (2009) estudaram distancia genética em equinos de 15 raças brasileiras com base em 22 loci de microsatélites mostram que o cavalo Marajoara está bem estruturado geneticamente, muito próximo da raça Puruca e bastante diferenciado das outras raças analisadas. Valores de heterozigosidade ligeiramente superiores foram obtidos por Sereno (2002), caracterizando a raça Pantaneira com doze marcadores, dentre um foi analisado neste trabalho (HMS07). Nossos resultados indicam baixa variabilidade genética para os cavalos Baixadeiro quando empregados esses marcadores nucleares e comparados aos trabalhos já realizados.

Os *loci* HTG6 e HMS7 foram os que apresentaram maior número de alelos por loci, com 38 e 45 alelos por *locus* respectivamente, diferente dos valores encontrados por De Assis et. al., (2006) analisando a estrutura genética da população de cavalos da raça Mangalarga Marchador, que obteve apenas 6 alelos para HTG6.

O *locus* HTG7 apresentou o menor valor médio de alelos/*locus* quando em relação aos outros *locus* estudados, porém esse valor foi maior quando comparamos a outros estudos nos quais esse mesmo *locus* foi utilizado. No estudo de Silva et. al., (2012), para sete diferentes raças equinas, o número máximo de alelos para esse *locus* foi dez. Barker (1994) sugere para estudos de diversidade a utilização de *loci* com, no mínimo, quatro diferentes alelos.

Para HTG04 e VHL20, Sereno (2002) estudando a raça Pantaneiro, encontrou 6 e 9 alelos respectivamente. Valores menores que os revelados para os cavalos Baixadeiro (tabela 4). Outros autores trabalhando com microssatélites em diferentes raças de cavalos encontraram menor número de alelos por *locus* em raças italianas (PIERAGOSTINI et al., 2005), portuguesas (LUIS et al., 2007) e asiáticas (SHAHSAVARANI et al., 2010). Eles justificam esses resultados, podendo ser reflexo de uma falta de programas de melhoramento estruturado para estas raças, bem como marcadores utilizados e a estrutura da população.

Alta variabilidade obtida pode indicar altos níveis de fluxo gênico entre populações, ou, no caso das raças, contribuição de várias linhagens genéticas na formação do grupamento. Para o Baixadeiro, a segunda opção é mais aceita, visto que, quando consideramos os valores de  $F(is)$  e  $Rho(is)$  que são indicadores dos níveis de endogamia, obtemos valores altos e significativos (tabela 5 e 6). A endogamia refere-se a acasalamentos entre indivíduos geneticamente relacionados, afetando o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, aumentando as frequências dos homozigotos (HARTL et. al., 1989).

Os altos coeficientes de endogamia para as populações de cavalos Campolina e Mangalarga Marchador foram já relatados (PROCÓPIO, 2000; COSTA et al., 2004), o que não acontece para cavalos da raça Brasileira de Hipismo, onde o coeficiente médio de endogamia foi de praticamente zero, devido à existência de apenas 151 animais endogâmicos em um universo de 11.508 animais (DIAS, 1998). Onde o pequeno número de animais endogâmicos deve-se ao grande número de raças e acasalamentos utilizados e, ao recente tempo de formação da raça Brasileira de Hipismo.

Desvios significativos dos valores de  $F(is)$  indicando déficit de heterozigosidade, foram observadas para os loci ASB3 e LEX031 por De Assis (2006), estudando cavalos da raça Mangalarga Machador. GIACOMINI et. al., (2007) encontrou valores menores de  $F(is)$  para a raça Pantaneira em diferentes fazendas do Mato Grosso, Ipiranga  $F(is) = 0,147$ ; Promissão  $F(is) = 0,108$  e Nova Esperança  $F(is) = 0,094$ ). É sugerido por Galal

(2005) que este fato esteja diretamente relacionado a cruzamentos não aleatórios que ocorrem frequentemente em raças domésticas com baixo tamanho efetivo.

Em populações domésticas a condição de acasalamento aleatório normalmente é limitada (ou ausente), já que a permanência de animais em um rebanho está sujeita a interferências humanas, principalmente devido a critérios de seleção artificial (SIMPLÍCIO et. al., 2007). Na Baixada Maranhense, em contrário, os rebanhos equinos são criados soltos sem controle reprodutivo, porém estão sujeitos a isolamento geográficos no período de cheias dos campos, sendo um possível fator limitante ao fluxo gênico, pois interfere diretamente no tamanho efetivo dos rebanhos.

FRANKHAM et al., (2002) relata que qualquer população de tamanho efetivo reduzido e dividida em pequenas subpopulações muitas vezes isoladas, como é comum para os equinos, sofre estrangulamentos na variabilidade genética e ocorrência de *inbreeding* (endogamia). Esses são fatores de suma importância, porém em populações naturais, sem interferências, esses fatores seriam praticamente inexistentes, segundo os princípios de Wright (1951).

A estruturação genética avaliada através do  $F_{st}$ , mostrou que os valores foram significativos ( $p < 0,05$ ), e revelou um valor médio diferenciação de 0,588 entre as populações (tabela 5 e 6). A forte estruturação populacional para os microssatélites entre os cinco municípios estudados contraria os resultados informados pelo mtDNA nesse trabalho, que mostrou fluxo gênico entre as populações. Esse antagonismo de resultados pode ser explicado por características inerentes aos dois marcadores: as taxas mutacionais dos microssatélites são mais altas, capazes de capturar eventos mais recentes de diferenciação populacional, ao passo que o mtDNA refletiria melhor as relações históricas. Ainda, o mtDNA é transmitido pelas fêmeas e o DNA nuclear, onde se localizam os microssatélites sofrem transmissão pelos dois sexos. Nesse sentido, os resultados podem evidenciar o efeito de consanguinidade causado pelo uso de um garanhão para fecundar várias fêmeas, enquanto o mtDNA seguiria uma dispersão maior. Provavelmente tanto o efeito da taxa mutacional quanto da dispersão diferencial entre sexos estão envolvidos no cenário descrito.

Em sistemas de criação extensivo de equídeos, alguns reprodutores sexualmente maduros possuem harém ou realizam coberturas terrorizadas (KEIPER, 1985; KLINGEL, 1975, 1982).

Diferindo dos valores que encontramos nesse trabalho, Tkaicka et. al., (2002) estudando populações de *ctenomys minutus* da planície costeira do Sul do Brasil

encontraram alto índice de isolamento comparando as populações de Gaivota e Torres  $F(st)= 0,0739$ . Atribuindo esse isolamento ao efeito da distância entre estas populações como sendo o determinante principal da ausência de fluxo gênico.

A fragmentação dos habitats modifica atributos como taxas de reprodução, distribuição etária da população, mortalidade e proporção sexual (GOODMAN,1987). Barreira física da presença de rios ou lagoas diminui a possibilidade de dispersão dos indivíduos, diminuindo as taxas de fluxo gênico. A longo prazo processos genéticos podem ser desencadeados, como a deriva genética e endocruzamento, e consequentemente a perda de variabilidade (LACY, 1997; BRODERS et al., 1999).

FERNANDEZ (2002) analisou três populações de *C. flamarioni* utilizando quatro *loci* de microssatélites. As populações mostraram estruturação entre si, com  $F(st)=0,322$ . Quando comparadas par a par as populações mostram índices de  $F(st)$  concordantes com o isolamento pela distância.

Costa et al. (2005), estudaram as raças Marajoara e Puruca utilizando marcadores microssatélites, estes autores observaram elevada similaridade genética entre ambas as raças, e com raças de cavalos Ibero-Americana, citados como fundadores da raça Marajoara.

Lippi et. al., (2003) comparou a raça Mangalarga Marchador a uma raça intimamente relacionada, o Mangalarga, mas com características morfológicas de marcha distinta, valor de  $FST$  para estas duas raças foi estimado em 0,117, portanto, a distância entre as duas raças diferentes duplica o valor observado.

Em nosso estudo, a média de valor estimado  $F(st)=0,0588$  entre as populações é menor do que os relatados para as populações de Bilgoraj e cavalos Franchez-Montagne, ambos com estimativas de  $F(st)=0,1$  (ZABEK et. al., 2005; GLOWATZKI-MULLIS et. al., 2006).

Os microssatélites indicam, assim, que o grupamento Baixadeiro está dividido em subpopulações, e que estas sofrem efeito de endocruzamento. Apesar da população, ter tamanho relativamente grande, com aproximadamente 4.000 indivíduos (CHAVES et. al., 2004).

Estudos com diferentes espécies de animais têm mostrado efeitos prejudiciais da endogamia sobre as características do valor adaptativo. A depressão endogamia surge porque a endogamia aumenta a probabilidade de um indivíduo vir a ser homozigoto para alelos recessivos deletérios, que estejam segregando na população. Os alelos deletérios

são tidos como a causa mais importante da depressão endogâmica (FALCONER et. al., 1996).

A baixa heterozigosidade no grupamento genético Baixadeiro (tabela 5) sugere que a necessidade de se delinear estratégias de melhoramento capaz de preservar a variabilidade genética e evitar os efeitos da depressão por consanguinidade.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Em análise conjunta dos dados obtidos em nosso estudo, podemos inferir que o “Baixadeiro” provavelmente recebeu material genético de diferentes raças em seu processo de formação, que contribuíram para alta variabilidade genética apresentada pelo grupamento. Apesar da variabilidade genética apresentar-se elevada e o tamanho populacional ser ainda considerável, registramos subestruturação populacional, índices elevados de endocruzamento e perda de características fenotípicas (altura), observações que devem ser consideradas na elaboração de planos de manejo para esses animais, afim de resguardar a viabilidade desse estoque genético a longo prazo.

## REFERENCIAS

ALLENDORF F. W. LUIKART G. **Conservação e da genética de populações**. Blackwell Publishing; Malden: 2007. P.642.

Avice J. C.; Phylogeography: the history and formation of species. In **Harvard University Press Cambridge**, MA: Harvard University Press. 2000.

BARKER, J. S. F. **A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds**. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Canada. p.501-508, 1994.

BICALHO, H.M.S. Grupos sangüíneos e polimorfismos de proteínas do sangue da raça Caracu (*Bos taurus taurus*). Análise populacional. Belo Horizonte, 1985, 114p. (**Dissertação de Mestrado**). Universidade Federal de Minas Gerais, 1985.

BJØRNSTAD, O. N.; ROLF A. I.; XAVIER L.; **Spatial population dynamics: analyzing patterns and processes of population synchrony**. Volume 14, p427–432, 1 November 1999.

BOWLING A.T.; DEL VALLE A. BOWLING M.: A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. **Anim Genet** 2000, 31(1):1–7.

BOWLING A.T.; DEL VALLE A.; BOWLING M.: A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. **Anim Genet** 2000, 31(1):1–7.

BRAGA, R.M. (2000). Cavalo Lavradeira em Roraima: Aspectos Históricos, Ecológicos e de Conservação. **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, Brasília, 39-87.

BRODERS, H.G.; MAHONEY, S.P.; MONTEVECCHI, W.A.; DAVIDSON, W.S. Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. **Molecular Ecology**, 8: 1309-1315, 1999.

CAMAC R. O., **Introduction and Origins of the Donkey**, in: Svendsen E.D. (Ed.), **The professional handbook of the Donkey**, 2nd edn., The Donkey Sanctuary, Sidmouth,

CHAVES, D. P.; BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; VAZ, J. F. R.; ANUNCIAÇÃO A. R.; Soroprevalência de mormo, anemia infecciosa equina e brucelose do cavalo baixadeiro. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 39-42, jan./mar. 2015.

COSTA, M.D., et al., (2004) Caracterização demográfica da raça Mangalarga Marchador. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 56, n.5, 687-690.

COSTA, M.D., et al.; Estudo da subdivisão genética da raça Mangalarga Marchador. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 57, n.2, 272- 280, 2005.

DEASSIS, J. B.; DeLA A. T; PEIXOTO, D. M; BERGMANN M. G. C. D.; FONSECA, J. A. G. C. G.; CARVALHO, M. R. S. MICROSATELLITE DIVERSITY AND POPULATION STRUCTURE IN THE BRAZILIAN MANGALARGA MARCHADOR HORSE. **Animal Genetics**, 2006.

DIAS, I. M. G. (1999). Formação e estrutura populacional do equino brasileiro de hipismo. (**Dissertação de mestrado**) UFMG, Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

DOMINGUES, O. **Contribuição e estudo do cavalo Pantaneiro**. Rio de Janeiro: MA/IZ, 1975. 19p.

EGITO, A. A; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE M.S.M.. PROGRAMA BRASILEIRO DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS ANIMAIS. **Archivos de zootecnia** vol. 51, núm. 193-194, p. 40.

ELLEGREN, H., JOHANSSON, M., SANDBERG, K., ANDERSON, L. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. **Anim. Genet.**, 23, 133-142, 1992.

EMBRAPA. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Data Base 2005. Disponível em <http://WNW.cenargen.embrapa.br/cenargenda/pdf/baixadeiro.pdf> Acesso em 3/04/2008.

EPSTEIN, H.; MASON, I. Cattle. In: Mason, L. (Ed.). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, p.6-27, 1984.

Falconer, D. S.; Mackay, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Longman: Essex, England, 1996.

FERNÁNDEZ, G.P., 2002. Análise de estrutura Populacional e da Variabilidade Genética em Três Populações de *Ctenomys flamarioni* (Rodentia, Ctenomyidae) Através de *loci* de Microsatélites (**Dissertação de Mestrado**) Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS; Porto Alegre.

FRANKHAM R., BALLOU J.D., BRICOE D.A. Introdução a Conservação genética. **Cambridge University Press**; Cambridge: 2002. P.617.

GAZOLLA, A. G.; SERRA, O. R.; LIMA, F. C. PELAGENS DO CAVALO DA RAÇA BAIXADEIRA. In: **46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2009. Maringá-PR, 14 a 17 de julho de 2009, p.1-3.

GIACOMONI, E. H., G. P; STOLZ, F; FREITAS, T. R. O. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. **Genetics and Molecular Research** 7 (1): 261-270 (2008).

GIACOMONI, E. H.; FERNÁNDEZ-STOLZ, G.P.; FREITAS, T.R.O. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. **Genetics and Molecular Research** 7 (1): 261-270 (2008).

GLAZEWSKA I.: Speculations on the origin of the Arabian horse breed. **Livest Science** 2010, 129(1-3):49-55.

GLOWATZKI-MULLIS, M. L. Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franchez-Montagnes breed. **Animal genetics**, 37, 33-39(7), 2006.

GOLDSTEIN, A. L.; MCCUSKER J. K. **Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae***. v.15, 1541–1553, 1999.

GOODMAN, D. The Demography of Chance Extinction. In: Soulé, M.E. (ed.) **Viable Populations for Conservation**. Cambridge: University Press p.11-34, 1987.

GOU, J. (1992) **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices** (version 2.9.3) (<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>).

GUASTELLA A. M.; ZUCCARO A.; CRISCIONE A.; MARLETTA D.; BORDONARO S.: Genetic Analysis of Sicilian Autochthonous Horse Breeds Using Nuclear and Mitochondrial DNA Markers. **J. Heredity** 2011, 102(6):753–758.

GUÉRIN, G; BAILLEY, E; BERNOCO, D. AND ANDERSON, I (2002). The second generation of the international equine gene mapping workshop half-sibling linkage map. **International Society Animal Genetics**. 34: 161-168.

HARTL, D.L. & Clark, A.G. (1989) Principles of population genetics. 2 ed. **Sinauer Associates**, Inc. Sunderland, Massachusetts. 1982.

HILL R. J.; Exact second-order structure-function relationships. National Oceanic and Atmospheric Administration, **Environmental Technology Laboratory**, Boulder, CO 80305-3328, USA.

JANSEN, T., FORSTER, P., LEVINE, M. A., OELKE, H., HURLES, M., RENFREW, C., WEBER, J., OLEK, K. (2002) Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. **PNAS**, 99, 10905-10.

KAVAR, T.; BREM, G.; HABE, F. et AL. History of lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 635-648, 2002.

KEIPER, R.R. Social organization of feral ponies. **Proc. Pennsylvania Acad. Sci.** 50: 945.1976.

KIVISILD T.; REIDLA M.; METSPALU E.; ROSA A.; BREHM A.; PENNARUN E.; PARIK J.; GEBERHIWOT T.; USANGA E.; VILLEMS R.: Ethiopian mitochondrial DNA heritage: tracking gene flow across and around the gate of tears. **Am J Hum Genet** 2004, 75(5):752–770.

KLINGEL, H. Social organization and reproduction in equids. **J. Reprod. Fertil.**, Suppl 23, 7-11. 1975.

KLINGEL, H. Social organization of feral horses. **J.Reprod. Fertil.**, Suppl 32, 89-95.

KUMAR, P.; FREEMAN, A. R.; LOFTUS, R. T.; GAILLARD, C.; Fuller, D. Q.; BRADLEY, D. G. Admixture analysis of South Asian cattle. **Heredity**, v.91, n.1, p. 43-50. 2003.

LACY, R.C. Importance of genetic variation to the viability of mamalian population. **Journal of Mamalogy**, 78: 320-335, 1997.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p.1451-1452, 2009.

LIMA, M. L. P.; NETO, L. M. B.; RAZOOK, A. G. O gado Caracu. **Revista dos Criadores**. outubro, p. 28-30. 1990.

LIPPI, A. S.; MORTARI, N. (2003) Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Mangalarga (Equus caballus) population structure. **Evolution**, 38 (6), 1358-1370.

LISTER M.; The European union's green paper on relations with the African, Caribbean and pacific countries. **Oxford Development Studies**, 1998.

LOPES, D. D.; VARIABILIDADE GENÉTICA, ESTRUTURA POPULACIONAL E RELAÇÕES EVOLUTIVAS DE CABRAS CRESPOS COM BASE EM MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES E DNA MITOCONDRIA. **(Dissertação de Mestrado)**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – UFRGS, Porto Alegre, 2012.

LOPES, M. S., CYMBRON, T., VALERA, M., COSTA-FERREIRA, J.D. The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. **Animal Genetics**, 36, 196-202, 2005.

LOPES, M. S.; CYMBRON, T.; VALERA, M.; COSTA-FERREIRA, J.D. (2005) The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation. **Animal Genetics**, 36, 196-202.

LUIKART G, GIELLY L, EXCOFFIER L, VIGNE J-D, BOUVET J & TABERLET P **Multiple maternal origins and weak phylogeographic structure in domestic goats**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98: 5927–5932. 2001.

LUIS C.; COTHRAN, E.G.; OOM, M.M.; Inbreeding and genetic structure in the endangered Sorraia horse breed: implications for its conservation and management. **J. Hered.** 98: 232-237. 2007.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa Sede / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 232 p.

MARIANTE, A.; CAVALCANTE, N. Animais do Descobrimento – raças domésticas da história do Brasil. **2ª ed. Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, 274p., 2009.

MARIANTE, A. S.; EGITO A. A.; Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, V.1, p. 223–235, 2002.

MATISOO-SMITH E.; ROBINS J.: Mitochondrial DNA evidence for the spread of Pacific rats through Oceania. **Biol Invasions** 2009, 11(7):1521–1527.

MATISOO-SMITH E.; ROBINS J.: Mitochondrial DNA evidence for the spread of Pacific rats through Oceania. **Biol Invasions** 2009, 11(7):1521–1527.

MAZZA, M.C.M.; MAZZA, SERENO C.A.S.; SANTOS. J.R.B.; PELLEGRIN, S.A A.O. **Etnobiologia e conservacao do bovino pantaneiro**. P.imprenta: Corumba: EMBRAPA-CPAP / Brasilia: EMBRAPA-SPI, 1995,61p.

MCMANUS; PAIVA, J.R.F.M.S.; SEIXAS, L. Cavalos Marajoaras e Puruca. **Série Técnica: Genética**. Publicado “on line” em animal. unb.br. 2010.

MEDRANO, J. F.; AESEN, E.; SHARROW, L. DNA Extraction from Nucleated Red Blood Cells. **Biotechniques**, v.8, n.1, p. 43, 1990.

MIROL P.M.; GARCIA P.P; VEGA P.L.A.; DULOUT F.N.: Phylogenetic relationships of Argentinean Creole horses and other South American and Spanish breeds inferred from mitochondrial DNA sequences. **Anim Genet** 2002, 33(5):356–363.

OLSEN SL. (2003) A exploração de cavalos em Botai Cazaquistão. In: **Prehistoric Steppe Adaptação e do Cavalo** (Ed by. M.Levine,C.Renfrew & K.Boyle), pp. 83 - 103. McDonald Instituto para Investigação Arqueológica, Cambridge, Reino Unido. Devon, p.1-10, 1989.

PIERAGOSTINI E.; RIZZI R.; BRAMANTE G.; ROSATI A Genetic study of Murgesse horse from genealogical data and microsatellites. **J. Anim. Sci.** 4: 197-202, 2005.

PRIMO, A. T. El ganado bovino Iberico en las Americas: 500 anos despues. **Arch. Zootec.**, v.41, p. 421-432. 1992.

PROCÓPIO, A. M. (2000). Formação e demografia da raça Campolina. (**Dissertação de mestrado**), UFMG, Escola de Veterinária, Belo Horizonte.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. (1995) GENEPOP (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J. Hered.**, 86, 248-249.

REZENDE, A.S.C. E COSTA, M.D. **Pelagem dos equinos: Nomenclatura e genética**. 2ª ed. FEPMVZ. Belo Horizonte. 112 pp. 2007.

ROUSSET, F. Equilibrium values of measure of population subdivision. **Genetics and Molecular Biology**, 26, 4, 431-434, 1996.

SANTOS, E.G. Ecologia da polinização, fluxo de pólen e taxa de cruzamento em *Bauhinia forficata* Link. (Caesaloiniaceae). Piracicaba, 2003. 114p. (**Dissertação de Mestrado**) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

SECO-MORAIS, J. The Evolution of the Horse (*Equus caballus* L., 1758) in the Iberian Peninsula: a molecular approach (**PhD dissertation**). Lisboa: Universidade de Lisboa, Portugal, 219 pp.2007.

SERENO, F. T. P. S. Caracterización genética del caballo pantaneiro. 2002.126 f. (**Tese de doutorado**). Faculdade de Veterinária, Universidade de Córdoba, Córdoba,2002.

SERRA, O.R. Condições de manejo, preservação e caracterização fenotípica do grupamento genético equino baixadeiro, 2004. Dissertação (**Dissertação de Mestrado**) - Universidade Estadual do Maranhão, 2004. 84p.

SHAHSAVARANI H.; RAHIMI-MIANJI G. Analysis of genetic diversity and estimation of inbreeding coefficient within Caspian horse population using microsatellite markers. **Afr. J. Biotech.** 9: 293-299, 2010.

SILVA A.C.M., PAIVA S.R., ALBUQUERQUE M.S.M., EGITO A.A., SANTOS S.A. LIMA F.C., CASTRO S.T., MARIANTE A.S., CORREA P.S., MCMANUS C.M. **Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers.** Genetics and Molecular Research 11 (2): 881-890, 2012.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; FONSECA, J. F.; (2007) Biotecnias da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Rev. Bras. Reprodução Animal**, 31(2): 234-246.

TAMURA K, S. G, PETERSON D, F.A; KUMAR S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729.

TCHAICKA L. ANÁLISE DE DUAS POSSÍVEIS BARREIRAS AO FLUXO GÊNICO ENTRE POPULAÇÕES DE *Ctenomys minutus* (RODENTIA CTENOMYIDAE) DA PLANÍCIE COSTEIRA DO SUL DO BRASIL (**Dissertação de Mestrado**). UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, Portp Alegre, 2002.

VILA C. LEONARD J.A.; GOTHERSTROM A.; MARKLUND S.; SANDBERG K.; LIDEN K.; WAYNE R. K.; ELLEGREN H.: Widespread origins of domestic horse lineages. **Science** 2001, 291(5503):474–477.

VILA C. LEONARD J.A.; GOTHERSTROM A.; MARKLUND S.; SANDBERG K.; LIDEN K.; WAYNE R. K.; ELLEGREN H.: Widespread origins of domestic horse lineages. **Science** 2001, 291(5503):474–477.

WEIR, B., COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of for stepwise mutation processes. **Genetics**, 142: 1357-1362. 1894.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, 16, 97-159, 1984.

ZABEK, T.; NOGAJ, A., RADKO, A.; NOGAJ, J.; SLOTA, E. Genetic variation of Polish endangered Bilgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. **Journal of applied Genetics** 46(3), 299-305, 2005.