

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DENEA DE ARAÚJO FERNANDES PIRES

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REMANESCENTES DA RAÇA EQUINA  
NORDESTINA EM MESORREGIÕES DOS ESTADOS DA BAHIA, PERNAMBUCO E  
PIAUÍ ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

RECIFE - PE

2012

DENEA DE ARAÚJO FERNANDES PIRES

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REMANESCENTES DA RAÇA EQUINA  
NORDESTINA EM MESORREGIÕES DOS ESTADOS DA BAHIA, PERNAMBUCO E  
PIAUI ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Zootecnia (PPGZ) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientadora: Maria Norma Ribeiro, DSc.  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Coorientadora: Denise Aparecida Andrade de  
Oliveira, DSc.  
Universidade Federal de Minas Gerais

RECIFE - PE  
JULHO - 2012

Ficha catalográfica

P667c Pires, Denea de Araújo Fernandes  
Caracterização genética de remanescentes da raça equina nordestina em mesorregiões dos Estados da Bahia, Pernambuco e Piauí através de marcadores microssatélites / Denea de Araújo Fernandes Pires. -- Recife, 2012.  
101 f. : il.

Orientadora: Maria Norma Ribeiro.  
Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Zootecnia, Recife, 2012.

Inclui referências e apêndice.

1. Diversidade genética 2. Biologia molecular 3. Cavalo Nordestino I. Ribeiro, Maria Norma, orientadora II. Título

CDD 636

**DENEA DE ARAÚJO FERNANDES PIRES**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE REMANESCENTES DA RAÇA EQUINA  
NORDESTINA EM MESORREGIÕES DOS ESTADOS DA BAHIA, PERNAMBUCO  
E PIAUÍ ATRAVÉS DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

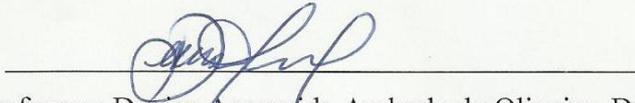
Dissertação defendida e aprovada pela comissão examinadora em 30 de julho de 2012.

Orientadora:



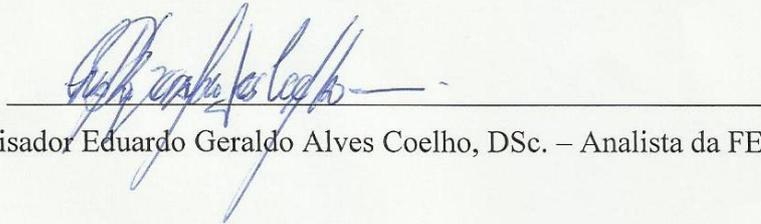
Professora Maria Norma Ribeiro, DSc.  
(Universidade Federal Rural de Pernambuco – DZ / UFRPE)

Coorientadora:



Professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira, DSc.  
(Universidade Federal de Minas Gerais – EV / DZ / UFMG)

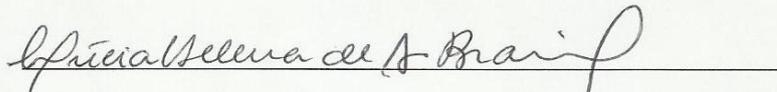
Comissão Examinadora:



Pesquisador Eduardo Geraldo Alves Coelho, DSc. – Analista da FEPMVZ



Professor Jânio Benevides de Melo, DSc. – DEBI / UESB



Professora Lúcia Helena de Albuquerque Brasil, DSc. – DZ / UFRPE

*A Deus, por seu amor incondicional e inexplicável.*

*Aos meus pais, Erineide de Fátima Araújo Pires e Djair José de Menezes Fernandes Pires pelo amor, dedicação, carinho, atenção, paciência e educação.*

*A minha avó, Esmeralda Matias de Araújo (In memoriam) por me fazer sentir a presença de Deus em minha vida.*

*E, as minhas irmãs, Djane Araújo Pires e Dlane de Araújo Fernandes Pires pelo apoio, tolerância e amor.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada se torna vivo, real. E, por Ele me amar e me transformar a cada dia da minha vida. A Jesus, meu amado, que nunca nos abandona, haja o que houver jamais eu te deixarei...

Aos meus pais, Erineide de Fátima Araújo Pires e Djair José de Menezes Fernandes Pires, por fazerem de mim o que eu sou. Às minhas amadas irmãs, Djane e Dlane Pires, pelas palavras de incentivo, amor e paciência, sem esquecer as inúmeras ajudas nas correções. À minha avó Esmeralda (*in memoriam*), por me fazer ver que somente o amor importa e como as palavras e vida de São Francisco de Assis são tão atuais...

Ao meu irmão, professor Dr. Jânio Benevides de Melo, que me ensinou como o amor de Deus também pode fazer parte da ciência. A minha admiração, respeito e amor.

A Dihêgo Augusto, meu estimado companheiro, pelo amor, pelas palavras de apoio e coragem, sem contar nas infinitas ajudas durante a minha jornada para chegar onde estou agora.

Aos meus irmãos e irmãs em Cristo, que estão representados em Thiago Moraes, Aleksander Gonçalves, Liliane Jandira e Rosália Nascimento.

Ao irmão, Dr. Eduardo Geraldo Coelho, sua esposa Janaína e família, por me fazer sentir parte de sua família.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, que me acolheu como família desde os anos do Colégio Agrícola Dom Agostinho Ikas até hoje, sendo uma pedra importante na minha vida profissional e em minhas realizações pessoais. Por todos que fizeram e fazem parte da UFRPE, professores, estudantes e funcionários que me permitiram crescer como pessoa, cidadã e profissional.

À minha orientadora, professora Dra. Maria Norma Ribeiro, por ter me tratado não como uma orientanda e sim como filha.

À professora Dra. Denise Aparecida Andrade de Oliveira, pelas oportunidades, entusiasmo e acreditar no nosso trabalho, mesmo no período em que era ainda estudante de graduação.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Angelo Vicente, Sandra Rodrigues, Diana Silva, Cláudia Teixeira, Ronaldo Nunes, Juliana Vieira, Bruna Souza e demais membros do laboratório de genética da Escola de Veterinária da UFMG, meu muito obrigado pela amizade. Realmente, Minas Gerais, quem te conhece não esquece jamais.

À Associação Equestre e de Preservação do Cavalo Nordestino, em especial ao Luís Cleber Soares Machado e Carlos Augusto Silva (Macaxeira), pelas palavras e atitudes que sempre me inspiraram e motivaram.

Ao cavalo Nordestino, pela oportunidade extraordinária de me fazer adquirir algo que nenhum ser vivo jamais poderá retirar: conhecimentos, sabedoria, respeito, amor, admiração e força. O cavalo Nordestino representa bem o povo Nordestino: é, antes de tudo, um forte!

*“Eu é que sei que pensamentos tenho a vosso respeito, diz o Senhor; pensamentos de paz e não de mal, para vos dar o fim que desejais.”*

*Jeremias, capítulo 29, versículo 11*

*“O sertanejo é, antes de tudo, um forte.”*

*Euclides da Cunha (1984)*

*Os sertões, capítulo III, p.51.*

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos caracterizar geneticamente remanescentes da raça equina Nordestina, divididas em 4 subpopulações (denominadas de JUAZ-BA; AGRE-PE; SERT-PE e NCEN-PI) distribuídas em mesorregiões pertencentes aos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí. E, globalmente, inferir quais raças nacionais e exóticas influenciaram na formação da raça equina Nordestina. O total de 393 animais considerados como remanescentes da raça equina Nordestina foram genotipados através de 14 marcadores microssatélites. Banco de dados de equinos da raça Árabe foram utilizados como *outgroup* para estudo da diferenciação genética entre as 4 subpopulações remanescentes do cavalo Nordestino. E, para o estudo de inferência das raças equinas que participaram da formação do cavalo Nordestino, adotou-se um banco de dados do cavalo selvagem de Przewalski como *outgroup*. As 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina apresentaram elevada diversidade genética, causada possivelmente por cruzamentos indiscriminados, sem desvios significativos no Equilíbrio de Hardy-Weinberg, logo com predominância de acasalamentos ao acaso. Foi observada baixa diferenciação genética (valores de  $G_{st}$ ,  $F_{st}$  e  $\Phi_{pt}$  não significativos) entre as 4 subpopulações avaliadas, verificando o enquadramento das 4 subpopulações em um mesmo grupo pelas técnicas presente no programa STRUCTURE, AMOVA, Análise Fatorial de Correspondência e pelas distâncias genéticas  $D_A$  e  $D_R$ . O elevado fluxo gênico observado entre as 4 subpopulações, assim como a história recente de formação da raça equina Nordestina, podem ter contribuído para a não diferenciação. Nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina avaliadas foram observados excesso de heterozigosidade, sugerindo que as mesmas podem ter sofrido efeito de gargalo de garrafa demográfico e, conseqüentemente, genético, esse último provavelmente não foi recente. Foram detectados resultados semelhantes para a diversidade genética e de efeitos de gargalo de garrafa, quando se analisou as subpopulações como sendo uma única população. As raças equinas nacionais mais próximas do cavalo Nordestino foram: Campolina, seguido pelo Mangalarga Marchador e Mangalarga e isso possibilitou inferir que essas raças participaram da formação da raça equina Nordestina. E, dentre as raças equinas Ibéricas, a Sorraia, de certo modo pareceu exercer maior influência na formação inicial do cavalo Nordestino. Os marcadores microssatélites apresentaram-se satisfatórios, oferecendo valores de Conteúdo Informacional de Polimorfismo (PIC) variando de informativos a altamente informativos.

**Palavras-chave:** Cavalos. Diversidade genética. Estruturação genética. Origem. Polimorfismo

## ABSTRACT

The present research aimed characterizes genetically 4 remnant subpopulations from the Nordeste horse breed and infers which national and exotic horse breeds influenced in the Nordeste horse breed formation. A total of 393 animals that were split into 4 subpopulations at eco-regions belong to Bahia (called JUAZ-BA), Pernambuco (divided into AGRE-PE and SERT-PE) and Piauí (called NCEN-PI). The animals were genotyped with 14 microsatellite markers. Arab horse breed's data were used as outgroup for genetic differentiation analyze among the 4 subpopulations remaining from Nordeste horse breed. Przewalski horse's data were used as outgroup to infer which horse breeds to take part in the formation of the Nordeste horse breed. There was a high genetic diversity in the 4 remnant subpopulations of Nordeste horse breed, probably it may be due to outbreed and/or mating among unrelated individuals. No significant deviations from Hardy-Weinberg Equilibrium with the 4 subpopulations were under random mating. No genetic differences among the 4 subpopulations, so they represented a sample from the same gene pool according STRUCTURE software, AMOVA, Factorial Correspondence Analysis (FCA) and genetic distances:  $D_A$  and  $D_R$ . The 4 subpopulations could be considered part of a single large random mating genetic population because of gene flow and recent history of formation from the Nordeste horse breed. Gene diversity excess was observed suggesting the 4 subpopulations may undergo bottleneck effects (demographic and genetic); however the bottleneck did not occur in a recent period. The results were similar for genetic diversity and bottleneck analyses when the 4 subpopulations were considered as being just one population. Campolina, Mangalarga Marchador e Mangalarga were Brazilian horse breeds closer to Nordeste one. Therefore, those breeds took part in the genetic basis of the Nordeste horse. Among Iberian horse breeds, the Sorraia horses seem to exert greater influence on initial formation of the Nordeste horse breed. The microsatellite markers used in this research were satisfactory because of PIC (Polymorphic Information Content) values ranged from informative to highly informative to the analyzed populations.

**Keywords:** Genetic diversity. Genetic structure. Horses. Origin. Polymorphism

## LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1. Os pontos marcam os países e regiões onde já foram realizados estudos de caracterização genética de raças equinas domésticas, incluindo o cavalo selvagem de Przewalski..... 25
- Figura 2. Mapa de localização das cidades onde foram coletadas as amostras de pelos com bulbos das 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina..... 39
- Figura 3. Distribuição das frequências dos alelos nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram estudadas. O eixo horizontal representa as classes de frequência de alelos e as barras correspondem à proporção de todos os alelos detectados em cada classe..... 58
- Figura 4. Porcentagem da variância molecular com base nos valores da Estatística- $\Phi$ , obtidos pela AMOVA, entre as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina..... 63
- Figura 5. Análise da estrutura das subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina: AGRE-PE, JUAZ-BA, NCEN-PI e SERT-PE e *outgroup* constituído por equinos da raça Árabe para  $K = 2$ ..... 65
- Figura 6. Representação espacial da relação dos indivíduos por subpopulação baseada nos resultados da Análise de Correspondência Fatorial. Indivíduos do *outgroup* ARAB estão representados pela cor rosa, JUAZ-BA pela cor azul, AGRE-PE pela amarela, SERT-PE por cinza e NCEN-PI pela cor branca. O número entre parênteses em cada eixo representa a proporção da inércia total..... 66
- Figura 7. Árvore (dendograma) construída com base na distância genética  $D_A$  (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983). Os valores de reamostragem se encontram no interior da árvore..... 69

Figura 8. Árvore (dendograma) construída com base na distância genética  $D_R$  (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983). Os valores de reamostragem se encontram no interior da árvore..... 69

Figura 9. Distribuição das frequências dos alelos na população avaliada de remanescentes da raça equina Nordestina. O eixo horizontal representa as classes de frequência de alelos e as barras correspondem à proporção de todos os alelos detectados em cada classe..... 73

Figura 10. Árvore originada do consenso de 1000 pseudorréplicas, construída com base na distância genética de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) pelo método da REML (Máxima Verossimilhança Restrita) com a raça equina Nordestina, 66 raças equinas e dados do cavalo selvagem de Przewalski como *outgroup*. Os valores de reamostragem se encontram na árvore..... 77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos marcadores microssatélites utilizados para estudo genético de remanescentes da raça equina Nordestina.....	41
Tabela 2. Programa para amplificação por PCR utilizado para os painéis 1 e 3.....	42
Tabela 3. Programa para amplificação por PCR utilizado para o painel 2.....	42
Tabela 4. Composição genética e valores do Conteúdo de Informação Polimórfica de cada <i>locus</i> microssatélite nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram avaliadas.....	50
Tabela 5. Resumo da diversidade alélica das 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram avaliadas.....	52
Tabela 6. Resumo do teste para efeito de gargalo de garrafa nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram avaliadas.....	59
Tabela 7. Matriz dos valores de $F_{st}$ comparados par a par entre as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina. Os valores de $F_{st}$ se encontram abaixo da diagonal principal e os valores de probabilidades baseados em 999 permutações são mostrados acima da diagonal principal.....	63
Tabela 8. Proporção de indivíduos em cada subpopulação para a formação de 2 grupos ( $K=2$ ).....	65
Tabela 9. Composição genética e valores do Conteúdo de Informação Polimórfica de cada <i>locus</i> microssatélite para remanescentes da raça equina Nordestina avaliados nesta pesquisa.....	71
Tabela 10. Resumo do teste para efeito de gargalo de garrafa na população avaliada de remanescentes da raça equina Nordestina.....	74

## SUMÁRIO

<b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2.0 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Breve histórico da raça equina Nordestina.....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Caracterização genética de equinos no Brasil e no mundo.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Base conceitual para os elementos utilizados nas avaliações da diversidade genética, de possíveis efeitos de gargalo de garrafa e da estrutura populacional.....</b>	<b>27</b>
2.3.1 Diversidade genética.....	27
2.3.2 Gargalo de garrafa.....	29
2.3.3 Estrutura populacional.....	30
<b>3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Coleta das amostras.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2 Caracterização dos locais.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 Extração do DNA genômico, amplificação via PCR, corrida eletroforética e leitura dos eletroferogramas.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4 Análise estatística.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Diversidade genética.....	43
3.4.2 Avaliação do efeito de gargalo de garrafa.....	44
3.4.3 Diferenciação genética / estrutura populacional.....	45
3.4.4 Estudos da diversidade genética, de efeitos de gargalo genético de remanescentes da raça equina Nordestina considerados como única população e sua relação com outras raças.....	47
<b>4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Diversidade genética por <i>locus</i> microsatélite e para as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina.....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Avaliação do efeito de gargalo de garrafa nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina.....</b>	<b>57</b>
<b>4.3 Diferenciação genética / estrutura populacional.....</b>	<b>62</b>
<b>4.4 Diversidade genética de remanescentes da raça equina Nordestina.....</b>	<b>70</b>

<b>4.5 Avaliação dos efeitos de gargalo de garrafa em remanescentes da raça equina Nordestina.....</b>	<b>72</b>
<b>4.6 Relação genética de remanescentes da raça equina Nordestina com outras raças.....</b>	<b>75</b>
<b>5.0 CONCLUSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>100</b>

## 1.0 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma rica biodiversidade genética, dentre elas uma gama de mamíferos e aves domésticos que se adaptaram a diferentes condições climáticas do território brasileiro originando as diferentes raças. Dos cavalos nacionais, uma parte foi moldada por uma pressão de seleção natural mais acentuada que a artificial e outras, ditas raças de elite, passaram e ainda sofrem uma intensa seleção artificial, com acasalamentos preferenciais. De maneira geral, todas as raças brasileiras são, de certo modo, oriundas das raças de cavalos Ibéricas, como Sorraia e o Garrano, e de raças do norte da África que se difundiram pela Europa ocidental nos períodos de invasões, guerras e batalhas, antes mesmo da descoberta do Brasil, como o caso do cavalo Bérbere.

Historicamente, dentre as raças nacionais de cavalos, a equina Nordestina foi a que experimentou o mais rápido apogeu, seguido de um abrupto declínio. Do ano de fundação da Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Nordestino (ABCCN), em 1975, até início dos anos 90 (século XX), passaram-se aproximadamente 25 anos. Nesse período, existiam vários criatórios da raça equina Nordestina distribuídos por todo território nacional. O encerramento das atividades da ABCCN no início dos anos 90, do século XX, concorreu para o fechamento dos criatórios oficiais e declínio da raça. Muitos dos animais registrados foram vendidos para o abate e, os que restaram, ou foram castrados ou acasalados indiscriminadamente com outras raças e animais sem padrão racial definido. Todavia, como era uma raça ainda em formação e seus primeiros exemplares foram selecionados nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí, muitos desses animais ainda sobrevivem nesses estados, distribuídos ao longo do Semiárido Nordestino em sistemas de criações ultraextensivos, com pouco contato com o homem, principalmente nos estados do Piauí e da Bahia.

O cavalo Nordestino foi moldado pelas condições do Semiárido Nordestino, notadamente conhecido pelas chuvas irregulares, escassez na disponibilidade de forragem ao longo do ano, solos pedregosos, baixa nebulosidade e elevada insolação. Esses animais mantêm - geração após geração - características que os permitem sobreviver, sem prejuízos em seu desempenho ou que ameacem a sua própria sobrevivência. O cavalo Nordestino é um patrimônio genético que deve ser conservado, pois está muito bem adaptado às condições ambientais do Nordeste brasileiro, na qual outras raças equinas melhoradas não conseguiriam sobreviver sem haver perdas em seu desempenho.

O que se observa hoje é que grande parte dos machos utilizada para o trabalho, seja como força motriz, puxando carroças ou charretes, ou na lida do campo, se encontram

castrados, revelando que os genes desses animais não poderão mais ser disseminados na população, o que promove forte ameaça à raça.

O cavalo Nordestino tem grande importância econômica e sociocultural no nordeste brasileiro, pois participa de atividades agropecuárias como: na lida com o gado, no transporte de mercadorias, no turismo rural, e serve de meio de transporte para diversos estudantes e trabalhadores que precisam se deslocar de zonas mais afastadas para estudar ou trabalhar, além de fomentar e gerar atividades de trabalho e empregos diretos e indiretos em torno da equinocultura. Ainda, destaca-se a sua participação nas tradicionais missas de vaqueiros, nas cavalgadas e na tradicional pega do boi na Caatinga.

O Cavalo Nordestino é um recurso genético secular, que se adaptou ao meio onde se encontra - principalmente no Semiárido brasileiro -, moldado para ter características de resistência, rusticidade e sobriedade, sendo submetido a horas de radiação solar direta, à escassez de água e alimentos, às longas jornadas sobre o solo pedregoso e árduo, no qual desenvolve seu andamento natural com seus cascos rígidos e pequenos, desprovidos de quaisquer ferraduras e até mesmo, muitos dos cavalos sequer realizou um único casqueamento. O cavalo Nordestino desempenha com elevada eficiência as suas duas principais aptidões: a lida com o gado bovino e sobreviver às condições da Caatinga nordestina, provendo sustento ao vaqueiro. Nessas condições, raças equinas especializadas não conseguem desenvolver com a mesma eficiência as mesmas atividades que o cavalo Nordestino nasceu para realizar.

Mediante o exposto, conservar o cavalo Nordestino, avaliando sua variação genética e conhecendo todas as suas potencialidades fisiológicas, reprodutivas, genéticas e econômicas no meio em que ele vive é primordial, pois essas são incógnitas a serem desvendadas através da pesquisa.

Assim, os objetivos desta pesquisa foram: caracterizar geneticamente, avaliando a diversidade e estrutura genética de populações remanescentes da raça equina Nordestina em mesorregiões pertencentes aos estados da Bahia, Pernambuco e Piauí, e estimar quais raças nacionais e exóticas influenciaram na formação da raça equina Nordestina.

## 2.0 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Breve histórico da raça equina Nordestina

A história do cavalo Nordestino e de sua formação está intimamente ligada à história do Brasil. Assim como todas as raças brasileiras, o cavalo Nordestino tem, em sua origem, os cavalos trazidos do velho continente Europeu, que vieram juntos com diversos colonizadores nas inúmeras expedições que foram realizadas em terras brasileiras.

Com base na carta de Pero Vaz de Caminha, de 1 de maio de 1500, em seu relato na folha nº 22: *“Eles nom lavram, nem criam, nem ha aquy boy nem vaca, nem cabra, nem ovelha, nem galinha, nem outra nenhuã alimarea que costumada seja ao viver dos homeens”* (CORTESÃO, 1922), chega-se à conclusão de que quando o Brasil foi oficialmente descoberto pelos portugueses não existiam animais domésticos em solo brasileiro (CHIEFFI, 1950). Portanto, os primeiros cavalos domésticos chegaram ao Brasil junto com as expedições colonizadoras. Todavia, não se sabe ao certo o ano e local da primeira introdução desses animais em terra brasileira.

Existem duas hipóteses que antecedem o primeiro registro oficial da introdução de cavalos no Brasil, datado de 1549, e que estão relacionados a dois eventos prováveis da entrada dos primeiros cavalos domésticos no solo brasileiro: em 1534 e 1535.

Em 1534, por Dona Ana Pimentel, esposa e procuradora de Martin Afonso de Souza, que era o donatário da capitania de São Vicente (CHIEFFI, 1950), hoje atual estado de São Paulo. Ela trouxe alguns animais domésticos na comitiva de Martin Afonso de Souza, quando ele regressou ao Brasil para tomar posse da sua capitania. Esses animais eram provenientes, principalmente, da Ilha da Madeira e Canárias (BRAGA, 2000).

E, no ano de 1535, que pode ter sido um segundo momento ou inclusive o primeiro para entrada dos cavalos domésticos no Brasil. Pois, quando Duarte Coelho aportou em terras brasileiras para empossar-se de sua capitania, a de Pernambuco, ele trouxe consigo diversos suprimentos e animais domésticos (GOULART, 1964) e, no ano seguinte, ordenou que outros animais da Ilha de Cabo Verde fossem enviados ao Brasil para a sua capitania (BRAGA, 2000). A capitania de Pernambuco foi a mais próspera dentre as 15 capitanias hereditárias e, territorialmente, abrangia os atuais estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe. Para que essa superioridade econômica acontecesse, fez-se necessário o desenvolvimento local, provavelmente alicerçado pela força motriz desempenhada por bovinos e equinos.

Devido a sérios problemas com as capitânicas, exceto a de Pernambuco, o rei D. João III nomeou Tomé de Sousa para ser o primeiro governador-geral do Brasil. Tomé de Sousa chegou ao Brasil em 1549, em Salvador, hoje capital do estado a Bahia, e a tornou a primeira capital do Brasil, trazendo consigo muitos animais, inclusive cavalos de Cabo Verde para a Bahia (COSTA; VAL; LEITE, 1974). Dos registros oficiais que se tem acesso, seria nesse momento que os primeiros cavalos domésticos chegaram ao Brasil. E com Garcia D'Ávila, filho de Tomé de Sousa, senhor da casa da Torre em Tatuapara no litoral baiano é que os cavalos foram sendo difundidos e disseminados pelo Nordeste brasileiro de forma maciça, durante a segunda metade do século XVI, com diversas caravanas de desbravamento para tomada de terras e escravizar índios (BANDEIRA, 2000).

Na realidade, não se conhece com exatidão quando os primeiros cavalos domésticos trazidos com os colonizadores pisaram em solo brasileiro, pois, para que as capitânicas se desenvolvessem e, com a fixação do homem dito como civilizado eurocêntrico na nova colônia, o uso de animais se fazia necessário, tanto para consumo como para o trabalho na lida com outros animais, e também como força motriz.

Sabe-se, também, que, durante esse período de colonização do Brasil, ocorreram entradas de espanhóis e de outras nações, como franceses, no território nacional que, provavelmente trouxeram consigo cavalos em suas embarcações. Esses cavalos, principalmente oriundos da Península Ibérica e, outros descendentes ou até mesmo exemplares de cavalos da raça Bérbere (legado deixado pelos povos Berberes, durante o período que invadiram e dominaram a Península Ibérica, nos anos 700 a 1492 da nossa era), vieram com os exploradores ao novo continente e se difundiram, adaptando-se às condições do Brasil, o que originou as diversas raças nacionais, dentre elas raça equina Nordestina.

Com o forte desenvolvimento da cultura da cana de açúcar, os ciclos do Couro no Nordeste e do Ouro no Sudeste, o processo de interiorização e apossamento de terras, principalmente aquelas caravanas que margeavam rios, como ocorreu ao longo do rio São Francisco, tanto que era conhecido na época como rio dos Currais, o homem necessitava de animais para o transporte e força mecânica para fomentar essas ações, o que conduziu ao desenvolvimento da pecuária. Logo, esses animais que outrora advinham da Península Ibérica, principalmente, passaram a desenvolver características morfológicas e produtivas próprias que permitiam a sobrevivência nas condições tropicais bem distintas do Brasil, transmitindo-as geração após geração. São poucas as raças de cavalos que conseguem se adaptar às condições da Caatinga e zonas secas do Nordeste, por isso o cavalo Nordestino é

tão relevante para ambientes como aqueles, servindo para sela e tração ligeira, o que permite realizar trabalho como força motriz.

Alguns autores como Costa, Val e Leite (1974), Santos (1978) e Travassos (2004) discutiram sobre as possíveis raças que originaram o cavalo Nordestino. A maioria é de consenso sobre a forte influência de cavalos Bérbere (também chamado de Barbo) e seus descendentes, trazidos na época do Brasil colônia, em virtude de certas características morfológicas serem predominantes em ambas as raças como a garupa caída, baixa inserção de cauda e perfil ligeiramente convexo. Também, se cogita a influência do Alter real, que tem forte sangue do cavalo Bérbere (SANTOS, 1978), bem como outras raças como Sorraia e Garrano da Península Ibérica, trazidos por portugueses e espanhóis no período do Brasil colônia. Beck (1992) relatou que as raças equinas Bérbere, Sorraia e Garrano são provavelmente as que tiveram a maior participação na formação dos cavalos nativos do Norte e Nordeste do país, porque eram raças de cavalos mais baratas, existiam em grande quantidade na Península Ibérica, eram rústicas e sobreviveriam com mais vitalidade as viagens marítimas do velho continente até o Novo mundo, bem como atenderiam melhor às condições árduas de trabalho no novo continente. Raças como Andaluz, Árabe e Puro-Sangue Inglês, que também existiam em Portugal e na Espanha, podem ter vindo nas expedições ao Brasil, sendo que em menor quantidade, pois eram raças especializadas que necessitavam de manejo e cuidados mais especiais, ademais eram raças nobres e mais caras (BRAGA, 2000).

De fato, ao se observar um cavalo Nordestino tem-se a figura muito semelhante à de um cavalo Bérbere, típico equino da região Norte do continente Africano. Segundo Santos (1982), cavalos orientais como o Bérbere foram espalhados pelo Ocidente juntamente com as invasões de Árabes, Muçulmanos e Mouros pela Europa. Esses cavalos eram de pequeno porte, mas robustos, valentes e destemidos, verdadeiros cavalos de guerra, utilizados em cruzamentos com cavalos Europeus, bem como o cavalo Árabe, sendo esse considerado uma das raças mais importantes na formação de diversas raças modernas de cavalos no mundo, seguido pelo Bérbere.

Costa, Val e Leite (1974) fizeram um relato sobre a história do cavalo Nordestino e destacaram a preocupação com a raça quanto a sua conservação e como se formaram os primeiros núcleos de criação do cavalo Nordestino. Segundo esses autores, em 1936 foi formada a 1ª comissão para proteger raças nativas, com foco nas do Nordeste, que estabeleceram diretrizes para padrões das raças, com o intuito de posterior melhoramento das mesmas, dentre elas a do cavalo Nordestino. Foram selecionados cavalos no Ceará, onde se formou o primeiro núcleo de conservação do cavalo Nordestino. A 2ª Comissão, em 1954,

apresentou o padrão para asininos e revisaram o programa de seleção dos Equinos do Nordeste. Todavia, um trabalho mais minucioso com o levantamento da situação do cavalo Nordestino, naquela época, só foi realizado em 1971, com a 3ª Comissão que gerou o primeiro estudo oficial do cavalo Nordestino, publicada em 1974, com o título de “Estudo da Preservação do Cavalo Nordestino”, no qual afirmou que o cavalo Nordestino tem como “habitat” a região do Nordeste, nas áreas mais secas, principalmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí (COSTA; VAL; LEITE, 1974).

Então, em 13 de fevereiro de 1974 foi fundada a Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Nordestino (ABCCN), tendo como sede a cidade do Recife, capital do estado de Pernambuco (BRASIL, 1983). O serviço de registro genealógico do cavalo Nordestino pela Associação Brasileira de Criadores do cavalo Nordestino (ABCCN) foi oficializado pelo Ministério da Agricultura em 19 de fevereiro de 1975 através da portaria nº 1, publicada em 04 de março de 1975 (BRASIL, 1975), e o último regulamento do registro genealógico da raça foi homologado pelo Ministério da Agricultura em 2 de fevereiro de 1987, sob o nº 80/87 (ABCCN, 1987). Brasil (1983) informou que até o primeiro semestre de 1983 existiam 92 animais com registro provisório e 310 com registro definitivo, tendo a ABCCN 125 associados em todo o Brasil; também existiam 58 núcleos oficiais de criação do cavalo Nordestino, distribuídos em Pernambuco (40 criatórios), Piauí (4), Rio Grande do Norte (4), Rio de Janeiro (4), Bahia (1), Maranhão (1), Sergipe (1) Minas Gerais (1), Goiás (1) e Rio Grande do Sul (1).

Todavia, no início dos anos 90, século XX, a ABCCN parou suas atividades, cessando o serviço de registros genealógicos da raça (MELO, 2011). O fechamento da ABCCN foi o estopim para o desinteresse comercial pela raça, uma vez que os criadores que ainda existiam não tinham mais como registrar seus animais nascidos posteriormente à desativação. Os animais registrados que se mantiveram após cessar o registro oficial da raça foram - em grande parte - vendidos para abate, e outros foram acasalados indiscriminadamente com outras raças e animais sem padrão racial definido.

O fechamento da ABCCN, o aumento de cruzamentos desordenados dos remanescentes da raça (COSTA; MANSO FILHO; FERREIRA, 2001) e a prática atual da castração de grande parte dos machos (MELO; RIBEIRO; TRAVASSOS, 2006) colocam o cavalo Nordestino num cenário de grande ameaça enquanto raça, com risco de se perder esse rico patrimônio genético. A inativação da ABCCN foi um dos eventos que mais contribuiu para a situação de ameaça em que se encontra a raça, pois a espécie *Equus caballus* tem atualmente como principais destinos: uso no lazer e nas práticas desportistas, logo necessita

de criadores que forneçam e reproduzam os animais. Na ausência de uma associação, o número de criadores e interessados reduz drasticamente.

A lista mundial de observação para a diversidade dos animais domésticos, publicada pela FAO/DAD-IS (FAO – DOMESTIC ANIMAL DIVERSITY INFORMATION SYSTEM, 2000), mostrou que o status de risco para raça equina Nordestina é considerado desconhecido, porque não possuem informações atualizadas da raça.

Mediante cenário atual em que se encontram os remanescentes do cavalo da raça Nordestina, em 10 de novembro de 2010 é fundada a Associação Equestre e de Preservação do Cavalo Nordestino (AEPCN) na cidade de Juazeiro, no estado da Bahia, que tem como objetivos: resgatar a raça, preservar e selecionar animais, bem como registrar novos animais em livros próprios. Esse grupo realizou pequenas modificações no último Padrão da Raça, que data de 1987 onde, no padrão anterior, os machos deveriam ter altura mínima e máxima de 1,30 cm e 1,46 cm, e as fêmeas de 1,27 cm e 1,43 cm, respectivamente. Após ajustes feitos pela AEPCN, a altura máxima permitida para ambos os sexos passou para 150 cm, e mínima para machos e fêmeas de 1,35 cm e 1,30 cm, respectivamente. Todavia, para o setor de registros genealógicos do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) ainda considera-se o antigo regulamento de registro genealógico do cavalo da raça Nordestina estabelecido pela - então desativada - ABCCN.

Além do Núcleo de Preservação e Seleção do Cavalo Nordestino do Juazeiro, no estado da Bahia, existe outro na cidade do Cariri, no estado do Ceará, que funciona desde 2011 e está sob o regimento da AEPCN. Espera-se que a recém-criada AEPCN contribua para despertar interesse e manutenção da raça, de forma a conter o provável processo de diluição genética a que está submetida.

Logo, trabalhos de conservação devem ser realizados em prol da raça equina Nordestina que, como recurso genético animal local, é uma população que se adaptou ao meio Semiárido e desenvolveu características próprias, principalmente de rusticidade e resistência, bem como o cavalo Nordestino, que é uma ferramenta ímpar na economia local e exerce papel imprescindível nas atividades sociais e culturais do povo Nordestino.

O cavalo Nordestino desenvolveu características morfológicas únicas, destacando-se os cascos, geralmente escuros, com ranilhas profundas e elásticas, onde muitos chamam popularmente de “casco-de-burro”, o que confere a eles a capacidade de caminhar naturalmente, por longas horas, pelo solo pedregoso e árduo do Semiárido Nordestino, sem demonstrar quaisquer sinais de enfermidades em seus cascos, também apresenta rusticidade, resistência e vivacidade, mesmo após longas caminhadas, sob intensa insolação e submetidos

à temperatura média do ar elevada, praticamente sem parar para descansar, comer e beber água. Ademais, são animais que suportam a privação de água e alimentos, por, inclusive, dias seguidos, porque estão adaptados às condições de baixa e irregular disponibilidade de forragem ao longo do ano, escassez e irregularidade na distribuição de chuvas e secas periódicas, suportando a desidratação e elevação da temperatura corporal bem mais do que qualquer outra raça equina, melhorada e elitizada, o que possibilita obter bom desempenho em trabalhos de lida com o boi na Caatinga, mesmo em condições de estresse por causa do calor.

Para tanto, são animais de pequeno porte, não ultrapassando 145 cm para machos e 140 cm para fêmeas, peso corporal aproximadamente de 280 kg em ambos os sexos, e pelagens Tordilhas, Castanhas e Baias - as mais comuns -, dados baseados em Melo et al. (2008), Melo et al. (2010) e Melo (2011). Sendo assim, o menor porte faz com que eles necessitem consumir menos alimentos, para atender às exigências de manutenção, e na sua relação massa / superfície corpórea conseguem dissipar mais facilmente o calor.

Além dessas características biológicas, inerentes ao cavalo Nordestino, seu papel em festividades religiosas, como as diversas missas do vaqueiro existentes nos municípios do Semiárido brasileiro e desportivas como nas Corridas de Argolinhas, “bolões” para a pega do boi no mato (vaquejada mais tradicional), cavalgadas, dentre outras, demonstra quão importante ele é no âmbito cultural e social. Quanto aos aspectos econômicos, é o próprio instrumento do vaqueiro para conduzir e pegar bois na Caatinga fechada, meio de transporte de pessoas e mercadorias e ainda existe toda uma cadeia de produtos que vão desde indumentárias dos vaqueiros (destacando-se o Gibão, o chapéu de couro e perneiras) a utensílios para cavalos (arreios, selas, cabrestos, cabeçadas, bridões etc.), que geram renda e empregos diretos e indiretos. Gómez et al. (2010) afirmaram que existem três principais razões que justificam esforços para manutenção da diversidade genética das raças de animais: a) razões culturais e históricas; b) razões biológicas e econômicas; e, c) razões científicas.

Portanto, percebe-se claramente a importância do cavalo Nordestino, não somente como patrimônio biológico nacional, mas também como elemento ativo da cultura, sociedade e economia Nordestina, salvaguardando genes que poderão ser reservatórios que atendam as demandas futuras do homem, mediante as bruscas mudanças climáticas, sendo a sua conservação um caso de segurança nacional.

## 2.2 Caracterização genética de equinos no Brasil e no mundo

O Brasil possui o quarto maior rebanho efetivo de equinos no mundo (FAO, 2010), contabilizando 5.514.250 cabeças, ficando atrás dos Estados Unidos (9.500.000), China (6.787.360) e México (6.350.000). No Brasil, a região Nordeste detém o maior rebanho, com 1.367.895 equinos, destacando-se por ordem de tamanho efetivo de animais: o estado da Bahia (586.643 cabeças), Maranhão (170.347 cabeças), Pernambuco (139.811 cabeças), Ceará (138.346 cabeças) e Piauí (112.423 cabeças) - segundo dados do IBGE (2010).

O Brasil possui as seguintes raças nacionais de equinos: Pantaneiro (Mato Grosso); Campeiro (Santa Catarina); Lavradeiro (Roraima); Marajoara (Pará); Nordestino (Nordeste Brasileiro); Puruca (Pônei, Pará); Pônei brasileiro (Minas Gerais) e Piquira (Minas Gerais); além das mais famosas, Mangalarga (São Paulo), Mangalarga Marchador (Minas Gerais), Campolina (Minas Gerais), Crioulo (Rio Grande do Sul) e Brasileiro de Hipismo (São Paulo); e, também, o ecótipo Baixadeiro (Maranhão). Todavia, não se conhece ao certo os censos e a situação de risco de muitas dessas raças.

A FAO (2007) informa que muitas raças de animais domésticos vêm sofrendo consideráveis perdas de diversidade, principalmente por causa da seleção artificial voltada para alcançar respostas cada vez mais elevadas e imediatas nos níveis de produção animal e, dentre as espécies de mamíferos domésticos, a equina tem maior proporção de raças ameaçadas em todo o mundo (cerca de 23%).

Os tipos e raças que compõem uma espécie e sua variação, entre e dentro de cada raça, representam a sua diversidade, ou seja, a variabilidade genética total de uma espécie corresponde ao somatório inter e intrarracial (FAO/DAD-IS, 2000). Sendo assim, a perda de uma raça implica na perda de genes importantes para a manutenção da biodiversidade da própria espécie, por isso, atualmente, a preocupação é crescente com o gerenciamento dos recursos genéticos locais em cada país, frente à necessidade de melhorar a produção animal, mantendo o máximo de diversidade possível.

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).

O número de equinos vem reduzindo gradativamente no mundo inteiro e isso pode interferir na sua diversidade genética. Essa “discreta” ameaça é decorrente de alterações no

estilo de vida das pessoas, no processo de mecanização agrícola (GLOWATZKI-MULLIS et al., 2005; BEHL et al., 2007; LING et al., 2010) e na popularização de veículos de baixo custo de aquisição e manutenção, como as motocicletas, em áreas rurais. Esses fatores contribuem para redução populacional de equinos, de modo que o número de animais, efetivamente capazes de se reproduzir, também diminui - o que ameaça principalmente as raças que atualmente não despertam o interesse comercial do homem. Com o número reduzido de animais em uma população, a probabilidade de consanguinidade, efeitos de deriva e cruzamentos indiscriminados acontecerem, aumentam, o que resultará em perda de diversidade.

Diante desse cenário, a caracterização genética é um pré-requisito essencial para estabelecer programas de conservação genética. A FAO (1992) estabeleceu um protocolo para a conservação de Recursos Genéticos de Animais Domésticos (RGAn), no qual a caracterização da raça, através do estudo da diversidade e da estrutura populacional, deve integrar a segunda fase de qualquer programa de conservação. A caracterização genética permite analisar os níveis de variabilidade genética entre e dentro de populações, permitindo se conhecer a atual estrutura genética da raça ou de seus remanescentes. Rossitier et al. (2000) e Bjørnstad, Nilsen e Røed (2003) informaram que a caracterização genética possibilita conhecer a diversidade e a estruturação genética de uma população, o que permite estabelecer importantes diretrizes para as estratégias de conservação e manejo dos RGAn ameaçados, salvaguardando a integridade da raça.

Nos últimos anos, muitos países têm se preocupado em conservar os recursos genéticos locais para a manutenção da variabilidade genética dos animais (EGITO; MARIANTE; ALBUQUERQUE, 2002). O mundo inteiro tem demonstrado interesse na conservação de seus RGAn e, raças da espécie *Equus caballus* vêm sendo alvo de estudos de caracterização genética em vários países. Os estudos avaliam a estrutura e variabilidade genética, e identificam as relações filogenéticas entre raças, nesse último, para inferir as raças que provavelmente contribuíram na formação daquelas, alvo dos estudos, e quais delas podem ter sido introduzidas recentemente, ou até mesmo gerar informações de raças ou grupos genéticos tão similares que servirão de banco de Germoplasma futuros entre eles. Na Figura 1 encontra-se um mapa marcado, indicando os países que já realizaram estudos de caracterização genética de raças equinas.

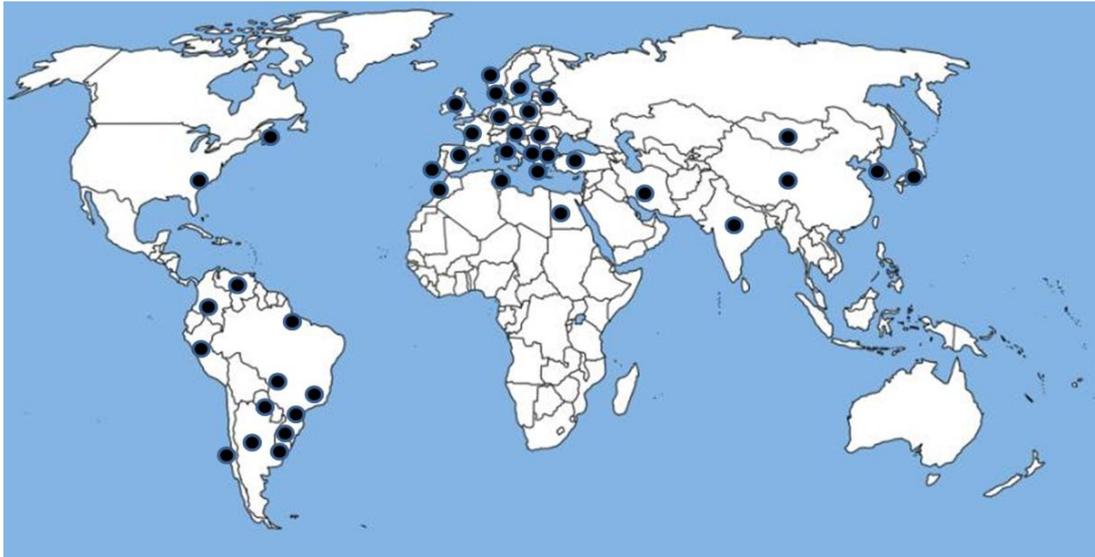


Figura 1. Os pontos marcam os países e regiões onde já foram realizados estudos de caracterização genética de raças equinas domésticas, incluindo o cavalo selvagem de Przewalski

As técnicas que avaliam polimorfismos protéicos e grupos sanguíneos permitem a realização de tais estudos, porém, novas técnicas moleculares surgiram como os marcadores microssatélites que vêm substituindo as anteriores, principalmente por serem mais rápidas e disponibilizarem uma gama mais ampla de marcadores ao longo do genoma. Diversas tecnologias baseadas no DNA têm sido desenvolvidas nas últimas décadas para identificar *loci* polimórficos, como os marcadores moleculares: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*), SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) e STMS (*Sequence Tagged Micorsatellite Sites* ou chamados de *Marcadores microssatélites*) (CHAUHAN; GUPTA; DHILLON, 2004).

Takezaki e Nei (1996), Chambers e MacAvoy (2000) informaram que, dentre as tecnologias baseadas em DNA, os marcadores microssatélites são considerados o mais interessante para estudos de caracterização genética, porque apresentam as seguintes características: herança mendeliana e expressão codominante, elevado grau de polimorfismo, são altamente multialélico, a disponibilidade e distribuição de marcadores ao longo do genoma é praticamente ilimitada e necessitam de pequenas quantidades de DNA para análises. Por esses motivos a FAO/ISAG (FAO – INTERNATIONAL SOCIETY ANIMAL GENETICS, 2011) recomendam o uso de marcadores microssatélites na caracterização racial para programas de conservação de RGA.

Marcadores bioquímicos, como o estudo de polimorfismo em *loci* de proteínas foram inicialmente utilizados para trabalhos de caracterização genética de raças equinas, como trabalhos de Cothran et al. (1998) e Abreu, Mariante e Santos (1998) com o cavalo Pantaneiro, Nozawa et al. (1998) com diversas raças equinas Japonesas e Lippi e Mortari (2003) com cavalos Mangalarga Marchador. Posteriormente, outros trabalhos associaram o polimorfismo proteico com marcadores microssatélites, como em: Saíz (2000), com cavalos oriundos de 2 núcleos da raça Losino, Bjørnstad; Gunby e Røed (2000), em estudos com a raças equinas Norueguesas; Kelly et al. (2002) fizeram com estudo do cavalo Crioulo Venezuelano; e, Luís et al. (2007), com as raças Lusitano, Sorraia e Garrano.

Atualmente, o que se verifica, em sua grande maioria, é a utilização somente de marcadores microssatélites nos estudos de diversidade e relações filogenéticas em equinos. Isto, porque esses marcadores são de elevado polimorfismo, conferindo-lhe característica multialélica e facilidade na execução laboratorial, mediada por equipamentos automatizados ou semiautomatizados.

A elevada variabilidade em *loci* de marcadores microssatélites permite estabelecer, através da análise dessa variabilidade, relações genéticas entre populações e subpopulações, entre raças, nível de endogamia, avaliação do fluxo gênico e, em estudos evolutivos, também serve como marcador individual e nos testes de parentesco (CHAMBERS; MACAVOY, 2000). Além do que, com os marcadores microssatélites consegue-se identificar cada alelo por loco e realizar o cálculo das frequências alélicas, possibilitando estimar as distâncias genéticas entre populações e entre indivíduos dentro de populações (PONSUKSILI et al., 1999).

Trabalhos desenvolvidos, utilizando marcadores microssatélites para caracterização de raças equinas, foram realizados por: Cañon et al. (2000), com 7 pequenas populações de diferentes raças Céltico-espanholas (Asturcon, Cavalo Gallego, Losina, Pottoka, Jaca Navarra, Mallorquina e Menorquina); Bjørnstad, Nilsen e Røed (2003), com cavalos Mongóis e Noruegueses; Tozaki et al. (2003), que avaliaram 7 ecótipos de cavalos nativos do Japão e de 3 tipos de cavalos Mongóis; Achmann et al. (2004) analisaram a diversidade genética de cavalos da raça Lipizzaner, de 7 países europeus diferentes; Vega-Pla et al. (2006), com cavalos de Retuertas na Espanha; Azor et al. (2007), com cavalos Trotador da Espanha; Plante et al. (2007), com cavalos da Ilha de Sable no Canadá; Leroy et al. (2009), com 39 populações de cavalos criadas na França e distribuídas entre 31 raças de equinos reconhecidas, 7 oriundas de cruzamentos e 1 do cavalo selvagem de Przewalski; Maretto e Montavani (2009), com cavalos Italianos; Conant, Juras e Cothran (2011) estudaram 5 populações de cavalos do sudoeste dos Estados Unidos; Cothran et al. (2011) avaliaram equinos da raça Crioulo

Venezuelano, comparativamente com mais 11 outras raças de cavalos domésticos das Américas e o Sorraia; Bömcke, Gengler e Cothran (2011) avaliaram a raça de pônei Skyros da Grécia; e, Bigi e Perrotta (2012), com cavalos da raça Catria na Itália.

Das raças equinas nacionais que já foram estudadas através de marcadores microssatélites, para caracterização genética de populações por pesquisadores brasileiros, têm-se como exemplos a raça Marajoara, Puruca (COSTA et al., 2005; SILVA FILHO; SCHNEIDER; SILVA, 2007; COSTA et al. 2009), Pantaneiro (SERENO et al., 2008; GIACOMONI; FERNÁNDEZ-STOLZ; FREITAS, 2008; COSTA et al., 2009; SILVA et al., 2012), Mangalarga (COSTA et al., 2009; COSTA et al., 2005) Mangalarga marchador (SILVA FILHO; SCHNEIDER; SILVA, 2007; ASSIS et al., 2009; SILVA et al., 2012), Crioulo (RIBEIRO et al., 2005; FRANCESCHI et al., 2006; COSTA et al., 2010), Campolina (RIBEIRO et al., 2005), Campeira, Lavradeira e o ecótipo Baixadeiro (SILVA et al., 2012).

Muitos países, com destaque aos do continente Europeu, já estão se dando conta da importância da conservação de suas raças locais. Notter (1999) afirmou que raças nativas podem ser fontes importantes de material genético, para melhorar a resistência de outras raças que não estariam, a princípio, aptas ao ambiente em que as nativas estão submetidas. Portanto, estudos conservacionistas são importantes para fundamentar e nortear projetos estratégicos de manutenção da diversidade genética da raça e da própria espécie, bem como orientar *a posteriori* projetos de melhoramento genético.

### **2.3 Base conceitual para os elementos utilizados nas avaliações da diversidade genética, de possíveis efeitos de gargalo de garrafa e da estrutura populacional**

Essa seção foi concebida no intuito de subsidiar, com definições e argumentos, as ferramentas utilizadas no material e métodos desta pesquisa.

#### **2.3.1 Diversidade genética**

Segundo Frankham, Ballou e Briscoe (2008), a diversidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos presentes em um determinado grupo. Nessa variação genética existente é que a natureza se alicerça, para que organismos sobrevivam mediante as mudanças do meio. Em outras palavras, a natureza faz uso da variação genética para que a evolução e consequente perpetuação de uma determinada espécie aconteçam. 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).

Com base em Hedrick (2005), Allendorf e Luikart (2006) e Frankham, Ballou e Briscoe (2008) a heterozigosidade, seja para a observada como a esperada, é uma medida que contabiliza a proporção de indivíduos que são heterozigotos em uma dada população. A heterozigosidade esperada é a proporção de heterozigotos esperada na condição do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Segundo Gorman e Renzi (1979), as estimativas de heterozigosidade esperada são bem menos sensíveis ao efeito do tamanho da amostra do que outras medidas de diversidade genética, e que quando se avalia muitos *loci* precisaria de poucos indivíduos para estimá-la.

O polimorfismo genético é quando um mesmo *locus* pode apresentar 2 ou mais alelos com considerável frequência, onde o alelo mais comum apresenta frequência menor que 95%, em uma mesma população (HARTL; CLARK, 2010). A diversidade alélica, também chamada de número de alelos, é definida como o número de alelos observados em um *locus* em uma dada população. Essa concepção também serve para a riqueza alélica. Petit, El Mousadik e Pons (1998) alertam que o número de alelos é muito influenciado pelo tamanho amostral, o que pode trazer certa dificuldade na comparação entre populações com diferentes tamanhos amostrais, por isso a riqueza alélica vem como alternativa. Logo, a riqueza alélica ( $A_r$ ) é uma medida que permite avaliar o número médio de alelos, que tem por base o cálculo adaptado do método de rarefação de Hurlbert (1971).

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), por exemplo (HEDRICK, 2005; ALLENDORF; LUIKART, 2006).

A avaliação do Equilíbrio de Hardy-Weinberg permite descrever e estudar a composição gênica de uma população, no tocante à presença ou ausência de fatores evolutivos como mutações, seleção natural, deriva genética e migração, bem como detectar alterações na frequência genotípica, em virtude do aumento da homozigose.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg considera que as frequências alélicas se manteriam constantes de uma geração a outra e as frequências genotípicas assumiriam equilíbrio estável se, somente se, os seguintes pressupostos fossem válidos na população: o tamanho populacional é grande (teoricamente infinita), o acasalamento é aleatório onde todos os

indivíduos têm a mesma chance de se acasalarem e poderia até acontecer acasalamentos endogâmicos, mas estariam dentro do acaso, machos e fêmeas seriam igualmente férteis, gerando o mesmo número de filhos e ausência de fatores evolutivos (a migração e mutação podem ser ignoradas, a seleção natural não afetaria os alelos envolvidos na avaliação e a deriva genética seria insignificante) (ALLENDORF; LUIKART, 2006; BEIGUELMAN, 2008). Essa população, dita ideal, é utilizada como padrão para ser comparada com outras populações e úteis para definir os tamanhos efetivos populacionais (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008)

O PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) se baseia no quão polimórfico pode ser determinado marcador. O PIC é um parâmetro que possibilita avaliar a confiabilidade da informação obtida em cada marcador microssatélite (BOTSTEIN et al., 1980), de modo que se pode através dele, incluir ou excluir um determinado marcador da análise segundo seu valor obtido.

### 2.3.2 Gargalo de garrafa

O efeito gargalo de garrafa é um caso de deriva genética forte e ocorre quando uma população sofreu uma redução muito drástica no número de indivíduos no intervalo de uma geração a outra, ou em consecutivas gerações, de modo que resulta na perda de alelos, principalmente dos alelos raros (HEDRICK, 2005; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). A deriva genética é fator evolutivo de processo dispersivo, na qual se pode conhecer a magnitude da alteração na frequência alélica, mas não tem como saber a direção na qual foi modificada. Essa força evolutiva causa a fixação ou perda aleatória de genes, com perdas na diversidade genética, e seus efeitos causam maior impacto em populações pequenas do que em grandes (BEIGUELMAN, 2008; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Uma população está em equilíbrio de mutação-deriva (sem efeito de deriva genética por gargalo de garrafa) quando o seu tamanho efetivo tem se mantido constante nos últimos anos (passado recente), de modo que a probabilidade de um *locus* estar com excesso ou déficit de heterozigidade é a mesma para ambos os casos (CORNUET; LUIKART, 1996).

Portanto, para determinar se uma população tem número significativo de *loci* com excesso de heterozigidade, devido ao efeito de gargalo de garrafa, realizou-se os testes estatísticos ST e WRT. O primeiro teste estatístico (ST) compara o número de *loci* esperados com excesso de heterozigidade com a heterozigidade observada, sem considerar o excesso ou déficit de heterozigoto (CORNUET; LUIKART, 1996; LUIKART et al. 1998a). O

segundo teste estatístico (WRT) confronta a condição de equilíbrio com a de excesso ou deficiência de heteroziguidade, possui maior poder discriminatório que o outro e pode ser usado em estudos que apresentam poucos *loci* polimórficos e com qualquer número de indivíduos avaliados (LUIKART; CORNUET, 1998; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999).

O Modelo de Alelos Infinitos (IAM) desenvolvido por Kimura e Crow (1964), considera que mutações ocorrem de modo que resulta na formação de alelos que não existiam anteriormente na população e, essa mutação acontece em várias bases nas repetições em tandem. Sendo assim, os alelos idênticos são idênticos por descendência (HARTL; CLARK, 2010). No Modelo de Mutação Gradual (SMM) de Ohta e Kimura (1973), os alelos que surgem na população devido à mutação podem já ter estado anteriormente na população e a mutação ocorre somente numa unidade repetitiva (OHTA; KIMURA, 1973; KIMURA; OHTA, 1978). O modelo de Mutação em Duas Fases (TPM) de Di Rienzo et al. (1994) assume que as mutações causam redução ou elevação no número de bases presentes em uma única ou em mais de uma unidade de repetição e, nesse último caso, a mutação ocorre em duas fases.

Nos modelos SMM e TPM os alelos idênticos, presentes na população, que surgiram inicialmente por mutação podem levar à formação de alelos, que já estavam presentes outrora na população, nesse caso são idênticos por estado e não por descendência (KIMURA; OHTA, 1978; DI RIENZO et al., 1994). Cornuet e Luikart (1996) relataram que se um *locus* evolui, conforme modelo SMM, podem existir situações em que o excesso de heteroziguidade não é observado, e se a evolução do *locus* for ao sentido do modelo IAM e quão mais distante ficar do modelo SMM pode demonstrar excesso de heteroziguidade, devido ao efeito de deriva genética por gargalo de garrafa. São poucos os *loci* microssatélites que seguem estritamente o modelo SMM. Di Rienzo et al. (1994) observaram que muitos *loci* microssatélites se enquadram melhor no modelo TPM, que é um intermediário entre SMM e IAM.

### 2.3.3 Estrutura populacional

Frankham, Ballou e Briscoe (2008) declararam que muitas populações no mundo tornaram-se fragmentadas, principalmente devido à ação humana e que causam impactos na diversidade genética, diferenciação, endogamia e risco de extinção. Tais consequências são altamente dependentes do fluxo gênico entre as subpopulações. Allendorf e Luikart (2006) definiram subpopulação como um grupo dentro de uma dada população que se formou devido ao reduzido nível de fluxo gênico com os outros grupos.

A maioria das populações possui subpopulações, nas quais geralmente ocorrem os cruzamentos. Esse agrupamento é denominado de estrutura ou subdivisão populacional, naturalmente observada na formação de rebanhos, cardumes, colônias etc. E, quando existe subdivisão populacional, tendem a ter diferenciação genética entre as subpopulações, ou seja, as frequências alélicas entre elas são diferentes, a ponto de formar grupos geneticamente distintos, onde a migração é praticamente inexistente ou não existe realmente e o acasalamento, mesmo sendo ao acaso dentro de cada grupo, tende a unir indivíduos mais aparentados – “endocruzamentos” são predominantes (HARTL; CLARK, 2010).

A estatística F de Wright (1951) foi desenvolvida para descrever a variação genética responsável por possíveis diferenciações em uma dada população, resultando em subdivisões, promovendo a formação de subpopulações. Além disso, a estatística F de Wright (1951) é uma medida que estima o déficit de heterozigoto com relação à proporção esperada no equilíbrio de Hardy-Weinberg em uma dada população. Essa estimativa consiste em três diferentes parâmetros correlacionados entre si e que explicam a endogamia existente dentro e entre populações, elucidando a variabilidade genética total nos diferentes componentes: população total ( $F_{it}$ ), subpopulações ( $F_{st}$ ) e indivíduos ( $F_{is}$ ) (HEDRICK, 2005; ALLENDORF; LUIKART, 2006; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; HARTL; CLARK, 2010).

Sendo assim, o  $F_{it}$  estima a endogamia do indivíduo com relação à população como um todo (população total) decorrente de fenômenos associados ao  $F_{is}$  e  $F_{st}$ . o  $F_{is}$  é uma medida que estima a endogamia dos indivíduos dentro de sua própria subpopulação.  $F_{it}$  e  $F_{is}$  podem resultar em valores compreendidos entre -1 a 1, e quando o valor é positivo indica deficiência de heterozigoto, negativo indica excesso de heterozigoto e zero ou próximo fornece indícios de que acasalamentos ao acaso são predominantes no grupo avaliado. O  $F_{st}$  estima a endogamia devido à divergência genética entre subpopulações com relação à população total e sempre resultará em valor positivo; variando de 0, que significa sem diferenciação entre as subpopulações, a 1, demonstrando que ocorreu fixação de diferentes alelos nas subpopulações avaliadas, a ponto de torná-las divergentes geneticamente (WRIGHT, 1951; NEI, 1973a; HEDRICK, 2005; ALLENDORF; LUIKART, 2006; FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; HARTL; CLARK, 2010).

O coeficiente de diferenciação genética ( $G_{st}$ ) equivale ao  $F_{st}$ , fazendo uso diretamente das frequências alélicas. Quando se trata de múltiplos *loci* (>2 alelos) para estimar  $F_{st}$  precisa-se do conhecimento das frequências genotípicas, porém, o  $G_{st}$  necessita somente das frequências alélicas, uma vez que o cálculo estatístico é realizado diretamente dessa frequência. O  $G_{st}$  pode ser usado em qualquer população, independente do número de alelos

por *locus*, do padrão de forças evolutivas como mutação, seleção e migração que estejam atuando nas subpopulações avaliadas e do método de reprodução ali presente (NEI, 1973a; NEI, 1977). Bertorelle (2003) relatou que o  $G_{st}$  considera somente a frequência dos alelos e é preferível ser usado quando subpopulações divergem devido ao processo de deriva.

As populações podem se apresentar subestruturadas em diferentes níveis hierárquicos e muitos fatores podem contribuir para tal condição, como barreiras geográficas, que podem separar grupos de indivíduos que pertençam a uma mesma espécie (ALLENLORF; LUIKART, 2006; FRANKHAM, BALLOU, BRISCOE, 2008). A estatística F de Wright (1951) possibilita avaliar a estrutura genética e quantificar a magnitude da diferenciação genética para cada nível. Porém, dados oriundos de ferramentas moleculares refletem mais do que a frequência gênica dos marcadores moleculares. Eles também informam a quantidade de diferenças mutacionais que existem entre os diferentes genes que compõem aquela dada subpopulação. Sendo assim, a AMOVA (Análise de Variância Molecular) é uma alternativa para solucionar esse impasse, pois é um método estatístico que permite desdobrar hierarquicamente a variação genética entre subpopulações e ainda estimar analogamente os parâmetros presentes na estatística F de Wright (1951) (EXCOFFIER, SMOUSE; QUATTRO, 1992). Na AMOVA, a hipótese nula a ser testada é que não existe diferença genética entre as subpopulações, ou seja, as subpopulações na realidade integram o mesmo grupo genético e que as essas subpopulações definidas arbitrariamente representam amostras do mesmo *pool* gênico. Portanto, a hipótese alternativa seria a de que existem diferenças genéticas entre as subpopulações e, somente será aceita quando a nula for rejeitada (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Além do que, a AMOVA é um método estatístico que realiza permutações ao acaso e permite tratar os dados obtidos como um vetor booleano, ou seja, uso de matrizes que indicam a presença (1) ou ausência (0) do *locus* microsatélite, nas quais a distância quadrada euclidiana entre os pares de vetores são calculadas, gerando outras matrizes (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

Como os marcadores microsatélites apresentam expressão codominantes,  $\Phi_{pt}$  é o melhor parâmetro para comparação entre dados codominantes, como aqueles oriundos de marcadores microsatélites e dados binários ou haploides. Logo, a Estatística- $\Phi$  fornece valores que são análogos a Estatística-F, e  $\Phi_{pt}$  é uma estimativa da diferenciação genética entre subpopulações e é análoga ao  $F_{st}$ , de maneira que calcula a proporção de variação entre subpopulações com relação a variação total, segundo (PEAKALL et al., 1995; MAGUIRE; PEAKALL; SAENGER, 2002).

A distância genética é uma medida que também avalia a variação existente entre grupos. Essa variação decorre da ação de diferentes fatores evolutivos e/ou pela endogamia. Allendorf e Luikart (2006) relataram que, a descrição da estrutura populacional é muito comum em estudos de conservação genética, indivíduos de diferentes localidades geográficas são genotipados para determinar o padrão e quantidade de fluxo gênico entre as subpopulações.

Quanto ao fluxo gênico, vale ressaltar que, o número de migrantes está intimamente associado à diferenciação genética entre subpopulações, pois a elevada migração tende a homogeneizar os grupos entre si, reduzindo o processo de diferenciação genética que resulta na formação de grupos geneticamente divergentes.

Allendorf e Luikart (2006) declararam que é de vital importância descrever as subpopulações e as suas relações genéticas para estudos e ações conservacionistas, e esses estudos são realizados através da frequência alélica de multilocus e da estatística capaz de agrupar indivíduos ou subpopulações, que podem ser representados graficamente em dendograma ou árvore, o que facilita a identificação de grupos similares.

Conforme Eding e Laval (1999), as medidas de distâncias genéticas permitem avaliar a proximidade genética entre as subpopulações, e recomenda-se sempre utilizar-se mais de uma distância para avaliar quais - ou qual - melhor reflete a realidade das subpopulações. Como exemplos de distâncias genéticas, têm-se: padrão de Nei (Nei's D) (NEI, 1972); mínima de Nei (NEI, 1973b);  $D_A$  de Nei (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983);  $X^2$  de Sanghvi (SANGHVI, 1953); distância de corda de Cavalli-Sforza -  $D_c$  (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967);  $f\theta$  de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA, 1969); euclidiana de Rogers (ROGERS, 1972); de Prevosti, Ocana e Alonzo (PREVOSTI; OCANA; ALONZO, 1975); de Reynolds (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983) /  $F_{st}$  de Latter (LATTER, 1972); de Goldstein et al., (GOLDSTEIN et al., 1995) entre outras.

Dentre as medidas de distâncias genéticas supracitadas, somente a distância de corda de Cavalli-Sforza -  $D_c$  (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967), a  $D_A$  de Nei (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983) e a de Reynolds (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983) serão conceituadas nessa revisão, pois tratam das medidas utilizadas nessa pesquisa.

A  $D_c$  - distância genética de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) - assume que as alterações nas frequências alélicas, responsáveis pela diferenciação genética entre as populações, são decorrentes da deriva genética, e demais forças evolutivas são ignoradas. Pressupõe que os tamanhos populacionais não se mantêm constantes e iguais em todas as populações, pois consideram que as mudanças no tamanho

populacional ocorrem não linearmente com o tempo, e sim ao longo do tempo de  $1/N$ , em que  $N$  é o tamanho efetivo da população. Assim, quando o tamanho da população duplica, a deriva genética estará ocorrendo mais lentamente, e a distância genética entre as populações deverá estar aumentando apenas metade da velocidade em relação ao tempo (FELSENSTEIN, 2005). A  $D_c$  tem se mostrado satisfatória para a comparação entre raças de equinos do mundo porque demonstram valores consistentes e, através deles, a obtenção de árvores filogenéticas com topologia coerentes com a história de formação das raças (COTHRAN; LUIS, 2005).

A distância genética de Nei, Tajima e Tatenó (1983),  $D_A$ , corresponde à distância de  $f\theta$  de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA, 1969) modificada. Segundo Nei, Tajima e Tatenó (1983), quando as populações envolvidas no estudo são muito próximas, a distância de  $f\theta$  de Cavalli-Sforza possibilita, possivelmente, a obtenção de uma melhor árvore filogenética. Todavia, ela é altamente dependente do número de alelos que aparecem com baixa frequência na amostra e esses não contribuem muito para a diferenciação genética entre as populações. Portanto, Nei, Tajima e Tatenó (1983) desenvolveram a distância conhecida como  $D_A$  (1983) para corrigir essa dependência.

Eding e Laval (1999), ao avaliarem algumas medidas de distância genética, consideraram que a distância genética de Reynolds ( $D_R$ ) é uma medida recomendada para populações em que o tempo de divergência genética entre elas seja considerado curto e, para estudos de divergência entre populações pertencentes ao mesmo continente. A  $D_R$  assume que a deriva genética seria a única força evolutiva agindo sobre as frequências alélicas, o que poderia resultar em diferenciação genética entre as populações, e as demais forças evolutivas, mesmo existindo, os seus efeitos seriam diminutos, logo são desconsideradas (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983). Em outras palavras, assume que as diferenças que possam existir entre subpopulações ocorrem e aumentam por causa somente do efeito de deriva genética. Segundo Reynolds, Weir e Cockerham (1983), a  $D_R$  se baseia no coeficiente de coancestralidade, que mede o grau de relação por descendência entre dois indivíduos. Ou seja, é a probabilidade de que um alelo escolhido aleatoriamente de um indivíduo seja idêntico por descendência, para um alelo escolhido também ao acaso em um outro indivíduo (MALECOT, 1948 *apud* EDING; MEUWISSEN, 2001).

Com base nas matrizes de distância genética, pode-se construir árvores pelo método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987). Para verificar a confiabilidade dos nós de uma árvore, o uso da técnica de reamostragem, com pseudorréplicas (*bootstrap*) possibilita avaliar a magnitude dos erros amostrais sobre as inferências, demonstrando a proporção de vezes na

qual cada nó se formou, ou seja, quantas vezes predominantemente aquele grupo (*cluster*) foi formado.

O método de *Neighbor-Joining* (agrupamento de vizinhos) é um método que não assume o relógio molecular evolutivo, de modo que não considera como constante as taxas de evolução entre os grupos na árvore. Esse método agrupa as subpopulações que têm a propriedade de serem vizinhas, ou seja, que esteja o mais próximo possível uma da outra, minimizando a longitude total da árvore, uma vez que o princípio deste método é encontrar pares de OTUs (unidades taxonômicas operacionais) que minimizem o comprimento total do ramo em cada fase de agrupamento das OTUs (SAITOU; NEI, 1987).

O método Bayesiano também permite avaliar a estrutura genética de uma população, e tem a vantagem de incorporar informações *a priori* utilizadas para inferir a filogenia das subpopulações envolvidas (HUELSENBECK et al., 2001).

A definição dos indivíduos que vão compor determinada população é tipicamente subjetiva, baseada em características físicas ou da localização geográfica onde os indivíduos foram amostrados. Essa abordagem subjetiva é geralmente uma forma prática de incorporar diversos tipos de informações, no entanto, isso pode dificultar saber se um indivíduo foi alocado corretamente em uma população em termos genéticos, pois pode acontecer de indivíduos serem semelhantes fenotipicamente, mas geneticamente divergentes. Todavia, com o método Bayesiano, essas informações subjetivas (*a priori*) podem ser incorporadas e, posteriormente confirmadas ou não quanto à coerência genética da similaridade ou dissimilaridade entre os grupos (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

O método Bayesiano, com os recursos computacionais, fornece respostas probabilísticas mais informativas e diretas, além do que mais fáceis de serem interpretadas do que o *P-value* dos métodos frequentistas tradicionais (estimativas mais pontuais dos parâmetros de diversidade genética, por exemplo). E, a distribuição probabilística consegue abarcar mais informações do que os intervalos de confiança para se testar hipóteses pelos métodos frequentistas tradicionais (ALLENDORF; LUIKART, 2006).

Assim, o método Bayesiano com a metodologia baseada na simulação da Cadeia de Monte Carlo Markov possibilita a obtenção de equações analíticas que conseguem descrever processos complexos que envolvem muitas variáveis como frequência alélica, taxas de mutação, tamanho populacional, entre outros (ALLENDORF; LUIKART, 2006).

Além das ferramentas anteriormente citadas, pode-se ainda fazer uso da Análise Fatorial de Correspondência (AFC): é uma análise multivariada canônica que associa indivíduos a sua provável subpopulação, utilizado para variáveis categóricas e no caso,

correspondem às subpopulações – variável a ser explicada, em função dos alelos -, variável explicativa. As subpopulações são representadas como o vetor, que contém suas frequências alélicas, e cada eixo do gráfico corresponde a uma combinação linear para os valores de  $F_{st}$ , que são transformados em monolocus (BELKHIR et al., 2003).

### 3.0 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta das amostras

Foram coletados pelos com bulbos de 61 animais, da cidade do Juazeiro, localizada na região do vale do Salitre, pertencente à mesorregião Vale São-Franciscano, do estado da Bahia; 89 animais das mesorregiões Norte e Centro-Norte do estado do Piauí; e 243 animais do estado de Pernambuco, que foram divididos em 2 subpopulações, sendo 58 animais do município de Agrestina e 185 animais das mesorregiões do Sertão do São Francisco e Sertão Pernambucano. Apesar de pertencerem ao mesmo estado da federação brasileira, esse critério de separação foi tomado em virtude da diferença visual de alguns aspectos fenotípicos entre os animais de Agrestina e os encontrados nas mesorregiões Sertão do São Francisco e Sertão Pernambucano. Os animais de Agrestina se apresentavam ligeiramente maiores e mais robustos que os demais indivíduos do estado de Pernambuco. Os animais analisados do estado do Piauí, não foram separados em 2 subpopulações porque as condições de meio e os animais avaliados eram bem semelhantes.

No total foram 393 amostras distribuídas em 4 subpopulações (Figura 2), denominadas de JUAZ-BA (n=61), NCEN-PI (n=89) que envolveu as duas mesorregiões do estado do Piauí, AGRE-PE (n=58), SERT-PE (n=185) que compreendeu as duas mesorregiões pernambucanas. Todos os animais que tiveram amostras coletadas foram considerados remanescentes da raça equina Nordestina, por possuírem características fenotípicas semelhantes ao antigo padrão da raça (ABCCN, 1987). Nenhum animal era oficialmente registrado, uma vez que, desde meados da década de 90, do século XX, o registro de animais não é realizado. Os animais considerados remanescentes apresentavam as seguintes características: porte pequeno, com altura mínima próxima de 127 cm e máxima de 146 cm, cabeça pequena, cascos fortes com ranilhas profundas, pele de pigmentação escura e que visivelmente apresentavam aptidão para trabalho de campo, na região do Semiárido nordestino (ABCCN, 1987; MELO, 2011).

Como *outgroup* foram utilizados 137 amostras de cavalos da raça Árabe, de diversos haras brasileiros, pertencentes ao banco de dados da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte – MG.

Mangalarga, Mangalarga Marchador, Campolina, Pantaneiro, Crioulo brasileiro, Andaluz, Lusitano, Garrano, Sorraia, Passo peruano, Passo Fino de Porto Rico e da Colômbia,

Crioulo Chileno e Venezuelano e mais outras 52 raças equinas foram utilizadas para avaliar a relação genética com o cavalo Nordestino, com o intuito de detectar quais raças fizeram parte da formação do cavalo Nordestino. Para esse estudo, dados do cavalo selvagem de Przewalski foram utilizados como *outgroup*. Os dados de genotipagem dessas raças pertencem ao PhD. Ernest Gus Cothran Junior, professor e pesquisador do Departamento de Veterinária e Biociências Integradas da Texas A&M University, localizada no estado do Texas, Estados Unidos.

### 3.2 Caracterização dos locais

O município de Agrestina pertence à microrregião do Brejo pernambucano, caracterizado por um relevo com vales estreitos, vegetação com florestas subcaducifólia e caducifólia, inserido no bioma da Caatinga, com clima seco e subúmido (BDE, 2011; BRASIL, 2005a). Agrestina é um município que possui maior disponibilidade de forragem ao longo do ano e clima mais ameno que as cidades localizadas nas mesorregiões do Sertão e do Sertão do São Francisco, no estado de Pernambuco, onde tiveram amostras coletadas. Agrestina foi considerada como uma subpopulação denominada de AGRE-PE.

As mesorregiões do Sertão e Sertão do São Francisco, pertencentes ao estado de Pernambuco, possuem relevo suave a ondulado, vegetação caducifólia, subcaducifólia e com diversas cactáceas, localizadas no bioma da Caatinga, e com clima Semiárido, variando de seco a seco-úmido (BDE, 2011). As duas mesorregiões formaram a segunda subpopulação, chamada de SERT-PE e correspondeu ao conglomerado de quatorze cidades, distribuídas na mesorregião do São Francisco Pernambucano: Afrânio (A), Floresta (FA), Itacuruba (I) e Santa Maria da Boa Vista (SM); e na mesorregião do Sertão Pernambucano: Betânia (B), Custódia (C), Ibirimir (IM), Inajá (IA), Flores (FS), Granito (G), Moreilândia (M), Parnamirim (P), Serrita (S) e Sertânia (SA) (Figura 2).

No estado de Pernambuco verificou-se 2 subpopulações distintas, devido às diferenças fenotípicas entre os animais; e mesmo pertencendo ao mesmo bioma Caatinga, o clima é mais ameno e com a predominância maior do estrato herbáceo do que arbustivo-arbóreo na vegetação de Agrestina, comparativamente às outras duas mesorregiões pernambucanas que tiveram amostras coletadas.

No Piauí, o total de quatro municípios, distribuídos em duas mesorregiões, compôs a 3ª subpopulação e correspondeu na mesorregião do Centro Norte Piauiense: Campo Maior (CM) e Nossa Senhora de Nazaré (NN); e para a mesorregião Norte Piauiense: Batalha (BA) e

Cabeceiras (CA) (Figura 2). De maneira geral, essas duas mesorregiões possuem relevo plano, suavemente ondulado e formado de superfícies tabulares (BRASIL, 2005b). A vegetação é típica de área de Caatinga, plantas xerófitas e caducifólias e área de Cerrado, com presença destacada para Carnaúba, sendo evidente uma transição entre esses dois biomas (JACOMINE et al., 1986). Os animais analisados do estado Piauí não foram separados em duas subpopulações porque os animais avaliados e as condições de meio eram semelhantes, então foram chamados de subpopulação NCEN-PI.

No estado da Bahia, o município de Juazeiro está localizado no vale do Salitre, na mesorregião do Vale São Franciscano, possui relevo plano, na forma de chapadas, interposto por áreas de várzeas e terraços aluviais, a vegetação predominante é estrato arbóreo do bioma Caatinga (BRASIL, 2005c). Essa 4ª subpopulação foi denominada de JUAZ-BA.



Figura 2. Mapa de localização das cidades onde foram coletadas as amostras de pelos com bulbos das 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina

### **3.3 Extração do DNA genômico, amplificação via PCR, corrida eletroforética e leitura dos eletroferogramas**

A extração do DNA genômico foi realizada como descrito em Coelho et al. (2004) pelo método do NaOH. A solução para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi preparada utilizando 5,0 µL da enzima Phusion Flash Master Mix (da marca Finnzymes), 1,0 µL de água ultrapura, 3,0 µL da mistura (*mix*) de *primers* e 1,0 µL do DNA extraído.

Os 14 marcadores microssatélites utilizados nessa pesquisa se encontram na lista que a FAO/ISAG (2011) recomendaram para estudos genéticos em populações de equinos. Os marcadores microssatélites são sequências repetidas em tandem, onde cada bloco é menor que 1 kb, com elevado polimorfismo, apresentam herança mendeliana, expressão codominante (CHAMBERS; MACAVOY, 2000), são abundantes ao longo do DNA, apresentando segmentos com unidades de repetição, variando de 1-6 nucleotídeos (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002), sua distribuição é ao acaso no genoma e pode ser amplificado via PCR (ELLEGREN, 2005). A técnica de genotipagem, com marcadores microssatélites, é fácil de realizar, altamente reprodutível e oferece resultados com elevada confiabilidade. Mediante o exposto, justifica-se o uso de marcadores microssatélites para a presente pesquisa de caracterização genética.

O painel total de genotipagem foi constituído por 14 marcadores microssatélites descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos marcadores microssatélites utilizados para estudo genético de remanescentes da raça equina Nordestina

Cr.	Painel	Locus	Sequência do primer (5'→3')	Referência
1	1	HMS7	F: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC R: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	Guerin, Bertaud e Amigues (1994)
2	1	ASB17	F: GAGGGCGGTACCTTTGTACC R: ACCAGTCAGGATCTCCACCG	Breen et al. (1997)
3	1	ASB23	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R: ACATCCTGGTCAAATCACAGT CC	Irvin et al. (1998)
4	1	HMS6	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGTA ACTCA	Guerin, Bertaud e Amigues (1994)
8	1	AHT5	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	Binns et al. (1995)
9	1	HTG4	F: CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCTCCCTCCCTCTGTTCT	Ellegren et al. (1992)
24	1	AHT4	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT	Binns et al. (1995)
30	1	VHL20	F: CAAGTCCTCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG	Van Haeringen et al. (1994)
9	2	HMS3	F: CCAACTCTTTGTACATAACAAGA R: CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	Guerin, Bertaud e Amigues (1994)
15	2	ASB2	F: CCTTCCTGTAGTTTAAGCTTCTG R: CACA ACTGAGTTCTCTGATAGG	Breen et al. (1997)
21	2	HTG10	F: CAATTC CCGCCCCACCCCGGCA R: TTTTAT TCTGATCTGTCACATTT	Marklund et al. (1994)
4	3	LEX33	F: TTTAATCAAAGGATTCAGTTG R: TTTCTCTTCAGGTGTCCTC	Coogle et al. (1996)
15	3	HTG6	F: CCTGCT TGGAGGCTGTGATAAGAT R: GTTCACTGAATGTCAAAT TCTGCT	Ellegren et al. (1992)
4	3	HTG7	F: CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R: ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	Marklund et al. (1994)

Cr. = Localização no cromossomo; F = *Primer forward*; R = *Primer reverse*.

Foram utilizados 3 painéis multiplex para a PCR, com temperatura de anelamento a 60°C (AHT4, AHT5, ASB17, ASB23, HMS6, HMS7, HTG4 e VHL20), 56°C (ASB2, HTG10 e HMS3) e de 60°C (LEX33, HTG6 e HTG7). Os marcadores microssatélites, que compõem o painel 3, não fazem parte da rotina do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG, portanto, optou-se por enquadrá-los em um painel à parte, o que permitiu economizar tempo, material e reagentes em tentativas de otimizar mais 3 marcadores microssatélites no painel 1. Por isso, o painel 3 apresentou o mesmo programa para PCR do painel 1. Os programas utilizados para amplificação da sequência alvo por PCR no termociclador estão descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Programa para amplificação por PCR utilizado para os painéis 1 e 3

Estágio 1 de 1 ciclo	Estágio 2 de 34 ciclos			Estágio 3 de 1 ciclo	
98°C (ativação da DNA <i>Taq</i> Polimerase)	95°C (desnaturação)	60°C (anelamento)	72°C (extensão)	72°C (extensão final)	10°C
0:10"	0:45"	0:30"	0:30"	60:00"	∞

Tabela 3. Programa para amplificação por PCR utilizado para o painel 2

Estágio 1 de 1 ciclo	Estágio 2 de 34 ciclos			Estágio 3 de 1 ciclo	
98°C (ativação da DNA <i>Taq</i> Polimerase)	95°C (desnaturação)	56°C (anelamento)	72°C (extensão)	72°C (extensão final)	10°C
0:10"	0:45"	0:30"	0:30"	60:00"	∞

Os 12 marcadores utilizados para avaliação da estruturação genética das 4 subpopulações remanescentes do cavalo Nordestino foram: AHT4, AHT5, ASB23, HMS6, HMS7, HTG4, VHL20, ASB2, HTG10, HMS3, HTG6 e HTG7.

A solução para corrida eletroforética consistiu em 0,3 µL de LIZ™ (padrão de peso molecular), 8,7 µL de Formamida *Hi-Di*, ambos, produtos da *Applied Biosystems* e 1 µL da mistura dos painéis dos 3 produtos de PCR, por amostra. As amostras foram submetidas à corrida por eletroforese capilar no aparelho ABI3130 da *Applied Biosystems*, e os eletroferogramas foram avaliados pelo programa GeneMapper v.4.0 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2005). As análises laboratoriais referentes às subpopulações remanescentes do cavalo Nordestino foram realizadas no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, localizado na cidade de Belo Horizonte, capital do estado de Minas Gerais, durante o mês de julho de 2011.

### 3.4 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi desenvolvida em duas etapas. Na primeira etapa, foi analisada cada subpopulação separadamente e realizado testes para avaliar a possibilidade de diferenciação genética entre as subpopulações da raça equina Nordestina que foram estudadas. Esses testes permitem verificar a possibilidade dos rebanhos estudados pertencerem ou não a um mesmo grupo. Para tanto, foram utilizados 14 marcadores microssatélites para avaliar separadamente a diversidade genética das 4 subpopulações remanescentes e estudar efeitos de deriva genética pelo fenômeno de gargalo de garrafa.

Para estudos de diferenciação genética entre as 4 subpopulações remanescentes da raça equina Nordestina foram utilizados 12 marcadores microssatélites dentre os 14 utilizados anteriormente e de um *outgroup* que correspondeu a dados da raça Árabe. A redução no número de marcadores microssatélites foi por causa dos dados utilizados como *outgroup*, oriundos de um banco de dados que possuía painel de genotipagem com 12 marcadores microssatélites descritos. Esses dados de genotipagem pertencem ao Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. A escolha pela raça Árabe como *outgroup* se apoia na hipótese de que tenha ocorrido pouquíssima ou nenhuma introgressão de animais da raça equina Árabe, criados e nascidos no Brasil nas três últimas décadas, correspondendo ao período de formação da raça equina Nordestina enquanto raça oficializada.

Em linhas gerais, no estudo de estruturação genética testou-se a hipótese de nulidade: “não existe diferença genética entre as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina”.

A segunda etapa da pesquisa constou do estudo comparativo das subpopulações da raça equina Nordestina com cinco raças nacionais (Mangalarga, Mangalarga Marchador, Campolina, Pantaneiro e Crioulo brasileiro) e mais 61 raças equinas exóticas, através do uso de 14 marcadores microssatélites para avaliar a possível relação genética com as demais raças nacionais e exóticas utilizadas, visando verificar se essas raças avaliadas tiveram contribuição na formação da raça equina Nordestina. Os dados de genotipagem dessas outras 66 raças e do cavalo selvagem de Przewalski pertencem ao PhD. Ernest Gus Cothran Junior da Texas A&M University, localizada no estado do Texas, nos Estados Unidos.

#### 3.4.1 Diversidade genética

A diversidade genética dentro de cada subpopulação por *locus* microssatélite, e considerando o resultado de todos os *loci* juntos por subpopulação, foi medida através do número de diferentes alelos ( $N_a$ ) e número efetivo de alelos ( $N_e$ ), das estimativas de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada não viesada ( $U_{He}$ ) através do GenAlex v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) e da riqueza alélica ( $A_r$ ) pelo programa FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 1995). O tamanho da amostra rarefeita utilizada nesse trabalho para o cálculo da riqueza alélica foi de 58 indivíduos por subpopulação. Optou-se pela heterozigosidade esperada não viesada para reduzir efeitos de erros, mesmo sabendo que a heterozigosidade esperada não viesada é uma correção praticamente obrigatória para subpopulações com

tamanho amostral ( $n$ ) menor que 50 (NEI; ROYCHOUDHURY, 1974) e todas as subpopulações utilizadas tiveram  $n$  maiores que 50. Para detectar possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cada subpopulação por *locus* microssatélite e, por subpopulação, foi utilizado o Teste Exato (HALDANE, 1954; GUO; THOMPSON, 1992; ROUSSET; RAYMOND, 1995, 1997), com o apoio do programa GenePop v.4.1.1 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008), mediante uso do algoritmo da Cadeia de Monte Carlo Markov, que foi realizado com 10.000 dememorizações em 20 lotes (*batches*), com 5.000 interações em cada lote.

Teste para avaliar o déficit de heterozigoto por subpopulação, considerando os *loci* microssatélites em conjunto e separadamente dentro de suas respectivas subpopulações, também foi realizado com auxílio do GenePop v.4.1.1 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008). O algoritmo da Cadeia de Monte Carlo Markov estimou o *P-value* exato para o teste (GUO; THOMPSON, 1992), e os três parâmetros utilizados para nortear o algoritmo foram: 10.000 dememorização, com 20 lotes e em cada lote 5.000 interações. Nesse caso, a hipótese alternativa de interesse foi detectar possível deficiência de heterozigoto, e a hipótese nula a ser testada, tanto para o teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg como no teste para déficit de heterozigoto, foi: “a união dos gametas na população ou subpopulação é aleatória”.

Os valores de PIC (Conteúdo de Informação Polimórfica) foram estimados através do programa Cervus v.3.0.3 (MARSHALL et al., 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007).

Para conceitos e importância de todos os parâmetros estimados citados anteriormente, consultar a seção 2.3 do REFERENCIAL TEÓRICO desta dissertação.

Os valores da diversidade genética e do PIC por *locus* microssatélite do *outgroup* ARAB se encontram no apêndice desta dissertação.

#### 3.4.2 Avaliação do efeito de gargalo de garrafa

O programa BOTTLENECK v.1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1996) foi usado para detectar possíveis eventos de efeito de gargalo de garrafa nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina. Essa avaliação foi realizada porque se sabe que a população do cavalo Nordestino sofreu redução populacional após inativação da ABCCN e fechamento dos criatórios oficiais. Foram utilizados 3 modelos de evolução de microssatélites: IAM (Modelo de Alelos Infinitos), SMM (Modelo de Mutação Gradual) e o

TPM (Modelo de Duas Fases), e em cada modelo foi realizado 2 testes: Teste do sinal (ST) e o Teste Wilcoxon (WRT). Para definição e compreensão de cada modelo e dos testes estatísticos utilizados, consultar a seção 2.3 do REFERENCIAL TEÓRICO desta dissertação.

Além dos modelos utilizados fez-se uso do método Gráfico: Indicador de Mudança no formato da curva obtida com base no formato da distribuição da frequência dos alelos. Quando a população se encontra em equilíbrio de mutação-deriva, a curva se mostra no formato de L, porém, quando a população se encontra sob efeito de deriva genética por gargalo de garrafa, verificam-se mudanças na forma da curva (LUIKART et al., 1998a).

### 3.4.3 Diferenciação genética / estrutura populacional

O parâmetro  $F_{is}$  da estatística F de Wright (1951) foi realizado com estimador descrito em Weir e Cockerham (1984), por *locus* microssatélite em cada subpopulação e no global, e o  $G_{st}$  foram estimados pelo programa GENETIX v.4.04 (BELKHIR et al., 2003) através de 1000 pseudorréplicas (*bootstrap*), com intervalo de confiança em 95%. Foram avaliados por *locus* microssatélite em cada subpopulação e por subpopulação.

A AMOVA, os parâmetros  $F_{it}$ ,  $F_{st}$  e  $F_{is}$  da Estatística F de Wright (1951) e o parâmetro  $\Phi_{pt}$  da Estatística- $\Phi$  foram calculados pelo GenAlex v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) que seguem procedimentos descritos em Excoffier, Smouse e Quattro (1992), Huff et al. (1993), Peakall et al. (1995) e Michalakis e Excoffier (1996) e com o parâmetro de 999 permutações, objetivando analisar a diferenciação genética entre as subpopulações ( $\Phi_{pt}$  e  $F_{st}$  par a par), fracionando a variância genética em, dentro e entre subpopulação. Para conceitos e importância desses parâmetros supracitados, consultar a seção 2.3 do REFERENCIAL TEÓRICO desta dissertação.

O número de migrantes entre as subpopulações foi estimado através do GenAlex v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Ainda, para avaliar a variação existente entre as subpopulações foram utilizadas distâncias genéticas. Eding e Laval (1999) recomendaram em estudos de estrutura populacional o uso de mais de uma distância genética. Sendo assim, e com base em Takezaki e Nei (1996), Eding e Laval (1999), Kalinowsky (2002) e Takezaki e Nei (2008), optou-se por utilizar-se da  $D_A$  – distância genética de Nei, Tajima e Tatenos (1983) e a  $D_R$  – distância genética de Reynolds, Weir e Cockerham (1983), por acreditar que estas duas distâncias genéticas podem melhor representar a relação de proximidade / distância genética entre as subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina. Isso, considerando

principalmente os aspectos da recente história de formação do cavalo Nordestino enquanto raça – tendo em vista o tempo transcorrido do início da ABCCN, declínio (fechamento dos criatórios oficiais) até os tempos atuais (as condições atuais nas quais se encontram as subpopulações).

Como as subpopulações, a princípio, seriam remanescentes de uma mesma população, e se ocorreu alguma diferenciação genética após fechamento dos núcleos de criações, aconteceu em um curto espaço de tempo, por isso a escolha pela  $D_A$ . A  $D_A$  (1983) foi estimada com auxílio do programa Microsatellite Analyser (MSA) v.4.05 (DIERINGER; SCHLÖTTERER, 2003).

E, a escolha pela outra distância genética foi devido ao recomendado por Eding e Laval (1999): para estudos de divergência genética entre populações pertencentes ao mesmo continente, pode-se usar a de Reynolds ( $D_R$ ), pois adequa-se bem para populações em que o tempo de divergência genética entre elas seja considerado como curto. A  $D_R$  foi estimada utilizando-se o pacote de programas PHYLIP v.3.69 (FELSENSTEIN, 2005).

Para detalhes conceituais sobre essas distâncias genéticas, consultar a seção 2.3 do REFERENCIAL TEÓRICO desta dissertação.

Com base nas matrizes de distância genética  $D_A$  e  $D_R$  foram construídas duas árvores pelo método *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), através do pacote de programas PHYLIP v.3.69 (FELSENSTEIN, 2005). Para verificar a confiabilidade dos nós da árvore foi realizado 1000 pseudorréplicas (*bootstrap*).

As árvores foram obtidas com auxílio do programa CONSENSE do pacote de programas do PHYLIP v.3.69 (FELSENSTEIN, 2005) através do consenso da regra da maioria estendida (*Majority rule extended*), no qual foi utilizado para produzir uma única árvore que melhor representasse a forma como as subpopulações se agrupam. A regra da maioria considera um grupo na ordem das frequências em que mais aparecem dentre todas as árvores analisadas. As árvores obtidas foram visualizadas no programa TreeView v.1.6.6 (PAGE, 1996). A árvore utilizada, tanto para a obtida com dados da  $D_A$  e  $D_R$ , foi um dendograma e, segundo Allendorf e Luikart (2006), o dendograma é uma árvore que serve para uma representação visual das relações entre populações dentro de uma mesma espécie.

Ainda, para o estudo da estruturação genética, além das ferramentas descritas anteriormente, foi utilizado o método Bayesiano para alocar em grupos os animais através do programa STRUCTURE v.2.3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003). Toma como base a inferência Bayesiana e o desaparecimento da influência de alelos raros em que, através do método da Cadeia de Monte

Carlo Markov possibilita determinar o coeficiente de ancestralidade (Q) e divergência genética ( $F_{st}$ ) (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

Fez-se uso do modelo *admixture* e frequências de alelos correlacionados, que se baseiam na probabilidade de um indivíduo poder ter ancestrais mistos. O modelo estima a probabilidade média *a posteriori*, considerando que um determinado indivíduo pertence a uma das subpopulações inferidas, assumindo a condição de equilíbrio de Hardy-Weinberg e de ligação entre os *loci* dentro das subpopulações (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003).

Para tanto, foi utilizado valores para k (grupos inferidos) de 1 a 10 e, para cada k foram repetidos 20 corridas independentes, fazendo uso de um período de 20.000 *burning* e 100.000 repetições na cadeia de Monte Carlo Markov em todas as corridas, como recomendado por Falush, Stephens e Pritchard (2007). Esses parâmetros foram adotados para que ao final obtivesse o número de subpopulações que melhor descreve os dados avaliados. Os resultados obtidos do STRUCTURE v.2.3.3 foram concatenados e analisados pelo CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007), e através dos programas: DISTRICT v.1.1 (ROSENBERG, 2004) e GhostView 4.9 (LANG, 2006), cujos resultados foram mostrados graficamente.

Ainda foi realizada a Análise Fatorial de Correspondência como ferramenta confirmatória do que foi observado na relação genética existente entre as 4 subpopulações de cavalos remanescentes da raça equina Nordestina no  $F_{st}$ , pelo método Bayesiano, para alocar indivíduos em grupos, distâncias genéticas ( $D_A$  e  $D_R$ ) e pelas árvores filogenéticas. A Análise Fatorial de Correspondência foi realizada através do programa GENETIX v.4.04 (BELKHIR et al., 2003).

#### 3.4.4 Estudos da diversidade genética, de efeitos de gargalo genético de remanescentes da raça equina Nordestina considerados como única população e sua relação com outras raças

Os parâmetros de diversidade genética (número total, médio e efetivo de alelos, heterozigosidade observada e esperada por *locus* microssatélite e na população total), considerando as 4 subpopulações como sendo uma única população de remanescentes do cavalo Nordestino, foram estimados pelo GenAlex v.6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). O parâmetro  $F_{is}$  da Estatística-F de Wright (1951), que corresponde ao coeficiente de consanguinidade entre os indivíduos, foi estimado pelo GENETIX v.4.04 (BELKHIR et al., 2003) tanto por cada *locus* microssatélite como pela população total. Teste para detectar

possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e déficit de heterozigotos por *locus* microssatélite e pela população total foram realizados pelo programa GenePop v.4.1.1 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008).

Foi avaliado possíveis efeitos do fenômeno Gargalo de Garrafa, através de 3 modelos: IAM (Modelo de Alelos Infinitos), SMM (Modelo de mutação gradual) e TPM (Modelo de Duas Fases), já descritos anteriormente. Cada modelo foi estatisticamente avaliado pelos seguintes testes: Teste do Sinal (ST) e Teste de Wilcoxon (WRT). Utilizou-se o programa Bottleneck v.1.2.02 (CORNUET; LUIKART, 1996) para a execução dessas análises.

A população remanescente do cavalo Nordestino, considerada como sendo as 4 subpopulações juntas, formando um único grupo, foi avaliada comparativamente com as seguintes raças: Mangalarga, Mangalarga Marchador, Campolina, Pantaneiro, Crioulo brasileiro, Andaluz, Lusitano, Garrano, Sorraia, Passo Peruano, Passo Fino de Porto Rico, Passo Fino da Colômbia, Crioulo Chileno e Venezuelano; para os seguintes parâmetros:  $F_{st}$  da estatística F de Wright (1951) estimado pelo programa GenePop v.4.1.1 (RAYMOND; ROUSSET, 1995; ROUSSET, 2008) e  $G_{st}$  obtido com o apoio do programa GENETIX v.4.04 (BELKHIR et al., 2003), como descrito anteriormente.

Para a construção da árvore genética fez-se uso do banco de dados com 66 raças equinas, dados de remanescentes da raça Nordestina, e dados do cavalo selvagem de Przewalski usado como *outgroup*. A distância de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) foi utilizada para a construção da árvore genética pelo método de estimativas de Máxima Verossimilhança Restrita (REML) através do pacote de programas do PHYLIP v.3.69 (FELSENSTEIN, 2005).

Com base em Eding e Laval (2002), foi escolhido o método da distância genética de corda de Cavalli-Sforza -  $D_c$  (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967), ao invés da distância genética de Reynolds, Weir e Cockerham (1983) e, com base em Cothran e Luis (2005) e Conant, Juras e Cothran (2011), reforçou-se a opção pela  $D_c$  ao invés de Nei, Tajima e Tatenó (1983),  $D_A$ .

A distância genética de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) foi utilizada para comparar remanescentes da raça equina Nordestina com mais 66 raças, entre brasileiras e exóticas, porque considerou-se que as populações (no presente estudo, seriam as raças) divergem devido ao efeito da deriva genética, e as demais forças evolutivas são ignoradas por exercerem praticamente pouca influência no processo de diferenciação genética. Eding e Laval (2002) recomendam a  $D_c$ , para avaliar as diferenças genéticas entre raças no mundo, uma vez que a  $D_c$  se adequa bem, quando o tempo de

divergência entre as populações (raças) é intermediário, pois possibilita obter uma árvore com topologia consistente.

A árvore foi obtida com auxílio do programa CONSENSE, do pacote de programas do PHYLIP v.3.69 (FELSENSTEIN, 2005), através do consenso da regra da maioria estendida (*Majority rule extended*) que analisou 1000 pseudorréplicas. Esse método faz uso do pressuposto de que todas as divergências genéticas ocorrem por causa da deriva genética e da ausência de novas mutações, não assumindo o relógio molecular evolutivo. A filogenia foi estimada pela REML (Estimativa de Máxima Verossimilhança Restrita), que toma como base o modelo de movimento Browniano, supondo que cada *locus* evolui de forma independente e somente por deriva genética (FELSENSTEIN, 1981). Esse método foi escolhido para a construção da árvore porque diversos trabalhos mostram a formação de grupos consistentes na comparação entre raças equinas com relação à própria história de formação das raças equinas no mundo (COTHRAN; LUIS, 2005; CONANT; JURAS; COTHRAN, 2011).

## 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Diversidade genética por *locus* microssatélite e para as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina

Todos os 14 marcadores microssatélites utilizados nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina avaliadas foram amplificados normalmente, possibilitando detectar todos os alelos presentes em cada *locus* microssatélite nas subpopulações.

A diversidade genética de uma subpopulação corresponde a variedade de alelos presentes nela, que pode ser descrita pelo número de diferentes alelos encontrados por *locus*, pela riqueza alélica e a heterozigosidade esperada não viesada se encontram nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Composição genética e valores do Conteúdo de Informação Polimórfica de cada *locus* microssatélite nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram avaliadas

Sp	<i>Locus</i>	Na	Ne	Ar	Ho	UHe	EHW	Fis	PIC
<b>AGRE-PE</b> n = 58	AHT4	8	5,203	7,951	0,845	0,815	NS	-0,037 <sup>ns</sup>	0,780
	AHT5	8	4,748	6,902	0,828	0,796	NS	-0,040 <sup>ns</sup>	0,759
	ASB17	12	5,640	12,899	0,810	0,830	NS	0,024 <sup>ns</sup>	0,802
	ASB2	10	5,980	8,951	0,897	0,840	NS	-0,068 <sup>ns</sup>	0,813
	ASB23	9	6,943	8,902	0,897	0,863	NS	-0,039 <sup>ns</sup>	0,839
	HMS3	7	5,524	7,000	0,759	0,826	NS	0,082 <sup>ns</sup>	0,795
	HMS6	7	3,216	6,000	0,690	0,695	NS	0,008 <sup>ns</sup>	0,660
	HMS7	7	4,229	5,998	0,776	0,770	NS	-0,007 <sup>ns</sup>	0,726
	HTG10	10	6,323	10,000	0,776	0,849	NS	0,087 <sup>ns</sup>	0,823
	HTG4	7	3,539	6,000	0,672	0,724	NS	0,071 <sup>ns</sup>	0,675
	HTG6	6	2,628	6,949	0,603	0,625	*	0,035 <sup>ns</sup>	0,575
	HTG7	5	2,600	4,951	0,586	0,621	NS	0,056 <sup>ns</sup>	0,574
	LEX33	8	4,242	6,951	0,724	0,771	*	0,061 <sup>ns</sup>	0,731
	VHL20	11	7,097	9,951	0,845	0,867	NS	0,025 <sup>ns</sup>	0,843
<b>JUAZ-BA</b> n = 61	AHT4	8	4,689	7,647	0,869	0,793	NS	-0,096 <sup>ns</sup>	0,759
	AHT5	7	4,128	6,638	0,689	0,764	NS	0,100 <sup>ns</sup>	0,718
	ASB17	13	4,027	13,434	0,754	0,758	NS	0,005 <sup>ns</sup>	0,727
	ASB2	9	4,634	8,610	0,820	0,791	NS	-0,037 <sup>ns</sup>	0,759
	ASB23	9	5,219	8,262	0,836	0,815	NS	-0,026 <sup>ns</sup>	0,783
	HMS3	7	4,704	6,959	0,672	0,794	NS	0,154 <sup>ns</sup>	0,760
	HMS6	6	3,015	6,000	0,672	0,674	NS	0,003 <sup>ns</sup>	0,640
	HMS7	6	3,494	5,986	0,770	0,720	NS	-0,071 <sup>ns</sup>	0,665

Continua na próxima página

Continuação da Tabela 4

	HTG10	10	6,006	8,995	0,803	0,840	NS	0,044 <sup>ns</sup>	0,814
	HTG4	6	3,822	6,000	0,787	0,744	NS	-0,057 <sup>ns</sup>	0,697
	HTG6	7	2,467	5,647	0,525	0,600	NS	0,126 <sup>ns</sup>	0,560
	HTG7	5	2,674	4,000	0,639	0,631	NS	-0,013 <sup>ns</sup>	0,579
	LEX33	7	4,103	7,878	0,803	0,762	NS	-0,054 <sup>ns</sup>	0,717
	VHL20	10	7,390	8,650	0,902	0,872	NS	-0,034 <sup>ns</sup>	0,850
<b>NCEN-PI</b> n = 89	AHT4	8	4,580	7,976	0,820	0,786	NS	-0,044 <sup>ns</sup>	0,751
	AHT5	7	4,487	7,186	0,798	0,782	NS	-0,021 <sup>ns</sup>	0,743
	ASB17	14	5,009	12,552	0,775	0,805	NS	0,037 <sup>ns</sup>	0,784
	ASB2	9	5,122	9,903	0,809	0,809	NS	0,000 <sup>ns</sup>	0,779
	ASB23	9	5,220	7,671	0,798	0,813	NS	0,019 <sup>ns</sup>	0,784
	HMS3	7	5,024	7,000	0,775	0,805	*	0,038 <sup>ns</sup>	0,772
	HMS6	6	3,389	6,312	0,764	0,709	NS	-0,078 <sup>ns</sup>	0,674
	HMS7	6	3,431	6,911	0,640	0,713	NS	0,102 <sup>ns</sup>	0,666
	HTG10	9	7,120	9,660	0,854	0,864	NS	0,012 <sup>ns</sup>	0,844
	HTG4	6	3,366	6,313	0,685	0,707	NS	0,030 <sup>ns</sup>	0,657
	HTG6	6	2,115	5,987	0,517	0,530	NS	0,025 <sup>ns</sup>	0,486
	HTG7	4	2,192	4,000	0,584	0,547	NS	-0,069 <sup>ns</sup>	0,505
	LEX33	8	5,074	8,636	0,798	0,807	NS	0,012 <sup>ns</sup>	0,776
VHL20	9	5,996	9,799	0,809	0,838	NS	0,035 <sup>ns</sup>	0,813	
<b>SERT-PE</b> n = 185	AHT4	9	5,304	7,757	0,838	0,814	NS	-0,030 <sup>ns</sup>	0,785
	AHT5	9	4,520	7,183	0,768	0,781	NS	0,017 <sup>ns</sup>	0,745
	ASB17	15	6,076	12,606	0,870	0,838	NS	-0,039 <sup>ns</sup>	0,818
	ASB2	12	5,951	9,476	0,773	0,834	NS	0,074 <sup>ns</sup>	0,811
	ASB23	8	5,610	8,157	0,822	0,824	NS	0,003 <sup>ns</sup>	0,797
	HMS3	7	5,227	6,998	0,762	0,811	NS	0,060 <sup>ns</sup>	0,784
	HMS6	7	2,814	6,381	0,670	0,646	*	-0,037 <sup>ns</sup>	0,615
	HMS7	8	3,738	6,693	0,676	0,734	NS	0,080 <sup>ns</sup>	0,688
	HTG10	10	7,090	9,652	0,843	0,861	NS	0,021 <sup>ns</sup>	0,843
	HTG4	7	3,681	6,273	0,778	0,730	NS	-0,066 <sup>ns</sup>	0,687
	HTG6	7	2,892	6,064	0,605	0,656	NS	0,077 <sup>ns</sup>	0,598
	HTG7	4	2,405	4,274	0,578	0,586	NS	0,013 <sup>ns</sup>	0,538
	LEX33	10	5,172	8,369	0,805	0,809	NS	0,004 <sup>ns</sup>	0,780
VHL20	10	6,742	9,856	0,816	0,854	NS	0,044 <sup>ns</sup>	0,835	

Sp = Subpopulação; n = tamanho da amostra; Na = número de diferentes alelos; Ne = número efetivo de alelos; Ar = riqueza alélica; Ho = heterozigiosidade observada; UHe = heterozigiosidade esperada não viesada; EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F<sub>is</sub> = Coeficiente de consanguinidade; PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica; NS = Não Significativo; \* P < 0,05.

Tabela 5. Resumo da diversidade alélica das 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram avaliadas

Sp		Na	Ne	Ar	Ho	UHe	EHW	Fis
<b>AGRE-PE</b> n = 58	<b>Média</b>	8,214	4,851	7,815	0,765	0,778	NS	0,017 <sup>ns</sup>
	<b>EP</b>	0,526	0,401	0,568	0,026	0,022		
<b>JUAZ-BA</b> n = 61	<b>Média</b>	7,857	4,312	7,479	0,753	0,754	NS	0,002 <sup>ns</sup>
	<b>EP</b>	0,573	0,351	0,594	0,027	0,020		
<b>NCEN-PI</b> n = 89	<b>Média</b>	7,714	4,437	7,850	0,745	0,751	NS	0,008 <sup>ns</sup>
	<b>EP</b>	0,633	0,374	0,570	0,027	0,027		
<b>SERT-PE</b> n = 185	<b>Média</b>	8,786	4,802	7,839	0,758	0,770	NS	0,016 <sup>ns</sup>
	<b>EP</b>	0,705	0,399	0,555	0,024	0,023		

Sp = Subpopulação; EP = Erro Padrão; n = tamanho da amostra; Na = número de diferentes alelos; Ne = número efetivo de alelos; Ar = riqueza alélica; Ho = Heterozigosidade Observada; UHe = Heterozigosidade esperada não viesada; EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; Fis = Coeficiente de consanguinidade; NS = Não Significativo.

O total de alelos encontrado foi de 115, 110, 108 e 123 para as subpopulações AGRE-PE, JUAZ-BA, NCEN-PI e SERT-PE, respectivamente. O número de diferentes alelos encontrados por *locus* microssatélite variou de 5 (HTG7) a 12 (ASB17) na subpopulação AGRE-PE, de 5 (HTG7) a 13 (ASB17) para a subpopulação JUAZ-BA, de 4 (HTG7) a 14 (ASB17) na subpopulação NCEN-PI e de 4 (HTG7) a 15 (ASB17) para a subpopulação SERT-PE (Tabela 4).

De maneira geral, os *loci* microssatélites apresentaram elevado número de diferentes alelos. O *locus* HTG7 apresentou o menor número de diferentes alelos em todas as subpopulações, que variou de 4 a 5 alelos. O mesmo foi verificado por Bierman (2010), estudando cavalos Árabes que encontrou 4 alelos, Azor et al. (2007) com cavalos da raça Spanish trotter e com o grupo formado por cavalos Andaluz e das ilhas Baleares, que identificaram 4 e 5 alelos para o mesmo *locus* microssatélite, respectivamente. Tozaki et al. (2003) encontraram de 1 a 5 alelos para esse mesmo marcador em 11 raças de cavalos Asiáticos, Anglo-Árabe e Puro Sangue Inglês. Achmann et al. (2004) encontraram 3 alelos no *locus* HTG7 em cavalos da raça Lipizzaner.

Os *loci* ASB17 e ASB2 foram os mais polimórficos para a raça equina Árabe e somente o *locus* ASB17 para a raça Puro Sangue Inglês no trabalho de Bierman (2010), nos quais foram identificados 10 diferentes alelos para cada *locus*. Azor et al. (2007) encontraram para equinos da raça Spanish Trotter, 7 diferentes alelos para o ASB17, mas os *loci* com maior número de alelos foram: ASB2, HTG10 e VHL20 com 8 alelos cada. Todavia, os

mesmos autores detectaram que o *locus* ASB17 apresentou maior número de diferentes alelos com o total de 12, no grupo de cavalos das ilhas Baleares e da raça Andaluz.

Baker (1994) recomenda que um *locus* deve ter, no mínimo, 4 diferentes alelos para ser utilizado em estudo genéticos, logo, todos os *loci* se mostraram adequados nesse trabalho.

O número médio de diferentes alelos por subpopulação (Tabela 5) foi numericamente maior em SERT-PE (8,786), apesar dessa subpopulação ter apresentado a maior amplitude ao se avaliar o número total de diferentes alelos encontrados por *locus*. Essa superioridade numérica pode ser, provavelmente, devido ao tamanho da amostra que foi maior para essa subpopulação. Já para a subpopulação AGRE-PE, que obteve o segundo maior número médio de diferentes alelos (8,214), isso pode ser reflexo de cruzamentos que conduziram em elevada diversidade alélica.

O número de alelos é influenciado pelo tamanho amostral, porém, a riqueza alélica não. A riqueza alélica permite avaliar a diversidade de alelos por *locus* fixando o tamanho amostral para todas as subpopulações, o que é uma solução para comparação da diversidade de alelos entre as subpopulações, sem que ocorra influência do tamanho da amostra (PETIT; EL MOUSADIK; PONS, 1998; ALLENDORF; LUIKART, 2006). A riqueza alélica (Tabela 4) por *locus* microssatélite em cada subpopulação também foi elevada, variando de 4 para o *locus* HTG7 nas subpopulações SERT-PE e NCEN-PI a 13,434 para o *locus* ASB17 na subpopulação JUAZ-BA.

Existem duas prováveis explicações para essa elevada variação de alelos por *locus* microssatélite nas 4 subpopulações estudadas: ou os animais estão sendo acasalados com outras raças (cruzamentos) e/ou os acasalamentos intrarracial ocorrem mais entre animais menos aparentados - esse último cenário seria ideal para a conservação da raça. Isto é, o ideal seria que a grande diversidade observada fosse oriunda de um adequado manejo genético. Esses resultados podem ser confirmados pela estimativa de heterozigosidade esperada, pelo teste para detectar possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e através dos valores do coeficiente de consanguinidade ( $F_{is}$ ). Ao comparar com a literatura, os valores de riqueza alélica por subpopulação remanescente do cavalo Nordestino se encontram numericamente superiores para quase todas as 39 raças equinas avaliadas por Leroy et al. (2009), que utilizaram 11 marcadores microssatélites, dos quais 10 eram iguais ao deste trabalho e similares ao observado por Ling et al. (2010), que avaliaram 28 raças equinas, predominantemente asiáticas, com 26 marcadores microssatélites dos quais 12 foram os mesmos utilizados no presente trabalho.

Outra medida de diversidade genética é o número efetivo de alelos, que permite estimar o número de alelos presentes em uma população ideal com a homozigidade equivalente a da população avaliada (BROWN; WEIR, 1983). O número efetivo de alelos por *locus* microssatélite (Tabela 4) variou de 2,115 (HTG6 em NCEN-PI) a 7,390 (VHL20 em JUAZ-BA). As 4 subpopulações remanescentes (Tabela 5) apresentaram valores de número efetivo de alelos próximos entre si (aproximadamente 4), mesmo com a amplitude elevada, conforme observado por *locus* microssatélite na Tabela 4. O número médio efetivo de alelos para as 4 subpopulações avaliadas foi similar ao observado por Plante et al. (2007) em 17 diferentes raças equinas, incluindo cavalos da ilha de Sable (um grupo genético que vive em condições de quase isolamento geográfico e da ação do homem), utilizando 12 marcadores microssatélites comuns aos utilizados nessa pesquisa.

A medida mais importante na avaliação da diversidade genética é a heterozigidade esperada, também chamada de diversidade de genes ou alélica (NEI, 1987), que corresponde a quantidade de heterozigidade presente na subpopulação, ou seja, a proporção média de *loci* heterozigotos esperada em uma população, quando ocorre predominância de acasalamentos ao acaso (HEDRICK, 2005). O menor valor para a heterozigidade esperada não viesada por *locus* microssatélite foi observado para HTG6 (0,530) na subpopulação NCEN-PI e o maior valor foi de 0,872 para o *locus* VHL20 na subpopulação JUAZ-BA (Tabela 4). As heterozigidades esperadas não viesadas por subpopulação foram similares entre elas (Tabela 5) e apresentaram valores que refletem uma elevada diversidade.

A heterozigidade observada estima a proporção de heterozigotos que se tem atualmente na subpopulação, e tiveram valores numéricos semelhantes à esperada não viesada, tanto por *locus* microssatélite como por subpopulação (Tabelas 4 e 5). Os valores obtidos pela heterozigidade esperada não viesada e observada por *locus* microssatélite e por subpopulação indicam, de modo geral, elevada variação genética. Ott (1992) declarou que um *locus* é considerado altamente polimórfico quando sua heterozigidade observada fornece valor igual ou maior que 0,7 e cerca de 80% de todos os *loci* microssatélites, presentes na Tabela 4, foram iguais ou superiores a esse valor.

Com base nas medidas de número total de alelos por *locus*, na média de alelos por subpopulação, no número efetivo e na riqueza alélica e nas heterozigidades observadas e esperadas não viesadas que foram, em linhas gerais, elevadas, pode-se sugerir que as subpopulações estão sendo acasaladas, seja com animais de outras raças ou com animais da mesma raça, nesse último caso entre os indivíduos menos aparentados - pouca repetição no uso de mesmos reprodutores e matrizes, em outras palavras é provável que esteja ocorrendo

uma rotatividade maior entre garanhões e éguas na reprodução. Populações mais consanguíneas podem apresentar número de alelos e heterozigosidade mais baixos que aquelas, onde o acasalamento predominante ocorre entre indivíduos menos aparentados. Mas nem sempre isso se verifica. Não obstante, isso só será confirmado com a avaliação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e teste exato para detectar déficit de heterozigotos.

Bömcke, Gengler e Cothran (2011) encontraram valores de 5,93 para número de diferentes alelos e 3,22 para número médio efetivo, com heterozigosidade esperada de 0,621, sem detectar desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg em pôneis da raça Skyros. Leroy et al. (2009), estudando as raças equinas Friesian e Poitevin encontraram baixo número médio de alelos (3,45 e 4,82, respectivamente) e de riqueza alélica (3,2 e 4,4, respectivamente), e com heterozigosidades esperadas de 0,43 e 0,59, respectivamente. Apesar de baixos valores de estimativas de alelos e de heterozigosidades esperadas, os mesmos autores não encontraram desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg e nem detectaram consanguinidade com valores significativos. Aberle et al. (2004) encontraram número médio de alelos de 4,37, heterozigosidade esperada de 0,574, mas não detectaram déficit de heterozigotos em equinos da raça Árabe. Por outro lado, Plante et al. (2007) encontraram número médio e efetivo médio de alelos de 4,67 e 3,21, respectivamente, e heterozigosidade esperada de 0,65 para cavalos da Ilha de Sable, no Canadá, e detectaram significativo déficit de heterozigotos. Behl et al. (2007) encontraram número médio e médio efetivo de alelos e heterozigosidades esperadas, próximos de 5, 4 e 0,78, respectivamente, para 5 raças de cavalos Indianas (Marwari, Spiti, Bhutia, Manipuri, Zanskari) e todas apresentaram significativos déficits de heterozigotos. Chauhan, Gupta e Dhillon (2004) encontraram, para cavalos indianos da raça Spiti, valores de 4,8 e 3,2 para número médio e efetivo médio de alelos, respectivamente, e heterozigosidade esperada de 0,6689, e detectaram déficit de heterozigotos.

Tais dados foram relatados com o intuito de confrontar que nem sempre, por si só, os valores médio e efetivo médio de alelos e heterozigosidades esperadas, elevados ou baixos, são fortes indicativos de que efeitos de forças evolutivas e consanguinidades estejam ou não atuando significativamente numa população. O que pode elucidar com maior confiabilidade se há presença ou não das forças evolutivas, são testes estatísticos para averiguar desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg e avaliar possíveis déficits de heterozigotos e, em especial, para consanguinidade, é análise do parâmetro  $F_{is}$ . Hedrick (2005) alerta que fatores sistemáticos e acasalamentos preferenciais podem estar presentes em uma população e não causarem desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg e, que um conjunto de fatores pode atuar numa dada população, afetando sua frequência genotípica de tal modo que

“anula” (mascara) os efeitos de outras forças evolutivas, resultando na manutenção do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Desvios significativos ( $P < 0,05$ ) no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados em 4 *loci* microssatélites, os *loci* HTG6 e LEX33 na subpopulação AGRE-PE, o *locus* HMS3 para NCEN-PI e HMS6 em SERT-PE (Tabela 4). Porém, ao se analisar todos os marcadores microssatélites em conjunto, dentro de cada subpopulação, não foram identificados desvios significativos (Tabela 5). Esses desvios pontuais por marcador microssatélite podem estar evidenciando a presença de eventos como cruzamentos, acasalamento preferencial negativo e fluxo gênico.

Para o teste de déficit de heterozigoto, somente a subpopulação SERT-PE apresentou significativo déficit de heterozigoto ( $P = 0,0366$ ), e isso pode estar associado aos *loci* HMS3 e ASB2, sendo os únicos dentro do grupo SERT-PE que foram identificados valores significativos (0,0140 e 0,0228, respectivamente). Todavia, esse déficit de heterozigoto não exerceu influência para alterar significativamente o equilíbrio de Hardy-Weinberg e nem o  $F_{is}$ . Como não foram aparentes os motivos pelos quais se detectaram déficit de heterozigotos, sugere-se que a subpopulação avaliada apresentou uma quantidade de animais que se encontram, de algum modo, isolados reprodutivamente, implicando em acasalamentos não aleatórios. Achmann et al. (2001) encontraram significativo déficit de heterozigoto para o *locus* HMS3, e esses autores associaram essa observação à mutação de ponto encontrado no local de anelamento do *primer*, concorrendo para erros de leitura, onde pode se verificar fraca amplificação de alguns alelos desse marcador. Ainda, aqueles mesmos autores, também observaram que o *locus* ASB2 também possui mutação de ponto, mas não detectaram déficit de heterozigotos significativo para esse marcador.

O  $F_{is}$  é um parâmetro que estima a redução da heterozigosidade de um indivíduo devido a acasalamentos não aleatórios dentro de sua subpopulação (HARTL; CLARK, 2010). Todos os valores de  $F_{is}$  por *locus* microssatélite e por subpopulação avaliados nesta pesquisa, não foram estatisticamente significativos, ou seja, os valores obtidos não diferem de zero. Biologicamente, isso indica que os acasalamentos ocorrem predominantemente ao acaso, pois não existem evidências estatísticas da predominância de acasalamentos entre indivíduos aparentados, uma vez que, de maneira geral, não existe efeito de consanguinidade efetivamente atuando nas subpopulações.

Os valores de PIC (Tabela 4) variaram de 0,486 (no *locus* HTG6 na subpopulação NCEN-PI) a 0,850 (no *locus* VHL20 na subpopulação JUAZ-BA). Botstein et al. (1980) classificaram os *loci* como sendo muito informativos, quando o valor de PIC (Conteúdo de

Informação Polimórfica) for superior a 0,5, razoavelmente informativos quando o valor for menor que 0,5 e maior que 0,25, e pouco informativos quando for igual ou menor que 0,25. Sendo assim, os *loci* que apresentaram valores de PIC igual ou menor que 0,555 foram classificados como razoavelmente informativos, que foi o caso dos seguintes *loci*: HTG6 (0,486) e HTG7(0,505) na subpopulação NCEN-PI e HTG7 (0,538) na subpopulação SERT-PE. Os demais *loci* tiveram valores de PIC superiores a 0,555, logo, classificados como muito informativos, o que representaram 94,64% do universo de *loci* microssatélites, presentes na Tabela 4.

Com base na diversidade de alelos e nos valores de PIC, os *loci* microssatélites utilizados na presente pesquisa foram polimórficos e altamente informativos. Sendo assim, foram eficazes na caracterização genética do remanescente da raça equina Nordestina, nas mesorregiões avaliadas.

#### **4.2 Avaliação do efeito de gargalo de garrafa nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina**

De acordo com o resultado obtido pelo método Gráfico (Indicador de Mudança no formato da curva), as 4 subpopulações não se encontravam sob o efeito de gargalo genético recente porque a curva se apresentou com o formato normal de “L” (Figura 3). Esse método testa alelos raros, presentes em cada *loci*, com base na distribuição da frequência esperada dos alelos, e quando a população não demonstra ter sofrido eventos de gargalos genéticos significa que está em equilíbrio de mutação e deriva genética. Não foram observadas distorções na distribuição na frequência de alelos nos *loci* neutros, logo, as 4 subpopulações estavam mais próximas do equilíbrio de mutação e deriva genética por, provavelmente, apresentarem uma proporção elevada de alelos de baixa frequência nos *loci* seletivamente neutros (LUIKART et al. 1998b). Nei, Chakraborty e Fuerst (1976) e Allendorf (1986) informaram que alelos de baixa frequência, geralmente são rapidamente perdidos durante evento de gargalo genético.

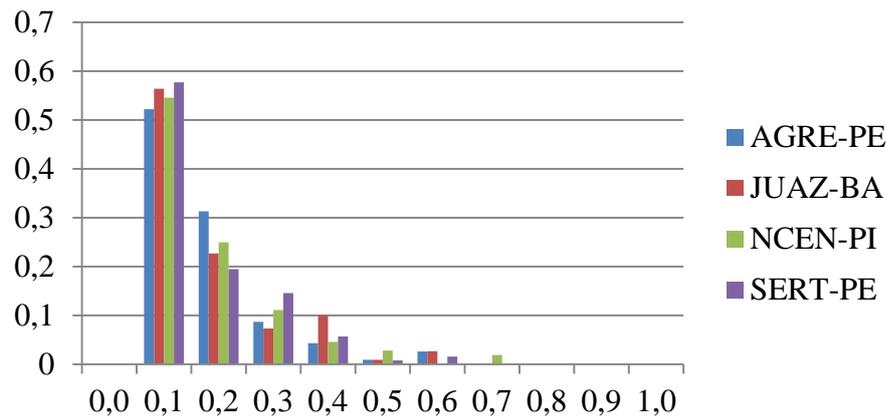


Figura 3. Distribuição das frequências dos alelos nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram estudadas. O eixo horizontal representa as classes de frequência de alelos e as barras correspondem à proporção de todos os alelos detectados em cada classe

Também não se verificou evidências estatísticas do efeito de gargalo genético pelo Modelo de Mutação Gradual (SMM) nas 4 subpopulações (Tabela 6), corroborando com o que foi observado pelo método Gráfico. Provavelmente, se ocorreu algum evento de gargalo genético nas 4 subpopulações remanescentes do cavalo Nordestino não foi recente ou apenas uma redução demográfica do rebanho efetivo tenha acontecido, sem que houvesse um estrangulamento genético com perdas e/ou fixação de alelos (efeito de gargalo genético), e/ou as subpopulações não estão completamente isoladas e contém genes de migrantes o que mascarou os efeitos do gargalo genético (LUIKART et al., 1998a,b). Essas podem ser as principais razões pelas quais não foi detectado efeito de gargalo genético por SMM e o método Gráfico, sendo a última justificativa a mais consistente de todas, conforme discutidos no tópico de diferenciação genética, no qual ficou claro que existiu um fluxo genético considerável entre as 4 subpopulações remanescentes.

Giacomoni, Fernández-Stolz e Freitas (2008) avaliaram efeito de gargalo genético em 3 subpopulações de equinos da raça Pantaneiro e, também não verificaram distorções pelo método Gráfico, onde obtiveram uma curva com formato normal (Tipo “L”) e não detectaram efeito significativo com o Modelo de Mutação Gradual com o Teste de Wilcoxon. Os mesmos autores encontraram efeitos significativos em 2 subpopulações (Ipiranga e Promissão) para o Modelo de Mutação em Duas Fases através do Teste de Wilcoxon, eles sugeriram como prováveis explicações o reduzido tamanho amostral usado e que as subpopulações podem ter sofrido efeito recente de gargalo de garrafa.

Cunningham et al. (2001) observaram que raças em formação passam por eventos de gargalos de garrafa e alelos raros tendem a ser perdidos, conseqüentemente ocorre redução na diversidade alélica. No entanto, alelos raros contribuem muito pouco para a heterozigosidade esperada devido à diversidade alélica não se reduzir na mesma proporção (NEI; MARUYAMA; CHAKRABORTY, 1975). Esse efeito aumenta a deriva genética numa população, acarretando a fixação de certos genes e perdas na diversidade genética.

Tabela 6. Resumo do teste para efeito de gargalo de garrafa nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina que foram avaliadas

Sp	SM	IAM	TPM	SMM
AGRE-PE	ST	Esp.=8,32 (P=0,0007*)	Esp.=8,32 (P=0,0072*)	Esp.=8,25 (P=0,3377 <sup>ns</sup> )
	WRT	0,00003*	0,00015*	0,78687 <sup>ns</sup>
JUAZ-BA	ST	8,32 (P=0,0361*)	8,33 (P=0,0369*)	8,23 (P=0,1734 <sup>ns</sup> )
	WRT	0,00015*	0,04529*	0,87939 <sup>ns</sup>
NCEN-PI	ST	8,25 (P=0,0006*)	8,27 (P=0,0343*)	8,30 (P=0,0653 <sup>ns</sup> )
	WRT	0,00003*	0,01477*	0,57239 <sup>ns</sup>
SERT-PE	ST	8,22 (P=0,0006*)	8,29 (P=0,0069*)	8,26 (P=0,16874 <sup>ns</sup> )
	WRT	0,00003*	0,00015*	0,29578 <sup>ns</sup>

Sp = subpopulação; SM = método estatístico; ST = Teste do Sinal; WRT = Teste de Wilcoxon; IAM = Modelo de Alelos Infinitos; TPM = Modelo de Mutação em Duas Fases; SMM = Modelo de Mutação Gradual; \* Rejeição da hipótese nula ( $H_0$  = equilíbrio de mutação e deriva genética, ou seja,  $H_0$  = sem efeitos de gargalo genético); NS = não significativo; P = probabilidade; Esp. = número esperado de *loci* com excesso de heterozigosidade.

No entanto, para os modelos de Alelos Infinitos (IAM) e de Mutação em duas fases (TPM), os 2 métodos estatísticos utilizados detectaram efeito de gargalo genético sobre as 4 subpopulações de remanescentes do cavalo Nordeste (Tabela 6). Cornuet e Luikart (1996) observaram que o Modelo de Mutação Gradual (SMM) de Ohta e Kimura (1973) tende a gerar menor excesso de heterozigosidade do que IAM, logo, pelo IAM foi possível encontrar efeito de gargalo genético. E, Luikart et al. (1998b) verificaram que são poucos os *loci* microssatélites que se comportam estritamente como proposto pelo SMM ou IAM, sendo o TPM mais recomendado para os *loci* microssatélites, que é um intermediário entre SMM e IAM.

Testes para detectar efeitos de gargalo genético contrapõem o excesso de heterozigosidade esperada com a heterozigosidade esperada em equilíbrio de mutação e deriva genética, e os *loci* que tendem a evoluir, demonstrando efeitos de gargalo genético

(desequilíbrio de mutação e deriva genética), geralmente seguem o Modelo de Alelos Infinitos (IAM) de Kimura e Crow (1964). O excesso de heterozigiosidade esperada com relação ao de heterozigiosidade esperada em equilíbrio de mutação e deriva genética, quando detectado e significativo, ocorre devido ao efeito de gargalo genético. Testes que avaliam o equilíbrio entre mutação e deriva genética, como os realizados nesse trabalho, baseiam-se no pressuposto de que uma população que sofreu redução no tamanho populacional, como é o caso do cavalo Nordestino após a inativação da ABCCN, pode demonstrar correlacionada redução no número de alelos e da heterozigiosidade esperada pelas proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg com o passar do tempo (CORNUET; LUIKART, 1996; PIRY; LUIKART; CORNUET, 1999).

Foi detectado efeito de gargalo genético nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina pelos modelos IAM e TPM, pois rejeitou-se a hipótese nula. Cornuet e Luikart (1996) alertaram que eventos de gargalo genético podem elevar a taxa de endogamia, perda da variação genética e fixação ou perda de alelos e, em grupos onde o tamanho populacional já é pequeno, os efeitos do gargalo genético causam sérias perdas na diversidade gênica (heterozigiosidade esperada). Nei, Maruyama e Chakraborty (1975) observaram que o número médio de alelos geralmente reduz mais rápido do que a heterozigiosidade, em virtude da endogamia ou devido ao efeito de gargalo genético. Piry, Luikart e Cornuet (1999) informaram que, como consequência, a heterozigiosidade esperada se torna maior que a heterozigiosidade esperada na condição de equilíbrio de mutação e deriva.

Mesmo sendo detectado efeito de gargalo genético nas 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina pelos Modelos de Alelos Infinitos e de Mutação em Duas Fases para todos os testes estatísticos aplicados, o gargalo genético não foi suficiente para causar diferenciação genética entre as subpopulações, como foi discutido no tópico anterior sobre diferenciação genética.

O cavalo Nordestino, demograficamente, vem experimentando declínio gradativo no tamanho populacional desde a inativação da ABCCN, que acentuou a falta de interesse pela raça por parte de grandes e médios criadores, e, nos dias de hoje, pela prática comum da castração dos machos, principalmente dos animais fenotipicamente melhores. Associado a isso, tem-se o processo de mecanização agrícola e aumento no número de automóveis nas zonas rurais, que vêm declinando o número de cavalos de diferentes raças em muitos países. Todo esse cenário sugere que o cavalo Nordestino deve estar experimentando eventos de estrangulamento populacional, mesmo que a princípio podem somente afetar o número de animais, sem afetar geneticamente, com toda a certeza se continuar acontecendo, muito da

diversidade alélica poderá ser perdida por causa dos efeitos danosos do evento de gargalo genético.

Allendorf (1986) e Leberg (1992) alertaram que populações que sofreram gargalos genéticos perdem alelos raros, porém, podem, ainda, apresentar substancial heterozigosidade esperada e variação genética quantitativa, que são perdidas mais vagarosamente do que a variação alélica, e que influenciam no *fitness*, para as atuais condições de meio onde se encontram a população, do que na variação alélica propriamente dita.

Aberle et al. (2004) relataram que populações de cavalos Sorraia e de cavalos selvagens Przewalski demonstraram severas perdas no número médio de alelos e no nível de heterozigosidade esperada, porque essas populações passaram por recentes e intensos estrangulamentos demográficos (redução considerável no número de indivíduos na população em um passado recente) e efeito de gargalo genético. Essas 2 populações se encontram atualmente sob forte ameaça de extinção, e estão inseridas em projetos de preservação para que não haja mais perdas da diversidade genética e que possam, algum dia, sair dessa condição, recuperando um bom nível de diversidade genética com tamanho populacional seguro.

Segundo Cornuet e Luikart (1996), a avaliação e identificação de populações que sofreram redução recente no número efetivo são importantes, pois as que apresentam redução por efeito de gargalo de garrafa estão mais susceptíveis às ameaças e riscos de extinção. Possibilita também compreender as mudanças ocorridas na população, fornecendo subsídios para projetar perspectivas sobre o futuro e direcionar ações de conservação ou até mesmo para a preservação daquela população que sofreu efeito de gargalo genético.

Mesmo que geneticamente, as subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina apresentaram elevada diversidade alélica sem evidências de ameaças imediatas, detectar que ocorreram eventos de gargalos genéticos, mesmo não tendo sido recentes nas subpopulações, é um alerta. A falta de criadores, a inativação da ABCCN, o cenário político, como a falta de projetos de conservação e do próprio desconhecimento sobre o estado em que se encontra a raça por parte das autoridades do governo brasileiro, a situação econômica da raça (valor comercial), devido outras raças de cavalos especializadas serem utilizadas amplamente para a prática de esportes populares, como na Vaquejada de circuito oficial, e o próprio fenótipo visível do atual cavalo Nordestino não atrair os olhos tradicionais de criadores de cavalos, bem como o cenário social, com as mudanças no estilo de vida das pessoas de zonas rurais, que cada vez mais trocam o cavalo como meio de transporte por

motocicletas e outros automóveis. Sob tais aspectos em que se encontra o cavalo Nordestino, o coloca em constante ameaça.

### **4.3 Diferenciação genética / estrutura populacional**

Os valores médios de  $F_{st}$ ,  $F_{is}$  e  $F_{it}$  obtidos através da AMOVA, entre as 4 subpopulações remanescentes da raça equina Nordestina, com base nos 14 marcadores microssatélites, foram de 0,005, 0,012 e 0,017, respectivamente. E, conforme o valor da probabilidade (0,001) encontrado na AMOVA para o parâmetro de  $F_{st}$  (0,005) pode-se aceitar a hipótese nula ( $H_0$  = não existe diferenças entre as subpopulações). Ainda pela AMOVA, a estimativa de  $\Phi_{pt}$  correspondeu a 0,010 ( $P=0,001$ ), significando que somente 1% da variação genética foi devido a variância existente entre as 4 subpopulações e 99% da variação genética foi explicada por diferenças existentes dentro das subpopulações (Figura 4). O valor médio do Coeficiente de Diferenciação Gênica ( $G_{st}$ ) foi de 0,009 para as 4 subpopulações remanescentes da raça equina Nordestina avaliadas nesta pesquisa.

Com base nos valores estimados dos parâmetros  $F_{st}$  (0,5%),  $\Phi_{pt}$  (1%) e  $G_{st}$  (0,9%) não se verificou evidências significativas de diferenciação genética entre as 4 subpopulações remanescentes da raça equina Nordestina, indicando que as 4 subpopulações formam o mesmo conjunto de genes. Giacomoni, Fernández-Stolz e Freitas (2008) analisaram 3 subpopulações da raça equina Pantaneiro (Ipiranga, Nova esperança e Promissão) e encontraram  $F_{st}$  médio de 0,030, e Cothran et al. (2011), estudando 3 subpopulações da raça equina Crioulo Venezuelano (Apure, Aragua e Mérida), estimaram  $F_{st}$  médio de 0,022. Em ambos os trabalhos, os autores declararam que encontraram baixa diferenciação genética. Em outras palavras, não verificaram evidências de diferenciação genética entre as subpopulações de cavalos da mesma raça que eram de diferentes locais.

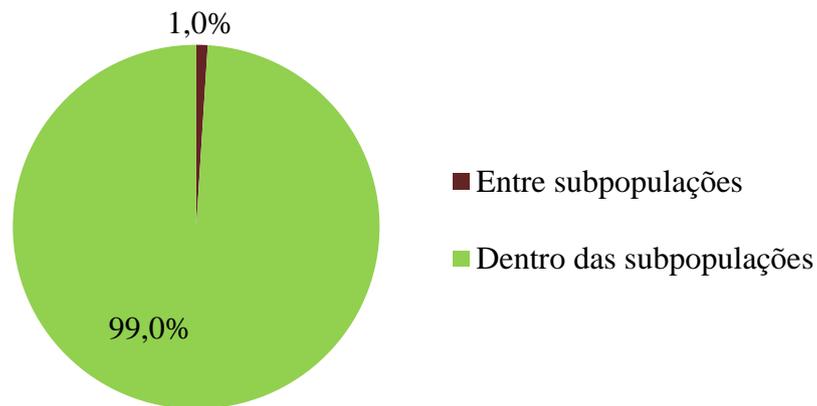


Figura 4. Porcentagem da variância molecular com base nos valores da Estatística- $\Phi$ , obtidos pela AMOVA, entre as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina

A comparação par a par entre os valores estimados de  $F_{st}$ , através da AMOVA, para as 4 subpopulações avaliadas e o *outgroup* formado pela raça Árabe, estão presentes na Tabela 7. A análise par a par possibilita uma análise comparativa pontual entre duas subpopulações, permitindo avaliar o coeficiente de diferenciação genética entre elas, ou seja, quanto em percentual a variação total é comum entre elas. O maior valor de  $F_{st}$  foi encontrado entre as subpopulações AGRE-PE e NCEN-PI, seguido por SERT-PE e NCEN-PI. Apesar do valor obtido de  $F_{st}$  entre AGRE-PE e JUAZ-BA ter sido igual ao obtido entre SERT-PE e NCEN-PI ( $F_{st} = 0,006$ ), o valor da probabilidade obtido com as 999 permutações foi superior ao  $F_{st}$ , o que não se verificou entre SERT-PE e NCEN-PI, conforme valores da Tabela 7.

Tabela 7. Matriz dos valores de  $F_{st}$  comparados par a par entre as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina. Os valores de  $F_{st}$  se encontram abaixo da diagonal principal e os valores de probabilidades baseados em 999 permutações são mostrados acima da diagonal principal

	<b>AGRE-PE</b>	<b>JUAZ-BA</b>	<b>NCEN-PI</b>	<b>SERT-PE</b>	<b>ARAB</b>
<b>AGRE-PE</b>	-	0,008	0,001	0,035	0,001
<b>JUAZ-BA</b>	0,006	-	0,025	0,006	0,001
<b>NCEN-PI</b>	0,008	0,004	-	0,001	0,001
<b>SERT-PE</b>	0,002	0,004	0,006	-	0,001
<b>ARAB</b>	0,069	0,070	0,072	0,068	-

As subpopulações de AGRE-PE e SERT-PE apresentaram o menor valor estimado de  $F_{st}$ , ou seja, elas são geneticamente próximas com uma variação entre elas de 0,2%. Isso era

de se esperar, uma vez que são subpopulações geograficamente próximas. O mesmo raciocínio para as subpopulações AGRE-PE e NCEN-PI, na qual foram geneticamente mais distantes, onde a variação atribuída entre elas foi de 0,8%, o que é justificado pela maior distância geográfica entre as subpopulações, promovendo menor fluxo gênico entre elas. AGRE-PE e NCEN-PI tiveram o menor número de migrantes detectados (31 indivíduos), e isso contribuiu para que essas subpopulações tivessem alcançado maior valor de  $F_{st}$  entre todas as comparações par a par.

O número de imigrantes foi de 40 entre AGRE-PE e JUAZ-BA, 43 entre NCEN-PI e SERT-PE, 56 entre JUAZ-BA e SERT-PE, 60 entre JUAZ-BA e NCEN-PI e entre AGRE-PE e SERT-PE foi de 110. O número de migrantes entre ARAB e para cada subpopulação avaliada foi de 3 indivíduos. Conforme Hartl e Clark (2010), a migração é o processo no qual ocorre o movimento de organismos, de seus gametas, entre as subpopulações, logo, a migração resulta em fluxo gênico entre as subpopulações. E, segundo Hedrick (2005) e Allendorf e Luikart (2006), o fluxo gênico indica movimento entre grupos que resulta em troca de genes e quando essa troca é elevada tende a causar o efeito de homogeneização entre as subpopulações, o que reduz a diferença genética entre elas. Frankham, Ballou e Briscoe (2008) relataram que migrações e intercruzamentos de uma subpopulação com outra reduz a diferenciação genética entre elas. Sendo assim, os valores de migrantes relativamente elevados entre as 4 subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina avaliadas, podem ter sido a causa de baixos valores de  $F_{st}$  e consequente ausência de diferenciação genética entre as subpopulações. Mas, vale ressaltar que, a medida de divergência genética ( $F_{st}$ ) é determinada pela variância da frequência alélica entre as subpopulações, logo, é afetada principalmente pelos alelos polimórficos que se encontram em frequências intermediárias (HARTL; CLARK, 2010).

Ao analisar a relação entre as 4 subpopulações de remanescentes simultaneamente e, considerando o universo de todos os 14 *loci* microssatélites utilizados, verificou-se que o valor estimado de  $F_{st}$  foi de 0,005, ou seja, a variação entre as 4 subpopulações remanescentes corresponde a 0,5%.

A baixa divergência genética entre as 4 subpopulações foi corroborada pelo método Bayesiano com a Cadeia de Monte Carlo Markov, feita através do programa STRUCTURE v.2.3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003) e pela distribuição dos indivíduos no gráfico produzido através da Análise de Correspondência Fatorial.



Figura 5. Análise da estrutura das subpopulações de remanescentes da raça equina Nordestina: AGRE-PE, JUAZ-BA, NCEN-PI e SERT-PE e *outgroup* constituído por equinos da raça Árabe para  $K = 2$

Com base nos resultados obtidos do Método da Cadeia de Monte Carlo Markov pela inferência Bayesiana e concatenados pelo método de Evanno et al. (2005) indicaram que o melhor valor de  $k$ , que representa a estimativa do número de grupos genéticos presentes na amostra, seria de 2 (Figura 5). Ou seja, geneticamente as 4 subpopulações de remanescentes do cavalo Nordestino avaliadas nesse trabalho representam um mesmo grupo genético, em que, praticamente, compartilham entre si os mesmos alelos. Verificou-se que os animais determinados nesse trabalho como remanescentes são semelhantes entre si, formando uma única população que foi distinta do *outgroup*. A Tabela 8 representa a proporção de indivíduos alocados em cada grupo para  $k = 2$  que foi obtida pelo programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000; FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003), mais de 90% dos cavalos remanescentes da raça equina Nordestina foram reunidos no mesmo grupo.

Tabela 8. Proporção de indivíduos em cada subpopulação para a formação de 2 grupos ( $K=2$ )

Sp	Grupos estimados (valores em %)		n
	1 (Amarelo)	2 (verde)	
<b>AGRE-PE</b>	93,3	6,7	58
<b>JUAZ-BA</b>	91,8	8,2	61
<b>NCEN-PI</b>	95,9	4,1	89
<b>SERT-PE</b>	95,7	4,3	185
<b>ARAB</b>	3,3	96,7	137

Sp = subpopulação; n = tamanho amostral.

Também, a Análise de Correspondência Fatorial detectou a formação de 2 grupos distintos (Figura 6) no plano tridimensional: um formado por indivíduos pertencentes ao ARAB *outgroup* e outro formado por cavalos remanescentes da raça equina Nordestina. A

inércia total presente entre parênteses em cada eixo no gráfico, representa o quanto da variação total está sendo retida para explicar a distribuição dos indivíduos no gráfico. Os resultados obtidos foram visualizados em plano tridimensional no gráfico de dispersão porque reteve maior variação nos 3 planos, de maneira que melhora a visualização da distribuição de cada indivíduo, possibilitando uma percepção evidente da formação de 2 grupos.

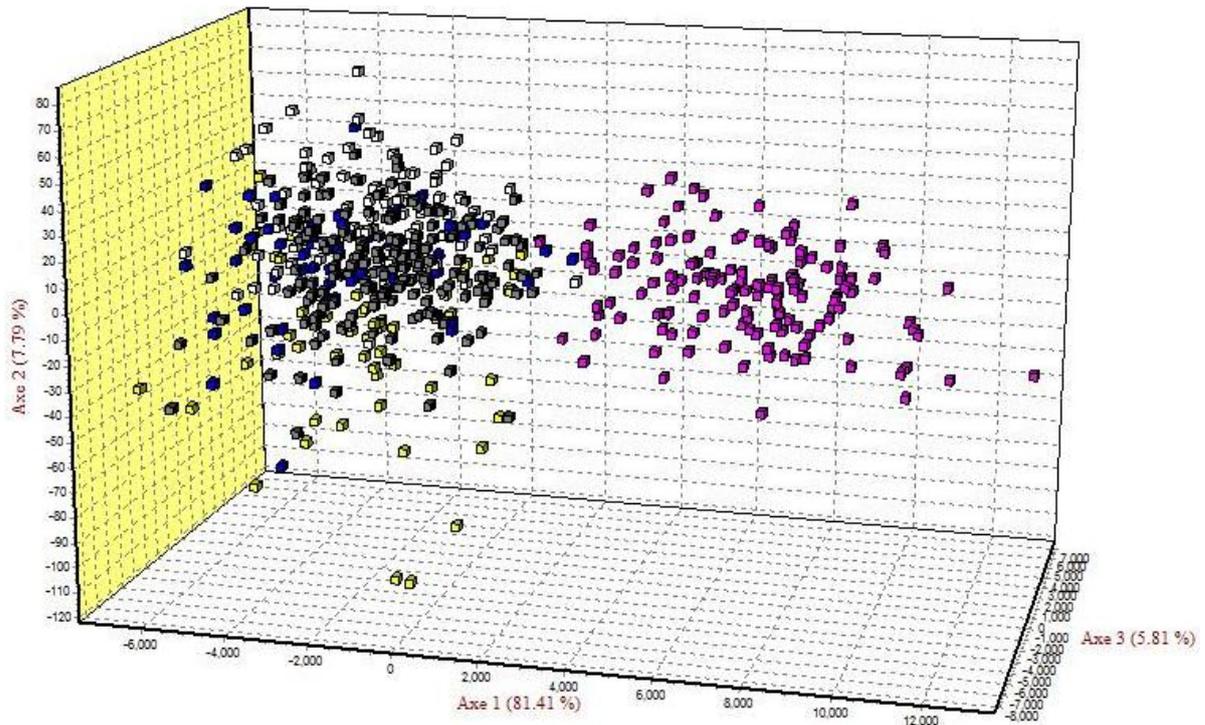


Figura 6. Representação espacial da relação dos indivíduos por subpopulação baseada nos resultados da Análise de Correspondência Fatorial. Indivíduos do *outgroup* ARAB estão representados pela cor rosa, JUAZ-BA pela cor azul, AGRE-PE pela amarela, SERT-PE por cinza e NCEN-PI pela cor branca. O número entre parênteses em cada eixo representa a proporção da inércia total

A história da formação do cavalo Nordestino, do seu início até os últimos anos da ABCCN, justifica grande parte do resultado obtido: formação de único grupo. Costa, Val e Leite (1974) informaram que os estados da Bahia, Ceará, Pernambuco e Piauí detinham os maiores rebanhos do Nordeste e, conjuntamente com os animais do estado do Maranhão, foram utilizados para estabelecer o primeiro padrão do cavalo Nordestino em 1971. Os animais desses estados foram selecionados para integrar os núcleos de seleção e “preservação” do cavalo Nordestino durante os anos de 1936 a 1974. Na realidade, inicialmente desejava-se a conservação da raça e, posteriormente selecionar os melhores

exemplares para reprodução. Brasil (1983) relatou que até 1983 existiam 40, 04 e 01 núcleos de criação do cavalo Nordestino nos estados de Pernambuco, Piauí e Bahia, respectivamente. Mesmo com o fechamento da ABCCN na década de 90 (séc. XX), e posterior inativação dos criatórios oficiais, o cavalo Nordestino continuou a existir, sobrevivendo às condições do Semiárido nordestino e praticamente desprovido de manejo produtivo e reprodutivo efetivamente direcionados pelo homem.

Do período da criação da ABCCN até o período que se tornou inativa, passaram-se 24 anos aproximadamente. Nesse período houve seleção de animais, mesmo no curto espaço de tempo. Com a inativação da ABCCN, muitos animais registrados, frutos da seleção inicial, foram abatidos e outros castrados, restaram-se poucos exemplares registrados e esses se acasalaram com diferentes raças e animais sem padrão racial definitivo. O que se tem atualmente são os animais encontrados em condições de manejo semelhante ao de outrora do período das 1<sup>as</sup> comissões (1936, 1954 e 1971) para conservação do cavalo Nordestino e que, geneticamente, podem apresentar semelhanças com os remanescentes registrados e com os denominados pelos vaqueiros sertanejos de Nordestino pé-duro, também chamado simplesmente de pé-duro.

O cavalo Nordestino, enquanto raça possui uma formação recente, sem tempo hábil para estar bem definida geneticamente, quando comparada com outras raças que possuem tanto associações, como históricos de seleção artificial, mais antigas, como a Árabe e Puro Sangue Inglês, e dentre as nacionais, como o cavalo Crioulo, Campolina, Mangalarga e Mangalarga Marchador.

A formação recente e a pouca seleção artificial explicitadas em tais pontos históricos explicam em parte o porquê dos animais representarem o mesmo grupo genético. Outro aspecto também que elucida isso é o considerável número de animais migrantes entre as subpopulações, o que homogeneizou geneticamente as subpopulações.

Hedrick (2005) relata que se duas ou mais subpopulações são similares é porque provavelmente elas tenham se separado recentemente, e/ou ocorre migração entre elas, ou elas são populações grandes com pouca deriva genética ou ainda a pressão de seleção é semelhante entre elas. Todavia, quando subpopulações foram separadas há muito tempo e não há migração entre elas e/ou o efeito de deriva genética é forte e/ou a pressão de seleção é diferente entre as subpopulações, elas se tornam divergentes. Mais de uma daquelas razões podem atuar simultaneamente, dependendo do cenário em que se encontram os grupos genéticos avaliados.

O elevado compartilhamento de alelos em comum entre as subpopulações também ficou evidenciado nas árvores construídas com dados das distâncias genéticas de Nei, Tajima e Tatenó (1983),  $D_A$  (Figura 7) e Reynolds, Weir e Cockerham (1983),  $D_R$  (Figura 8), os dendogramas obtidos possibilitou a visualização gráfica das distâncias genéticas entre as subpopulações. A formação de 2 grupos, um constituído do outgroup ARAB e outro pelas subpopulações: AGRE-PE, SERT-PE, NCEN-PI e JUAZ-BA. Em outras palavras, as subpopulações remanescentes avaliadas da raça equina Nordestina se agruparam e formaram um grupo distinto do cavalo Árabe utilizado como *outgroup*.

As Figuras 7 e 8 demonstram as relações de topologia entre as subpopulações, nas quais ambos os dendogramas permitiram identificar as subpopulações que se encontram mais próximas, no caso, estando coerentes com a localização geográfica entre as subpopulações.

Os valores de reamostragem (*bootstrap*) permitem obter confiabilidade nas árvores obtidas quanto à formação dos grupos obtidos, revelando a consistência interna dos dados e, quando os valores são menores que 50% da reamostragem utilizada, menor será a confiabilidade dos resultados (RUSSO, MIYAKI, PEREIRA, 2001). Com base nos valores de reamostragem presentes no interior dos dendogramas (Figuras 7 e 8), na localização geográfica das subpopulações e da história recente desses remanescentes da raça equina Nordestina, os dados oriundos da distância genética de Nei, Tajima e Tatenó (1983),  $D_A$ , refletem uma maior confiabilidade no que diz respeito à análise do agrupamento das subpopulações, uma vez que os valores de *bootstrap* obtidos foram maiores que 60% (65,9 e 62,2% - valores transformados em percentuais) e tamanhos mais curtos para a formação dos ramos. Takezaki e Nei (1996, 2008) observaram que  $D_A$  possibilita maior probabilidade de se obter árvores mais corretas e consistentes que as obtidas com distâncias semelhantes a  $D_R$ .

Todavia, ao verificar que 100% da reamostragem enquadró as 4 subpopulações no mesmo grupo, para ambas as distâncias genéticas  $D_A$  e  $D_R$ , o uso dos dados obtidos com essas duas distâncias genéticas para visualização gráfica são satisfatórios, porque foram coerentes aos resultados demonstrados com a Estatística-F ( $F_{st}$ ) e Estatística- $\Phi$  ( $\Phi_{pt}$ ) pela AMOVA, Coeficiente de Diferenciação Gênica ( $G_{st}$ ), Método da Cadeia de Monte Carlo Markov pela inferência Bayesiana e Análise Fatorial de Correspondência (AFC).

Pela técnica de reamostragem, todas as 1000 pseudorréplicas reuniram-se em um mesmo grupo (clado), em ambas distâncias ( $D_A$  e  $D_R$ ). Foi notório que dentro do grupo cavalo Nordesteño, formado pelas 4 subpopulações, AGRE-PE e SERT-PE tendem a ficar próximas, o mesmo para JUAZ-BA e NCEN-PI. Do ponto de vista geográfico, era de se esperar que as subpopulações AGRE-PE e SERT-PE ficassem próximas, pois são subpopulações presentes

no mesmo estado e se encontram em mesorregiões vizinhas. Numa análise mais geral, mesmo as subpopulações remanescentes do cavalo Nordestino geograficamente se encontrarem distantes, elas formaram uma só população.

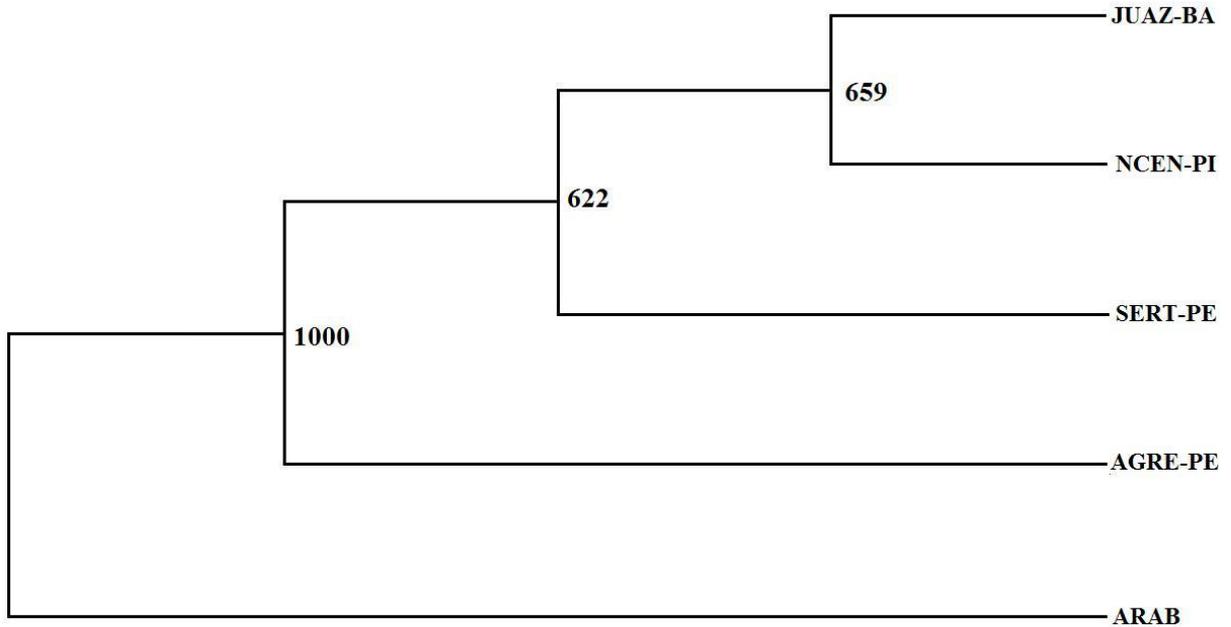


Figura 7. Árvore (dendograma) construída com base na distância genética  $D_A$  (NEI; TAJIMA; TATENO, 1983). Os valores de reamostragem se encontram no interior da árvore

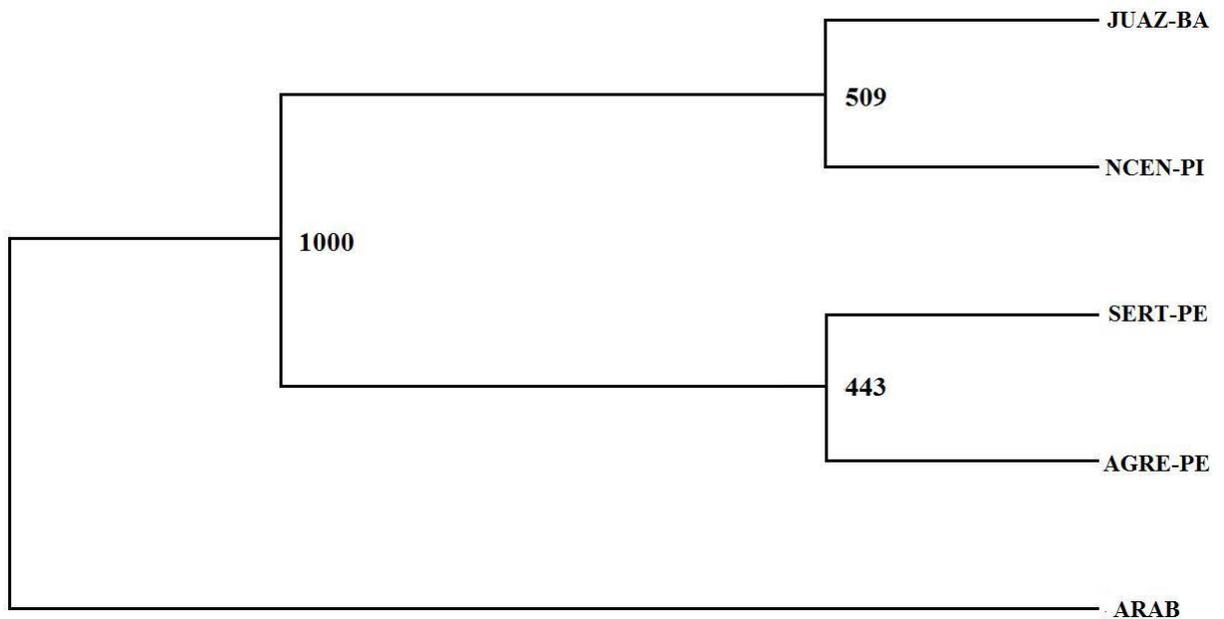


Figura 8. Árvore (dendograma) construída com base na distância genética  $D_R$  (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983). Os valores de reamostragem se encontram no interior da árvore

O número médio de migrantes entre as 4 subpopulações foi de 49 indivíduos, em um universo amostral de 393 cavalos. Isso corresponde a 12,47% da população total é migrante entre as 4 subpopulações, a migração existente entre elas foi uma das prováveis razões que justificaram a formação de uma única população. Animais migrantes levam consigo alelos de sua subpopulação para outra, e esse fluxo pode levar à homogeneidade genética entre elas. Comunicações pessoais realizadas por antigos criadores e vaqueiros relatam que, ainda no final da ABCCN, cavalos da raça Nordestina de outros estados, principalmente do Piauí, Bahia e Ceará foram trazidos para os criatórios de Pernambuco e este estado intercambiava animais para aqueles outros estados. Então, a genética presente nas subpopulações atuais, provavelmente, ainda carrega alelos migrantes responsáveis pelas subpopulações terem sido homogêneas.

#### **4.4 Diversidade genética de remanescentes da raça equina Nordestina**

Após análise das quatro subpopulações de remanescentes do cavalo Nordestino, na qual foi verificado que os animais pertencem ao mesmo grupo genético, pois se aceitou a hipótese nula ( $H_0$  = não existia diferença genética entre as 4 subpopulações), os animais foram avaliados conjuntamente, representando uma só população. As estimativas da variabilidade genética para a população remanescente da raça equina Nordestina avaliada globalmente foram representadas na Tabela 9.

Foi observado que o número total, médio e efetivo de alelos foi 129, 9,214 e 4,759, respectivamente (Tabela 9). O *locus* ASB17 foi o que obteve maior número de diferentes alelos (16) e o *locus* HTG7 o menor (5).

O valor médio de heterozigidade observada foi de 0,755 e médio para heterozigidade esperada não viesada de 0,767. A diversidade alélica variou de 0,589 (HTG7) a 0,862 (HTG10). Comparativamente, a média da diversidade alélica do remanescente do cavalo Nordestino foi similar ao observado em diversas populações de raças equinas domésticas do Brasil e no mundo (IWANCZYK et al., 2006; SERENO et al. 2008; LEROY et al., 2009; LING et al. 2010; CONANT; JURAS; COTHRAN, 2011; COTHRAN et al., 2011; BIGI; PERROTTA, 2012; PRYSTUPA et al., 2012). Salvaguardando que essa comparação foi feita com base em trabalhos que utilizaram, na sua grande maioria, marcadores microssatélites semelhantes ao utilizado na presente pesquisa.

As estimativas da variabilidade genética da população de remanescentes do cavalo Nordestino (Tabela 9) permitiram observar que a população avaliada possui elevada

diversidade genética. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram detectados para os *loci* HMS6 e LEX33, porém, globalmente não foram verificados desvios significativos. Giacomoni, Fernández-Stolz e Freitas (2008) e Sereno et al. (2008) detectaram desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg para o marcador HMS6 em populações de cavalos da raça Pantaneiro. Silva et al. (2012) utilizaram 11 marcadores microssatélites, dos quais 6 foram iguais ao utilizado na presente pesquisa (HMS3, HMS6, HMS7, HTG6, HTG7 e VHL20) e detectaram que as populações das raças Campeira, Lavradeira, Pantaneira, Baixadeiro, Mangalarga Marchador, Árabe e Puro Sangue Inglês, globalmente não se encontravam na condição de Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 9. Composição genética e valores do Conteúdo de Informação Polimórfica de cada *locus* microssatélite para remanescentes da raça equina Nordestina avaliados nesta pesquisa

<i>Locus</i>	<b>n</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>UHe</b>	<b>EHW</b>	<b>Fis</b>	<b>PIC</b>
AHT4	393	9	5,138	0,840	0,806	NS	-0,041 <sup>ns</sup>	0,779
AHT5	393	9	4,596	0,771	0,783	NS	0,016 <sup>ns</sup>	0,749
ASB17	393	16	5,528	0,822	0,820	NS	-0,002 <sup>ns</sup>	0,801
ASB2	393	12	5,719	0,807	0,826	NS	0,024 <sup>ns</sup>	0,803
ASB23	393	11	5,813	0,830	0,829	NS	-0,001 <sup>ns</sup>	0,806
HMS3	393	7	5,215	0,751	0,809	NS	0,073 <sup>ns</sup>	0,783
HMS6	393	7	3,064	0,695	0,675	*	-0,030 <sup>ns</sup>	0,646
HMS7	393	8	3,733	0,697	0,733	NS	0,049 <sup>ns</sup>	0,689
HTG10	393	10	7,191	0,830	0,862	NS	0,038 <sup>ns</sup>	0,845
HTG4	393	7	3,659	0,743	0,728	NS	-0,021 <sup>ns</sup>	0,685
HTG6	393	7	2,639	0,573	0,622	NS	0,080 <sup>ns</sup>	0,573
HTG7	393	5	2,431	0,590	0,589	NS	-0,002 <sup>ns</sup>	0,546
LEX33	393	10	4,967	0,791	0,800	**	0,010 <sup>ns</sup>	0,771
VHL20	393	11	6,930	0,832	0,857	NS	0,029 <sup>ns</sup>	0,839
<b>Total</b>	393	129	-	-	-	-	-	-
<b>Média</b>	-	9,214	4,759	0,755	0,767	NS	0,016 <sup>ns</sup>	-
<b>EP</b>	-	0,743	0,397	0,023	0,023	-	0,010	-

n = tamanho da amostra; Na = número de diferentes alelos; Ne = número efetivo de alelos; Ho = heterozigosidade observada; UHe = heterozigosidade esperada não viesada; EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; Fis = coeficiente de consanguinidade; PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica; NS = Não Significativo; \*\* P<0,01; \* P<0,05.

O comportamento do parâmetro Fis para cada marcador microssatélite seguiu ao observado, quando as subpopulações foram avaliadas separadamente. Portanto, não foram significativos, ou seja, os valores observados indicam a predominância de acasalamentos ao acaso. Porém, foi detectado déficit global de heterozigoto (P=0,0092), onde os marcadores

HMS3 ( $P=0,0001$ ), ASB2 ( $P=0,0256$ ) e HTG6 ( $P=0,0206$ ) foram os que manifestaram déficit significativo de heterozigoto. Sabe-se que o número de heterozigotos presentes numa população influencia no nível de consanguinidade, todavia, os valores de  $F_{is}$  não foram significativos.

Todavia, o teste global para déficit de heterozigoto foi significativo, o que pode estar refletindo falhas no manejo reprodutivo adotado atualmente nos remanescentes do cavalo Nordestino. Falhas essas que podem ser explicadas pelo uso de poucos e repetidos reprodutores e matrizes, acarretando em acasalamentos entre indivíduos mais aparentados. Isso poderá ser devido ao grande número de machos castrados, como observado em Melo, Ribeiro e Travassos (2006), o que concorre no uso de mesmos garanhões com maior frequência. E, que se persistir, poderá levar o cavalo Nordestino a sofrer declínio considerável em sua diversidade genética, podendo enquadrá-la em iminente ameaça biológica. No cenário socioeconômico e político o cavalo Nordestino, enquanto grupo genético moldado pelas condições semiáridas do Nordeste brasileiro, já se encontra sob forte ameaça de exaurir esse patrimônio animal.

Com exceção do *locus* HTG7, enquadrado como razoavelmente informativo, todos os demais foram classificados como altamente informativos, segundo classificação de Botstein et al. (1980). O que confere confiabilidade nas informações extraídas dos marcadores microssatélites, para avaliação das estimativas de variabilidade genética da população de remanescentes da raça equina Nordestina.

#### **4.5 Avaliação dos efeitos de gargalo de garrafa em remanescentes da raça equina Nordestina**

Pela Figura 9, obtida com dados do método Gráfico, observou-se que a população remanescente da raça equina Nordestina, como um todo, se encontrava em equilíbrio de mutação e deriva genética, porque a curva demonstrou comportamento normal, apresentando o formato de “L”. Ou seja, a população de remanescente avaliada da raça equina Nordestina não passou por gargalo genético recente.

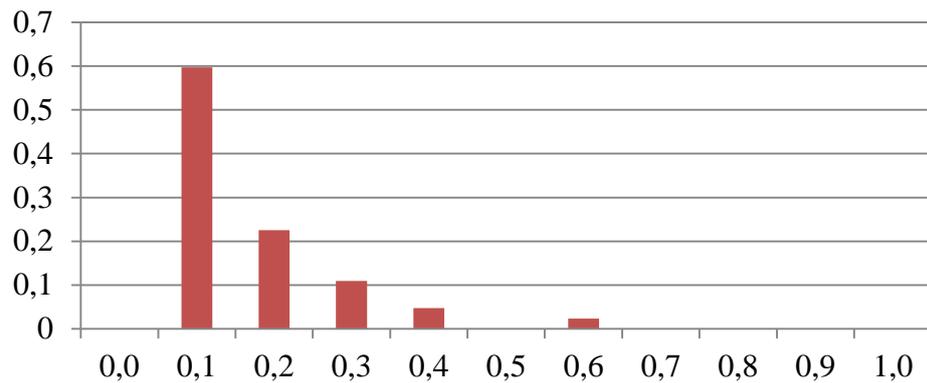


Figura 9. Distribuição das frequências dos alelos na população avaliada de remanescentes da raça equina Nordestina. O eixo horizontal representa as classes de frequência de alelos e as barras correspondem à proporção de todos os alelos detectados em cada classe

Somente o resultado obtido com o Teste de Wilcoxon (WRT) para o Modelo de Mutação Gradual (Tabela 10) confirmou o que foi observado pelo método Gráfico, o mesmo verificado quando a população de remanescentes foi separada em 4 subpopulações. Todavia, o Modelo de Mutação Gradual para o Teste estatístico do Sinal (ST) o resultado foi contrário ao verificado quando a avaliação foi realizada pelas 4 subpopulações.

Os demais modelos IAM e TPM, submetidos aos dois testes estatísticos (ST e WRT) apresentaram comportamento (Tabela 10) idêntico ao verificado no estudo com as subpopulações separadas, ou seja, identificaram valores significativos para a ocorrência de que a população remanescente avaliada tenha sofrido efeito de gargalo genético.

Os diferentes resultados obtidos entre não ter sofrido efeito de gargalo genético (Método Gráfico e Modelo de Mutação Gradual para o Teste do Sinal) e ter sofrido (IAM e TPM para o Teste do Sinal e Wilcoxon) podem ter como explicação o que Bömcke, Gengler e Cothran (2011) relataram para raça de pônei Skyros da Grécia, de que as subpopulações não se encontravam completamente isoladas e apresentaram fluxo gênico, onde genes obtidos de imigrantes (como alelos raros) podem mascarar subsequentes efeitos genéticos.

Bem como, os elucidados para análise das 4 subpopulações avaliadas de remanescentes da raça equina Nordestina, anteriormente. Em linhas gerais, o efeito de gargalo genético pode não ter sido recente e, pode ter acontecido gargalo demográfico e não genético suficientemente forte. De todo modo, considerou-se, com base nos dados da Tabela 10, que a população apresentou excesso de heterozigosidade e com significativos indícios de que tenha sofrido efeito de gargalo genético.

Tabela 10. Resumo do teste para efeito de gargalo de garrafa na população avaliada de remanescentes da raça equina Nordestina

Sp	SM	IAM	TPM	SMM
Nordestino	ST	Esp.=8,28 (P=0,0006*)	Esp.=8,30 (P=0,0355*)	Esp.=8,24 (P=0,0217*)
	WRT	0,00003*	0,00015*	0,93237 <sup>ns</sup>

Sp = subpopulação; SM = método estatístico; ST = Teste do Sinal; WRT = Teste de Wilcoxon; IAM = Modelo de Alelos Infinitos; TPM = Modelo de Mutação em Duas Fases; SMM = Modelo de Mutação Gradual; \* Rejeição da hipótese nula ( $H_0$  = em equilíbrio de mutação e deriva genética, ou seja,  $H_0$  = sem efeitos de gargalo genético); NS = não significativo; P = probabilidade; Esp. = número esperado de *loci* com excesso de heteroziguidade.

Amirinia et al. (2007) observaram que equinos da raça Caspian do Irã apresentaram valores significativos no Teste de Wilcoxon para os modelos IAM, TPM e SMM, e no Teste do Sinal para os modelos IAM e TPM, somente SMM foi não significativo. Bem como, o Método gráfico foi capaz de detectar recente efeito de gargalo de garrafa. Os autores consideraram que a raça havia sofrido recente efeito de gargalo genético.

Koringa et al. (2008) encontraram resultados semelhantes à presente pesquisa, não verificaram fenômeno de gargalo genético para o Método Gráfico e o Modelo de Mutação Gradual nos Testes do Sinal e Wilcoxon para raça equina indiana Kathiawari. Mas, no Modelo de Alelos Infinitos (IAM) e de Mutação em Duas Fases (TPM) encontraram efeitos significativos pelo Teste de Wilcoxon em ambos, e somente no IAM para o Teste do Sinal. Mediante esses resultados e associados a outros testes, os mesmos autores consideraram que a raça não havia sofrido recente efeito de gargalo genético.

Giacomoni, Fernández-Stolz e Freitas (2008) verificaram que efeitos significativos sobre o Modelo de Alelos Infinitos, nos 12 marcadores microssatélites, indicaram efeito de gargalo genético, mas consideraram como não sendo recente, com base nos resultados obtidos com o Modelo de Mutação Gradual, no qual somente um *locus* obteve probabilidade significativa ( $P = 0,03$ ).

Bömcke, Gengler e Cothran (2011) utilizaram do Modelo de Mutação em Duas Fases para estudar a raça de pônei Skyros da Grécia como um todo e não detectaram efeitos de gargalo genético pelo Teste do Sinal, mas, ao se estudar por localidade, verificaram que 2 das 3 subpopulações (Thessaloniki e Corfu) possivelmente sofreram efeitos de gargalo genético com excesso de heteroziguidade, pois manifestaram significativos valores para o Teste do Sinal. Segundo os mesmos autores, apesar da população como um todo não ter manifestado efeito de gargalo genético, a redução demográfica aumenta consideravelmente as chances de que pôneis da raça Skyros tenham sofrido efeito de gargalo genético.

Chauhan, Gupta e Dhillon (2011) não detectaram efeitos de gargalo genético na raça Marwari pelo Método Gráfico, porém com os modelos IAM, TPM e SMM para o Teste do Sinal e Wilcoxon, evidenciaram efeitos significativos de gargalo genético nas raças equinas Kathiawari, Spiti e Marwari. Os mesmos autores, com base nesses resultados e no Teste estatístico da diferença padrão, consideraram que somente Kathiawari e Spiti podem ter evidenciado efeito recente do fenômeno de gargalo genético.

O cenário atual em que vivem os remanescentes da raça equina Nordestina avaliados nesta pesquisa: sofreram redução populacional com o fechamento da ABCCN, considerável número de machos se encontram castrados e mudanças no estilo de vida das comunidades em muitas cidades do Semiárido nordestino (aquisição de motocicletas, principalmente) fornecem fortes indícios que levam a acreditar que o cavalo Nordeste tenha experimentado estrangulamento genético, mesmo que o gargalo genético não tenha sido recente, como configurado pelo Método Gráfico.

#### **4.6 Relação genética de remanescentes da raça equina Nordestina com outras raças**

Os resultados obtidos através da AMOVA, utilizando-se 15 raças (Brasileiras: Nordeste, Mangalarga, Mangalarga Marchador, Campolina, Pantaneiro e Crioulo brasileiro; Ibéricas: Andaluz, Lusitano, Garrano e Sorraia; Sul-americanas: Passo Peruano, Passo Fino de Porto Rico e da Colômbia, Crioulo Chileno e Venezuelano) demonstraram que 15,8% da variação total é explicada pelas diferenças entre as raças, e 84,2% é oriunda das diferenças existentes dentro de cada população. Valores foram semelhantes ao observado por Cothran et al. (2011) que avaliaram, através de 15 marcadores microssatélites, 13 raças equinas, sendo 12 delas originárias da América Latina.

O valor médio de  $F_{st}$  para essas 15 raças foi de 0,088; indicando que 8,8% da variabilidade genética total pode ser atribuída às diferenças existentes entre as raças brasileiras, sul-americanas e ibéricas. Sabe-se que as raças equinas brasileiras têm como principais raças formadoras: as ibéricas, destacando-se Garrano, Sorraia, Andaluz e alguns animais Lusitano, e também animais da raça Bérbere que foram trazidos pelos colonizadores da península Ibérica (BECK, 1985). Monteiro (1986) relatou que cavalos da península Ibérica entraram em território brasileiro durante o período colonial, através de importações diretas de equinos da raça Árabe, Andaluz e Bérbere, outros equinos eram trazidos da Argentina e Paraguai com os Jesuítas que transitavam pelo Brasil, e outros cavalos que vinham da

América central, passando por países da América do Sul e, quando alcançavam o norte da Argentina, chegavam facilmente em solo brasileiro.

Foi construída uma árvore filogenética (Figura 10) com base na distância genética de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967), com 1000 pseudorréplicas. Quanto aos valores de reamostragem presentes na Figura 10, Cothran e Luis (2005) observaram que é comum árvores de raças equinas apresentarem certos valores baixos, mas a formação dos grupos é consistente. Esses valores correspondem ao número de vezes que aquele determinado grupo se formou no universo de 1000 pseudorréplicas, de modo que se estabelecesse o arranjo mais adequado.

Os dados pertencentes à grande parte das raças utilizadas na construção da árvore, representada na Figura 10, se encontram em Conant, Juras e Cothran (2011). Esses mesmos autores verificaram, em sua pesquisa, que existia claramente a formação de 3 principais grupos: os dos pôneis e cavalos de tração pesada, os das raças Sul-americanas de origem Ibérica e os de raças do Velho Mundo e Norte-americanas. Todavia, em Conant, Juras e Cothran (2011) a árvore possuía 40 raças equinas, e a apresentada nesta pesquisa detém 67 raças domésticas de equinos, onde se percebe, que o grupo composto pelas raças do Velho Mundo e Norte-americanas manifesta diferenciação interna entre cavalos predominantemente Asiáticos, que ainda tem contido no seu clado cavalos europeus: Lusitano, Andaluz e Lipizzaner, e o outro grupo, com raças Norte-americanas e do continente Europeu. Essa diferenciação interna do grupo, formado pelas raças equinas do Velho Mundo e Norte-americana pode ter sido por causa da introdução de mais 4 raças asiáticas (Árabe Persa, Árabe Sírio, Shagya Árabe e Kurd) e do Lipizzaner que se agruparam, fazendo com que o grupo se tornasse mais definido.

Os dados oriundos de marcadores microssatélites permitem realizar inferências quanto às prováveis raças que contribuíram na formação daquela raça, alvo do estudo, bem como mostrar, auxiliado por outros programas que realizam alocação de indivíduos, introgressões recentes.

Ademais, a comparação da estrutura genética de diferentes raças revela a distância genética entre elas, fundamental para compreender o desenvolvimento das raças equinas atuais. Pois, sabe-se que muitas das raças atuais foram constituídas de diferentes cruzamentos, onde se utilizou diferentes raças do mundo inteiro (ABERLE; DISTL, 2004).

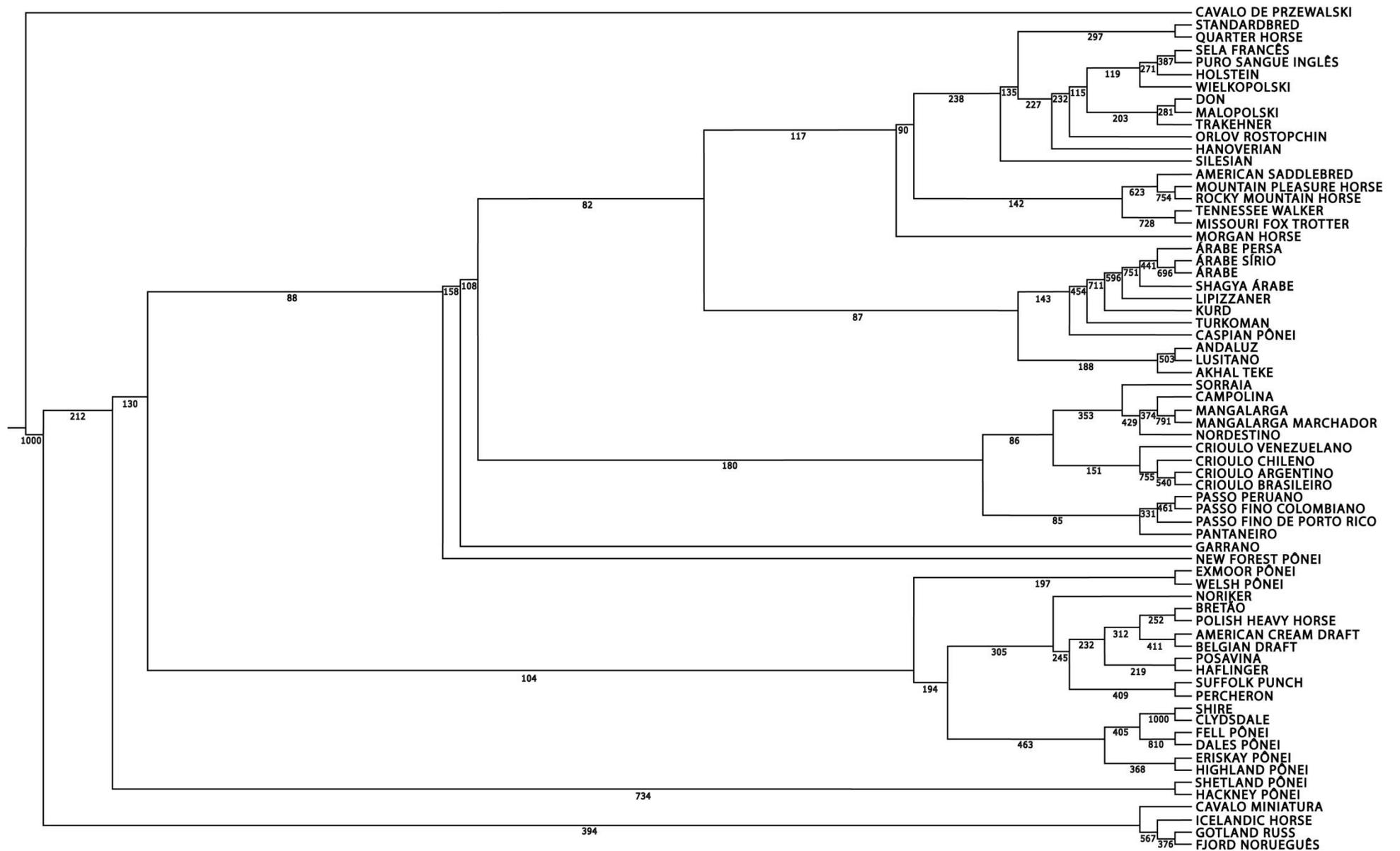


Figura 10. Árvore originada do consenso de 1000 pseudorréplicas, construída com base na distância genética de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967) pelo método da REML (Máxima Verossimilhança Restrita) com a raça equina Nordestina, 66 raças equinas e dados do cavalo selvagem de Przewalski como *outgroup*. Os valores de reamostragem se encontram na árvore

O cavalo Nordestino se encontra no grupo das raças Sul-americanas, próximo do Campolina, seguido do Mangalarga Marchador e Mangalarga. Tal aproximação revelou que ocorreram introgressão de outras raças nacionais durante a formação do cavalo Nordestino. A aproximação de criatórios dessas raças, associado à necessidade crescente que muito criadores sentiam em querer melhorar o fenótipo do cavalo Nordestino quanto à garupa, considerada muito derreada, e à altura, considerado animal pequeno, alvo de muitas críticas e controvérsia entre antigos criadores (COMUNICAÇÃO PESSOAL, Julho 2009 - Outubro 2011). E, conforme Comunicação Pessoal (Outubro de 2011), até os dias atuais, existe um desejo em querer elevar a estatura do cavalo Nordestino em alguns centímetros, pois muitos dos antigos criadores e vaqueiros *alegavam que talvez se tivessem “melhorado” a estatura do cavalo Nordestino ele pudesse “competir” comercialmente com outras raças nacionais*. E isso é comprovado pelas modificações que AEPCN fez no padrão, na tentativa de elevar a estatura da raça.

Dentre as raças nacionais, muitos dos vaqueiros que acompanharam a trajetória da raça equina Nordestina, durante o funcionamento da antiga ABCCN, e que trabalhavam em núcleos de criação da raça relatam que, no final dos anos 80 e começo dos anos 90, do século XX, alguns criadores estavam cruzando o Nordestino com a raça Campolina, no intuito de elevar a estatura da raça, sem que a ABCCN tivesse conhecimento (COMUNICAÇÃO PESSOAL, Outubro de 2011). Talvez seja esse o motivo pelo qual o Campolina se mostrou tão próximo ao Nordestino, por causa da introgressão recente.

Sabe-se, também, por intermédio de criadores e vaqueiros que trabalhavam com a raça equina Nordestina no período em que a ABCCN ainda funcionava, que existia o desejo de melhorar o andamento do animal (COMUNICAÇÃO PESSOAL, Julho 2009 - Outubro 2011), que, de acordo com a ABCCN (1987), permitia o trote em todas as suas modalidades. Logo, com base em relatos pessoais de vaqueiros e antigos criadores do cavalo Nordestino, alguns criadores cruzaram exemplares da raça equina Nordestina com Mangalarga Marchador, no intuito de introduzir marcha no cavalo Nordestino (COMUNICAÇÃO PESSOAL, Julho 2009 - Outubro 2011).

Independentemente dos motivos que levaram, outrora, alguns criadores a cruzarem exemplares da raça equina Nordestina é comprovadamente, pelos dados obtidos com os marcadores microssatélites, que as raças equinas Campolina e Mangalarga Marchador participaram mais intimamente da formação do cavalo Nordestino.

As raças equinas do Brasil são raças que têm, em sua grande maioria, ancestrais de cavalos de raças Ibéricas, como relatado por diversos autores: Chieffi (1950), Goulart (1964),

Costa, Val e Leite (1974), Monteiro (1986), Beck (1985; 1992), Lima, Shirota e Barros (2006), Hendricks (2007) e outros. Das raças Ibéricas utilizadas nessa pesquisa, a Sorraia foi a que se aproximou mais da raça equina Nordestina (Figura 10). Contudo, inferências devem ser feitas com cautela, devido a raça Sorraia apresentar baixo nível de diversidade alélica e considerável consanguinidade, como verificado por Luís, Cothran e Oom (2007) e Luís et al. (2007).

A raça Sorraia, com origem na Espanha e Portugal, apresenta como principais características fenotípicas: perfil de cabeça subconvexilíneo, são animais de estatura pequena, onde as fêmeas adultas medem em média 1,44 m e os machos adultos 1,48 m de altura na cernelha, pescoço de cervo a piramidal, garupa caída com baixa inserção de cauda, são classificados como mediolíneo, aptidão para sela e trabalhos leves no campo (AICS, 2006). Hendricks (2007) declarou que cavalos da raça Sorraia possuem notável habilidade para suportar condições extremas do clima e sobreviver à baixa disponibilidade de alimentos, e mesmo assim, conseguem manter seu estado de saúde, são rústicos e resistentes. Com base nessas declarações, e nas características fenotípicas da raça equina Nordestina, descritas em Beck (1985), ABCCN (1987), Travassos (2004) e Melo (2011), e que chegam a ser bem semelhantes à descrição para a raça Sorraia, não restam dúvidas que dentre as raças Ibéricas avaliadas, a Sorraia exerceu influência mais significativa na formação do cavalo Nordestino. Sendo confirmada pela aproximação genética, obtida com dados dos marcadores microssatélites, através da árvore construída com base na distância genética de corda de Cavalli-Sforza (CAVALLI-SFORZA; EDWARDS, 1967).

A raça Garrano ou também conhecida como Minho, de origem Portuguesa, notadamente exerceu influência no passado em todas as raças Sul-americanas, utilizadas nessa pesquisa, conforme verificado na Figura 10, pela sua distância com as atuais raças Sul-americanas.

O banco de dados utilizado não possuía dados de genotipagem de cavalos da raça Bérbere e não existiam recursos financeiros para se obter amostras dessa raça, que fossem originalmente da região do Norte da África, onde se tem cavalos mais semelhantes ao antigo Bérbere, uma vez que os exemplares das associações de criadores do cavalo Bérbere da Espanha e França são animais melhorados e que apresentam fenótipo bem distinto daquele de outrora, e que ainda é possível de ser encontrado, sendo criado por tribos Berberes no norte da África. Portanto, continuará sendo suposições, alicerçadas na morfologia, funcionalidade, desempenho e aspectos históricos, que o cavalo Bérbere teria participação no tronco genético do cavalo Nordestino.

## 5.0 CONCLUSÃO

Os *loci* microssatélites utilizados nesse trabalho se mostraram com elevado polimorfismo e altamente informativos. Portanto, foram adequados na caracterização genética de remanescente da raça equina Nordestina nas mesorregiões estudadas.

As subpopulações avaliadas de remanescente da raça equina Nordestina apresentaram elevada diversidade genética e, estruturalmente, representam uma mesma população. Essa homogeneidade se deve principalmente aos efeitos de migração e de sua recente história de formação enquanto raça. Logo, as 4 subpopulações constituem reservatório genético uma das outras, sendo importante para a seleção de exemplares na retomada da raça para reabertura das atividades da associação.

A diversidade genética da população estudada de remanescentes da raça equina Nordestina, apesar de ser elevada, encontra-se sob ameaça de sofrer declínio genético e populacional gradativo, em virtude do cenário social, econômico e político em que se encontra a população, e também pela ação dos cruzamentos indiscriminados, o que poderá levar à descaracterização da raça e perdas de genes importantes.

A tendência de redução populacional, que leva à diminuição do tamanho efetivo, e consequentes efeitos de gargalos genéticos são elementos que resultam em sérias ameaças de sobrevivência da raça a médio e longo prazo.

A elevada diversidade genética, mesmo mediante tantas ameaças e sua recente história de formação, e em virtude das alterações climáticas vivenciadas atualmente pelo planeta, ratificam a necessidade iminente de se conservar o cavalo Nordestino como reservatório genético, que provavelmente, estará mais adaptado às mudanças bruscas de temperatura e a sobreviver à escassez na disponibilidade de alimentos, cada vez mais crescentes.

Pela filogenia obtida com dados de remanescentes da raça equina Nordestina, pode-se inferir que as raças equinas nacionais Campolina, Mangalarga Marchador e Mangalarga exerceram influência considerável na sua formação, com destaque para as duas primeiras. E, dentre as raças Ibéricas utilizadas nesse estudo, os equinos da raça Sorraia e seus descendentes, que possivelmente chegaram ao Nordeste brasileiro, devem ter participado, de maneira relevante, na história de formação do cavalo Nordestino.

As informações de estrutura de população e de filogenia são importantes ferramentas que podem ser úteis em futuros programas de conservação e melhoramento genético da raça equina Nordestina.

## REFERÊNCIAS

- ABERLE, K.S. et al. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. **Animal Genetics**, v.35, p.270–277, 2004.
- ABERLE, K.S.; DISTL, O. Domestication of the horse: results based on microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Archivos Tierz., Dummerstorf**, v.47, p.517-535, 2004.
- ABREU, U.G.P.; MARIANTE, A.S.; SANTOS, S.A. Conservação Genética de raças naturalizadas do Pantanal. A raça Pantaneira e sua variabilidade genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.5, p.18-21, 1998.
- ACHMANN, R. et al. Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse. **Animal Genetics**, v.32, p.52, 2001.
- ACHMANN, R. et al. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. **Animal Genetics**, v.35, p.285–292, 2004.
- ALLENDORF, F.W. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. **Zoo Biology**, v.5, p.181-190, 1986.
- ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Singapore: Blackwell Publishing, 2006. 642p.
- AMIRINIA, C. et al. Bottleneck study and genetic structure of Iranian Caspian horse population using microsatellites. **Pakistan Journal of Biological Science**, v.9, p.1540-1543, 2007.
- APPLIED BIOSYSTEMS™. **GeneMapper® Software**. California: Applied Biosystems. v. 4.0, 2005.

ASSIS, J.B. et al. Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses. **Genetics and Molecular Research**, v.8, p.1519-1524, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO NORDESTINO - ABCCN. **Regulamento do registro genealógico do cavalo Nordestino**. Recife, 1987. 33p.

ASSOCIAÇÃO INTERNACIONAL DE CRIADORES DO CAVALO DO SORRAIA. AICS. **Padrão**. Elvas - Portugal, 2006. Disponível em: < [http://www.aicsorraia.fc.ul.pt/Padr%E3o\\_modelo2.htm](http://www.aicsorraia.fc.ul.pt/Padr%E3o_modelo2.htm)> Acesso em: 10 jan. 2012.

AZOR, P.J. et al. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.1-6, 2007.

BANDEIRA, L.A.M. **O feudo: a Casa da Torre de Garcia d'Ávila: da conquista dos sertões à independência do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 2000. 601p.

BARKER, J.S.F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5, 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph: International Committee for World Congresses on Genetics Applied to Livestock Production, 1994. p.501-508.

BASE DE DADOS DO ESTADO – BDE / Pernambuco. **Território – Meio ambiente. Seções recursos Naturais – Cobertura vegetal e tipologia climática do município de Agrestina**. Disponível em: <<http://www.bde.pe.gov.br/site/ConteudoRestrito2.aspx?codGrupoMenu=478 &codPermissao=5>>. Acesso em: 01 set. 2011.

BECK, S.L. **O legado Ibérico**. Revista Globo Rural. Rio de Janeiro: Globo, v.8, n.84, out. 1992.

BECK, S.L. Pantaneiro, Nordestino e Marajoara, raças brasileiras pouco conhecidas. In: **Equinos: Raças, manejo e equitação**. São Paulo: Criadores, 1985. 179-190p.

BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Ribeirão Preto: SBG, 2008, 239p.

BEHL, R. et al. Genetic relationships of five Indian horse breeds using Microsatellite markers. **Animal**, v.1, p.483-488, 2007.

BELKHIR, K. et al. **GENETIX version 4.04, logiciel sous Windows™ pour la genétique des populations**. Laboratoire Genome, Populations, Interactions: CNRS UMR. 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. 2003.

BERTORELLE, G. **Population differentiation: Measure of**. In: Encyclopedia of the human genome. Macmillan Publishers, 2003. 2p.

BIERMAN, A. **Refinement and validation of a microsatellite based identification and parentage testing panel in horses**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Estudos de Produção Animal) – University of Petroria. Faculty of Veterinary Science, Onderstepoort.

BIGI, D.; PERROTTA, G. Genetic Structure and Differentiation of the Italian Catria Horse. **Journal of Heredity**, v.103, p.134–139, 2012.

BINNS, M.M. et al. The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. **British Veterinary Journal**, v.151, p.9-15, 1995.

BJØRNSTAD, G.; GUNBY, E.; RØED, K.H. Genetic structure of Norwegian horse breeds. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.117, p.307–317, 2000.

BJØRNSTAD, G.; NILSEN, N.Ø.; RØED, K.H. Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses? Short Communication. **Animal Genetics**, v.34, p.55–58, 2003.

BÖMCKE, E.; GENGLER, N.; COTHRAN, E.G. Genetic variability in the Skyros pony and its relationship with other Greek and foreign horse breeds. **Genetics and Molecular Biology**, v.34, p.68-76, 2011.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314–331, 1980.

BRAGA, R.M. Os cavalos trazidos para o Brasil. In: **Cavalo Lavradeiro em Roraima: Aspectos históricos, ecologia e de Conservação**. Brasília: EMBRAPA, 2000. p.26-32.

BRASIL. Portaria nº1 de 10 de fevereiro de 1975. In: **Diário Oficial**, Seção I – Parte I, 4 de março de 1975, p: 2662. Divisão para animais de grande porte. Aprovação do regulamento da Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Nordestino para manutenção do registro genealógicos de cavalos da raça Nordestina. Brasília. 1975.

BRASIL. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea – Pernambuco: Diagnóstico do Município de Agrestina**. p.20. Ministério de Minas e Energia, Brasil. 2005a.

BRASIL. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea – Piauí: Diagnóstico do Município de Batalha**. p.24. Ministério de Minas e Energia, Brasil. 2005b.

BRASIL. **Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea – Bahia: Diagnóstico do Município de Juazeiro**. p.33. Ministério de Minas e Energia, Brasil. 2005c.

BRASIL. Registro Genealógico do cavalo Nordestino. Ministério da Agricultura / Comissão Coordenadora do Cavalo Nacional. **Anuário de 1983 / Raça Homenageada Pantaneira**. Brasília, 1983.

BREEN, M. et al. Genetical and physical assignments of equine microsatellites: first integration of anchored markers in horse genome mapping. **Mammalian Genome**, v.8, p.267-273, 1997.

BROWN, A.H.D.; WEIR, B.S. Measuring genetic variability in plant populations. In: **Isozymes in plant genetics and breeding/Part A**. TANKSLEY, S. D.; ORTON, T. J. (Eds.). Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1983. p.73-86.

CAÑÓN, J. et al. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. **Animal Genetics**, v.31, p.39-48, 2000.

CAVALLI-SFORZA, L.L.; EDWARDS, A.W.F. Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. **Evolution**, v. 21, p. 550-570, 1967.

CAVALLI-SFORZA, L.L. Human diversity. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF GENETICS, TOKYO, 3, 1969, Tokyo. **Proceeding's 12<sup>th</sup>**. Tokyo, 1969. p.405-416.

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Review Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.126, p.455–476, 2000.

CHAUHAN, M.; GUPTA, A.K.; DHILLON, S. Genetic characterization of Indian Spiti horses. **Journal of Genetics**, v. 83, p.291-295, 2004.

CHAUHAN, M.; GUPTA, A.K.; DHILLON, S. Genetic diversity and population structure of three Indian horse breeds. **Molecular Biology Reports**, v.38, p.3505-3511, 2011.

CHIEFFI, A. Introdução do cavalo no Brasil e desenvolvimento da criação. In: **Criemos bons equídeos**. Rio de Janeiro: Ministério da agricultura / Serviço de Informações Agrícolas, 1950. p.21.

COELHO, E.G.A. et al Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. Comunicação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.111-115, 2004.

CONANT, E.K.; JURAS, R.; COTHRAN, E.G. A microsatellite analysis of five Colonial Spanish horse populations of the southeastern United States. **Animal Genetics**, v.43, p.53-62, 2011.

COOGLE, L. et al. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci LEX002, -003, -004, -005, -007, -008, -009, -010, -011, -013 and -014. **Animal Genetics**. v.27, p.126–127, 1996.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v.144, p.2001-2014, 1996.

CORTESÃO, J. Carta de Pero Vaz de caminha. In: **A expedição de Pedro Álvares Cabral e o descobrimento do Brasil**. Paris-Lisboa: Livrarias Aillaud e Bertrand, 1922. p.252.

COSTA, H.E.; MANSO FILHO, H.; FERREIRA, L. **Exterior e treinamento do cavalo**. Recife: UFRPE – Imprensa Universitária, 2001. p.169.

COSTA, M.A.P. et al. Genotyping in the Brazilian Criollo Horse Stud Book: resources and perspectives. **Genetics and Molecular Research**, vol.9, n.3, p.1645-1653, 2010.

COSTA, M.R. et al. Distâncias genéticas em equinos (*Equus caballus*) por meio de marcadores microssatélites. **Revista Biociências**, v.15, n.1, 2009. Disponível em: <<http://periodicos.unitau.br/ojs-2.2/index.php/biociencias/article/viewFile/798/620>>. Acesso em: 17 jan. 2011.

COSTA, M.R. et al. Variabilidade Genética de Equinos da Amazônia Brasileira. **Biociência & Desenvolvimento**, n.35, p.52-55, 2005.

COSTA, N.; VAL, L.J.; LEITE, G.U. **Estudo da Preservação do Cavalo Nordestino**. Recife: Departamento de Produção Animal, 1974. p.38.

COTHRAN, E.G. et al. Genetic analysis of the Venezuelan Criollo horse. **Genetics and Molecular Research**, v.10, p.2394-2403, 2011.

COTHRAN, E.G.; LUIS, C. Genetic distance as a tool in conservation of rare horse breeds. In: **Conservation Genetics of Endangered Horse Breeds**. BODO, I.; ALDERSON, L.; LANGOLIS, B. (Ed). EAAP publication n° 116. Netherlands: Wageningen, 2005. p. 55-71.

COTHRAN, E.G. et al. Genetics of the Pantaneiro horse of the Pantanal region of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, p.343-349, 1998.

CUNNINGHAM, E.P. et al. Microsatellite diversity, pedigree relatedness and the contribution of founder lineages to thoroughbred horses. **Animal Genetics**, v.32, p.360–364, 2001.

CUNHA, E. **Os sertões**. São Paulo: Editora Três, 1984. Cap. III, p.51.

DI RIENZO, A. et al. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. v. 91, pp. 3166-3170, 1994.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.167-169, 2003.

EDING, H.; LAVAL, G. Measuring the genetic uniqueness in livestock. In: **Genebanks and the conservation of farm animal genetic resources** edited by J.K. Oldenbroek. DLO institute for Animal Science and Health. Lelystad: Institute for Animal Science and Health, the Netherlands, 1999.

EDING, H.; MEUWISSEN, T.H.E. Marker-based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.118, 141-159, 2001.

EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genético Animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p.39-52, 2002.

ELLEGREN, H. et al. Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. **Animal Genetics**, v. 23, p.133-142, 1992.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple Sequences With Complex Evolution. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.435-445, 2005.

EVANNO, G. et al. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v.164, p.1567–1587, 2003.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, v.7, p.574–578, 2007.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from gene frequencies and quantitative characters: finding maximum likelihood estimates. **Evolution**, v.35, p.1229-1242, 1981.

FELSENSTEIN, J. **PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.6**. Distributed by Felsenstein J. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. DOMESTIC ANIMAL DIVERSITY INFORMATION SYSTEM. DAD-IS. **World Watch list for domestic animal diversity**. 3ed. Editado por Beate D. Scherf. Roma: FAO, 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/009/x8750e/x8750e00.htm>>. Acesso em: 2 agost. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. **FAOSTAT 2010**. Disponível em: < [http://faostat3.fao.org/home/index.html# VISUALIZE\\_BY\\_DOMAIN](http://faostat3.fao.org/home/index.html# VISUALIZE_BY_DOMAIN)>. Acesso em: 20 nov. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. INTERNATIONAL SOCIETY ANIMAL GENETICS. ISAG. **Draft guidelines on molecular genetic characterization of animal genetic resources**. Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Thirteenth Regular Session. Rome: FAO, 18 – 22 jul., 2011. Disponível em: <[www.fao.org/docrep/meeting/022/ am652e.pdf](http://www.fao.org/docrep/meeting/022/am652e.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. **La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura – Resumen**. Editado por Daffydd Pilling e Barbara Rischkowsky. Roma: FAO, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. Recommendations of the FAO expert consultation. In: **The management of global animal genetics**. Ed. J. Hodges. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome: FAO. 1992.

FRANCESCHI, R. et al. Distribuição de variabilidade genética por microssatélites na raça de equinos Crioulo (*Equus caballus*). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XV, 2006, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2006. Disponível em: <[http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/resumo\\_expandido/CB/CB\\_0108.pdf](http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/resumo_expandido/CB/CB_0108.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2010.

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

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**, v.7, p.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.

GÓMEZ, M.D. et al. **La conservación y mejora genética de la raza Pottoka**. Departamento de genética – Universidade de Córdoba. 2010. Disponível em: <[http://pottoka.info/files/galeria/Cons\\_mejora\\_pottoka.pdf](http://pottoka.info/files/galeria/Cons_mejora_pottoka.pdf)>. Acesso em: 15 ago. 2010.

GORMAN, G.C.; RENZI, J. Genetic distance and heterozygosity estimates in electrophoretic studies – effects of sample size. **Copeia**, v.79, p.242-249, 1979.

GOUDET, J. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v.86, p.485–486, 1995.

GOULART, J.A. **O cavalo na formação do Brasil**. São Paulo: Letras e Artes, 1964. p. 249.

GUERIN, G.; BERTAUD, M.; AMIGUES, Y. Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. **Animal Genetics**, v.25, p.62, 1994.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, p.361-372, 1992.

GOLDSTEIN, D. B. et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v.139, p.463-471, 1995.

HALDANE, J.B.S. An exact test for randomness of mating. **Journal of Genetics**, v.52, p.631-635, 1954.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2010. 659p.

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

HENDRICKS, B.L. **International Encyclopedia of Horse Breeds**. Oklahoma: University of Oklahoma, 2007. 481p.

HUELSENBECK, J.P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science**, v.294, p.2310-2314, 2001.

HUFF, D.R. et al. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, p.927-934, 1993.

HURLBERT, S.H. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. **Ecology**, v.52, p.577-586, 1971.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE. 2010. Produção Pecuária 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/download/estatistica.shtm>>. Acesso em: 15 nov. 2011.

IRVIN, Z.J. et al. Equine dinucleotide repeat polymorphisms at loci ASB21, 23, 25 and 37-43. **Animal Genetics**, v.29, p.67, 1998.

IWANCZYK, E. et al. Genetic structure and phylogenetic relationships of the Polish Heavy Horse. **Journal of Applied Genetics**, v.47, p.353-359, 2006.

JACOMINE, P.K.T. et al. **Levantamento exploratório – reconhecimento de solos do Estado do Piauí**. Rio de Janeiro. EMBRAPA-SNLCS/SUDENE-DRN. 1986. 782p.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v.23, p.1801–1806, 2007.

JEREMIAS. In: A BÍBLIA. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 2011.

KALINOWSKI, S.T. Evolutionary and statistical properties of three genetic distances. **Molecular Ecology**, v.11, p.1263-1273, 2002.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.9, p.801 - 808, 2007.

KELLY, L. et al. Genetic characterization of the Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. **Research in Veterinary Science**, v.72, p. 69-73, 2002.

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

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.75, p.2868–2872, 1978.

KORINGA et al. Genetic characterization and bottleneck studies in Kathiawari horse breed of India. **Haryana Veterinarians**, v.47, p.77-83, 2008.

LANG, R. GhostView version 4.9 software. 2006. Disponível em: <<http://pages.cs.wisc.edu/~ghost/gsview/get49.htm>> Acesso em: 06 fev 2011.

LATTER, B.D.H. Selection in finite populations with multiple alleles. 111. Genetic divergence with centripetal selection and mutation. **Genetics**, v.7, p.475-490, 1972.

LEBERG, P.L. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. **Evolution**, v.46, p.477-494, 1992.

LEROY, G. et al. Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. **Genetics Selection Evolution**, v.41, p.1-12, 2009.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 250p.

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.

LIPPI, A.S.; MORTARI, N. Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Mangalarga (Equus caballus). **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.431-434, 2003.

LUIKART, G. et al. Distortion of allele frequency distributions provides test for recent population bottlenecks. **Journal of heredity**, v.89, p.238-247, 1998a.

LUIKART, G. et al. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. **Molecular Ecology**, v.7, p.963-974, 1998b.

LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. **Conservation Biology**, v.12, p.228-237, 1998.

LUÍS, C. et al. Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds based on protein and microsatellite loci variation. **Animal Genetics**, v.38, p.20–27, 2007.

LUÍS, C.; COTHRAN, E.G.; OOM, M.M. Inbreeding and Genetic Structure in the Endangered Sorraia Horse Breed: Implications for its Conservation and Management. **Journal of Heredity**, v.98, p.232–237, 2007.

MAGUIRE, T.L.; PEAKALL, R.; SAENGER, P. Comparative analysis of genetic diversity in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae) detected by AFLPs and SSRs. **Theoretical and Applied Genetics**, v.104, p.388-398, 2002.

MARETTO, F.; MANTOVANI, R. Genetic variability of Italian Heavy Draught Horse. **Italian Journal of Animal Science**, v.8, p. 95-97, 2009.

MARKLUND, S. et al. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. **Animal Genetics**, v.25, p.19-23, 1994.

MARSHALL, T.C. et al. Statistical confidence for likelihood – based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, n.5, pp. 639-655, 1998.

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. Departamento de Zootecnia, Recife.

MELO, J.B et al. Estudo morfométrico de éguas adultas do cavalo Nordestino no município de Altinho, Pernambuco, Brasil. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008.

MELO, J.B. et al. Estudo morfométrico do cavalo Nordestino no estado do Piauí. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010.

MELO, J.B.; RIBEIRO, M.N.; TRAVASSOS, A.E.V. 2006. **Caracterização fenotípica do Cavalo Nordestino na mesorregião Agreste do Estado de Pernambuco.** p. 32. Relatório Final de Licença Sabática, Recife.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. **Genetics**, v.142, p.1061-1064, 1996.

MONTEIRO, J. Origem e evolução do cavalo na Península Ibérica. **Revista dos criadores**, v.55, 1986.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.70, p.3321-3323, 1973a.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v.41, pp. 225-233, 1977.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v.106, p.283-282, 1972.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics.** New York: Columbia University Press. 1987. 512p.

NEI, M. The theory and estimation of genetic distance. In: **Genetic Structure of Populations**, edited by N. E. MORTON. University Press of Hawaii: Honolulu. 1973b. p.45-54.

NEI, M.; CHAKRABORTY, R.; FUERST, P.A. Infinite allele model with varying mutation rate. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.73, p.4164-4168, 1976.

NEI, M.; MARUYAMA, T.; CHAKRABORTY, R. The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. **Evolution**, v.29,p. 1-10, 1975.

NEI, M.; ROYCHOUDHURY, A.K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. **Genetics**, v.76, p.379-390, 1974.

NEI, M.; TAJIMA, F.; TATENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. **Journal of Molecular Evolution**, v.19, p.153-170, 1983.

NOTTER, D.R. The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. **Journal of Animal Science**, v.77, p.61-69, 1999.

NOZAWA, K. et al. Phylogenetic relationships among Japanese Native and Alien horses estimated by protein polymorphisms. **Journal of Equine Science**, v.9, p.53-69, 1998.

OHTA, T.; KIMURA, M. A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. **Genetical Research**, v.22. p. 201-204, 1973.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **American Journal of Human Genetics**, v. 51, p. 283-290, 1992.

PAGE, R.D.M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v.12, p.357-358, 1996.

PEAKALL, R. et al. Evolutionary implications of allozyme and RAPD Variation in diploid populations of *Dioecious buffalograss* *Buchloe dactyloides*. **Molecular Ecology**, v.4, p.135-147, 1995.

PEAKALL, R; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295, 2006.

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, v.12, p.844-855, 1998.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Computer note. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v.90, p.502-503, 1999.

PLANTE, Y. et al. Genetic diversity in a feral horse population from Sable Island, Canada. **Journal of Heredity**, v.98, n.6, p.594-602, 2007.

PONSUKSILI, S. et al. Comparison of multilocus DNA fingerprints and microsatellites in an estimate of genetic distance in Chicken. **The Journal of Heredity**. v.90, p.656-659, 1999.

PREVOSTI, A.; OCANA, J.; ALONZO, G. Distances between populations for *Drosophila subobscura* based on chromosome arrangement frequencies. **Theoretical Application Genetics**, v.45, p.231-241, 1975.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945-959, 2000.

PRYSTUPA, J. M. et al. Genetic diversity and admixture among Canadian, Mountain and Moorland and Nordic pony population. **Animal**, v.6, p.19-30, 2012.

RAYMOND, M.; F. ROUSSET. GENEPOP Version 1.2: populations genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REYNOLDS, J.; WEIR B.S.; COCKERHAM, C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics Society of America**, v.105, p.767-779, 1983.

RIBEIRO, M. et al. Allelic diversity and forensic performance of 17 microsatellite markers in Brazilian Criollo and Campolina horse breeds. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51, 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: São Paulo - Hotel Monte Real, Sociedade Brasileira de Genética, 2005. Disponível em: <

[http://web2.sbg.org.br/congress/CongressosAnteriores/Pdf\\_resumos/51/GA380.pdf](http://web2.sbg.org.br/congress/CongressosAnteriores/Pdf_resumos/51/GA380.pdf)>. Acesso em: 10 out. 2010.

ROGERS, J.S. Measures of genetic similarity and genetic distance. **University of Texas Publication**, v.7213, p.145 - 153, 1972.

ROSENBERG, N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.137–138, 2004.

ROSSITIER, S.J. et al. Genetic variation and population structure in the endangered great horseshoes bat *Rhinolophus ferrumequinum*. **Molecular Ecology**, v.9, p.1131-1135, 2000.

ROUSSET, F. GenePop'007: a complete re-implementation of the GenePop software for Windows and Linux. **Molecular Ecology resources**, v.8, p.103-106, 2008.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Statistical analyses of population genetic data: old tools, new concepts. **Trends in Ecology and Evolution**, v.12, p.313-317, 1997.

ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics**, v.140, p.1413-1419, 1995.

RUSSO, C.A.M.; MIYAKI, C.Y.; PEREIRA, S.L. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. In: **Biologia Molecular e Evolução**. MATIOLI, S.R. (Org.). Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202p.

SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, v. 4, p.406-425, 1987.

SAÍZ, M.M.J. **Estudio de la variabilidad genética de la raza autóctona equina el caballo Losino**. 2000. 194f. Tese (Doutorado em Genética) – Universidad de Córdoba. Departamento de Genética, Córdoba.

SANGHVI, L. D. Comparison of genetical and morphological methods for a study of biological differences. **American Journal of Physical Anthropology**, v.11, p. 385-404, 1953.

SANTOS, R. **O cavalo Nordestino**. Agropecuária Tropical. Uberaba: Ed. Agropecuária Tropical, Uberaba, n.28, p.46-49, set./out. 1982.

SANTOS, R.F. **O cavalo nacional e suas pelagens**. 1 ed. Minas Gerais: Belo Horizonte, 1978. p.35-36.

SERENO, F.T.P.S. et al. Genetic diversity of Brazilian Pantaneiro horse and relationships among horse breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43: 595-604, 2008.

SILVA FILHO, E.; SCHNEIDER, M.P.C.; SILVA, A.L.C. Variabilidade Genética de Cavalos baseada em DNA Microsatélites. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, p.76-87, 2007.

SILVA, A.C.M. et al. Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers. **Genetics and Molecular Research**, v.11, p.881-890, 2012

TAKEZAKI, N.; NEI, M. Empirical Tests of the reliability of phylogenetic trees constructed with Microsatellite DNA. **Genetics**, v.178, p.385–392, 2008.

TAKEZAKI, N.; NEI, M. Genetic Distances and Reconstruction of Phylogenetic Trees From Microsatellite DNA. **Genetics**, v.144, p.389-399, 1996.

TOZAKI, T. et al. Microsatellite Variation in Japanese and Asian Horses and Their Phylogenetic Relationship Using a European Horse Outgroup. **Journal of Heredity**, v.94, n.5, p.374–380, 2003.

TRAVASSOS, A.E.V. **Caracterização Fenotípica do Cavalo Nordestino no Estado de Pernambuco**. 2004. 59p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Zootecnia, Recife, Pernambuco.

VAN HAERINGEN, H. et al. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. **Animal Genetics**, v.25, p.207, 1994.

VEGA-PLA, J. L. et al. Saving feral horse populations: does it really matter? A case study of wild horses from Doñana National Park in southern Spain. **Animal Genetics**, v.37, p.571–578, 2006.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v.15, p.323-354, 1951.

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

## APÊNDICE

Tabela 1. Diversidade genética e valores de Conteúdo de Informação Polimórfica de equinos da raça Árabe oriundo de haras brasileiros. Dados utilizados para compor o *outgroup*

Sp	Locus	Na	Ne	Ar	Ho	UHe	EHW	Fis	PIC
ARAB n = 137	AHT4	6	4,819	8,003	0,788	0,795	NS	0,009 <sup>ns</sup>	0,762
	AHT5	6	3,691	6,896	0,737	0,732	NS	-0,008 <sup>ns</sup>	0,682
	ASB2	9	1,969	9,671	0,489	0,494	*	0,010 <sup>ns</sup>	0,470
	ASB23	8	4,390	9,177	0,650	0,775	*	0,162 <sup>ns</sup>	0,739
	HMS3	10	3,166	7,962	0,394	0,687	***	0,427 <sup>ns</sup>	0,632
	HMS6	5	3,676	6,290	0,650	0,731	*	0,111 <sup>ns</sup>	0,679
	HMS7	6	3,919	7,024	0,774	0,748	NS	-0,035 <sup>ns</sup>	0,706
	HTG10	8	3,841	9,871	0,620	0,742	**	0,165 <sup>ns</sup>	0,701
	HTG4	5	2,695	6,288	0,555	0,631	NS	0,122 <sup>ns</sup>	0,555
	HTG6	3	2,769	5,745	0,613	0,641	NS	0,044 <sup>ns</sup>	0,562
	HTG7	3	1,947	4,207	0,460	0,488	NS	0,058 <sup>ns</sup>	0,429
	VHL20	8	5,681	9,706	0,781	0,827	NS	0,056 <sup>ns</sup>	0,800

Sp = Subpopulação; n = tamanho da amostra; Na = número de diferentes alelos; Ne = número efetivo de alelos; Ar = riqueza alélica; Ho = Heterozigosidade Observada; UHe = Heterozigosidade esperada não viesada; EHW = Equilíbrio de Hardy-Weinberg; Fis = Coeficiente de consanguinidade; PIC = Conteúdo de Informação Polimórfica; NS = Não Significativo; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001.