



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE EQÜÍDEOS DA RAÇA
MARAJOARA POR MICROSSATÉLITES**

MARIA ROSA TRAVASSOS DA ROSA COSTA

Belém
2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA
MOLECULAR

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE EQÜÍDEOS DA RAÇA MARAJOARA POR MICROSSATÉLITES

MARIA ROSA TRAVASSOS DA ROSA COSTA

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Iracilda da Cunha Sampaio.

Belém
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Maria Rosa Travassos da Rosa Costa

Caracterização genética de eqüídeos da raça marajoara por microsatélites

93 p; il; 30 cm.

Tese apresentada à Universidade Federal do Pará/UFPA - 2007

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Maria Iracilda da Cunha Sampaio.

1. Caracterização genética. 2. marcadores moleculares. 3. DNA. 4. microsatélites

C.D.D. 572.86

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

1-INSTITUIÇÕES

Embrapa Amazônia Oriental (EAO) – Núcleo de Conservação de Recursos Genéticos Animais da Amazônia Oriental (BAGAM);

Universidade Federal do Pará (UFPA) – Laboratório de Genética, Departamento de Biologia, Campus de Bragança;

Universidade de Córdoba – Departamento de Genética – Córdoba – Espanha;

Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Cria Cabalar e Remonta do Ministério da Defesa Espanhol – Córdoba – Espanha;

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN).

2-FONTES FINANCIADORAS

Embrapa Amazônia Oriental (EAO);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Bolsa de doutorado “*sandwich*”;

Laboratório de Genética Molecular do Serviço de Cria Cabalar e Remonta do Ministério da Defesa Espanhol – Córdoba – Espanha.

*Dedico este trabalho
aos meus familiares
e à Thayná Costa de Oliveira.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus acima de tudo.

Agradeço a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

À Thayná Costa de Oliveira, pela existência ímpar e colaboração na tradução de textos.

Aos meus pais, pela constante presença e apoio incondicional.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos pelo amor que nos une.

À minha orientadora, Profa. Dra Maria Iracilda da Cunha Sampaio, pela confiança, apoio, ensinamentos, amizade e contribuição valiosa na obtenção deste título.

Ao meu orientador na Espanha, Dr. José Luis Vega-Pla, por sua disponibilidade, orientação, ensinamentos, amizade, colaboração nos experimentos e análises, o que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Dr. José Ribamar Felipe Marques, pela colaboração na coleta de material biológico, ensinamentos ministrados e valiosa colaboração que culminaram na finalização deste trabalho.

Ao Dr. Pedro Pablo Rodríguez Gallardo, diretor do Laboratório de Genética Molecular do Ministério da Defesa Espanhol, por colocar a minha disposição os meios técnicos e humanos para a realização da parte experimental deste trabalho.

À minha conselheira acadêmica e amiga, Dra. Ruth Linda Benchimol, pela colaboração e principalmente apoio constante nos momentos difíceis da minha vida.

Ao Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo, por ter contribuído para o acesso à Universidade de Córdoba, ensinamentos, amizade e agradável convivência com sua família durante a permanência na Espanha.

À Dra. Amparo Martinez, pelos ensinamentos no Laboratório de Biologia Molecular, amizade e agradável convivência.

Ao Sr. Rafael Jimenéz Segui, pelos ensinamentos sobre o Genotyper, Genescan e amizade.

À Esperanza Camacho, pela amizade e convivência.

À amiga Eloísa Cardoso, pela amizade e apoio nos momentos difíceis.

Ao corpo docente do curso de Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, pelos ensinamentos ministrados.

Ao Dr. Marcelo Vallinoto, Dra. Cláudia Santos e Dra. Wilsea Figueiredo, por participarem da minha banca de qualificação e pelas valiosas sugestões apresentadas.

Aos amigos do Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Arthur Mariante, Socorro Maués e Andréa Egito, pela cessão de material biológico para a realização deste trabalho e amizade.

À minha irmã Lúcia Travassos da Rosa Costa, pela digitalização das figuras e apoio constante em minha vida

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental, pela colaboração na coleta de material biológico e amizade.

Aos bolsistas Miriã Ohaze, Alesandra Rodrigues, Raimundo Nonato Camargo Jr e Ana Amélia Borba G. Barros, pela coleta de material biológico e revisão do texto.

Ao funcionário do Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental Izaías Nascimento Leite, pelo apoio constante e amizade.

À Christina Vinson, pela amizade e estímulo.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Cláudio Vieira de Araújo, Dra. Maria do Socorro Maués Albuquerque, Dr. Sidney Santos e Dra. Maria Lúcia Harada, pelas sugestões apresentadas.

À Embrapa Amazônia Oriental, por esta e outras oportunidades que contribuíram para a minha formação.

A todos os funcionários do Laboratório de Genética Molecular do Ministério da Defesa Espanhol, pelo empenho, colaboração nos experimentos laboratoriais e agradável convívio.

A todos os amigos que torceram por mim.

SUMÁRIO	
INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS	ii
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DE LITERATURA	2
Classificação e origem dos eqüideos	2
Os cavalos da Península Ibérica	5
O cavalo Marajoara e o minicavalo Puruca	7
Padrão da raça Marajoara	10
Padrão da raça Puruca	13
A ilha de Marajó	16
Conservação de recursos genéticos	18
Estratégias de conservação da variação genética	19
Polimorfismos de DNA	21
DNA repetitivo	22
Técnicas para a caracterização alélica dos microssatélites	26
Extração de ácidos nucléicos	26
A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
Amplificação das seqüências de microssatélites	29
OBJETIVOS	33
Geral	33
Específicos	33
MATERIAL E MÉTODOS	33
Área experimental/animais	33
Extração de DNA	34
Microssatélites estudados	37

Análise da heterozigosidade	43
Conteúdo de Informação Polimórfica - PIC	44
Equilíbrio de Hardy – Weinberg	44
Análise da estatística F (Fis, Fst e Fit) e G_{ST}	44
Estudo de distâncias genéticas	46
Estudos populacionais	46
Árvores de distância genética	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
Microsatélites genotipados	48
Número Total de Alelos (NTA), PIC e heterozigosidades	59
Média de Alelos e Heterozigosidade por população	62
Gst e a estatística F - Fis (f), Fst (Θ) e Fit (F)	65
Frequências alélicas	68
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	74
Distâncias genéticas e árvores	76
Análise de Componentes Principais	81
CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Protocolo para extração de DNA a partir de sangue.

TABELA 2- Microssatélites tipificados para a caracterização da raça Marajoara.

TABELA 3- Protocolo para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

TABELA 4- Condições de amplificação específicas para cada microssatélite.

TABELA 5- Protocolo para a preparação de gel de poliacrilamida 6%.

TABELA 6- Microssatélites analisados, número e média de alelos detectados, PIC e Heterozigosidades esperada e observada.

TABELA 7- Média de alelos e heterozigosidades esperada e observada por populações.

TABELA 8- Microssatélites analisados, G_{st} e os estatísticos F_{is}, F_{st} e F_{it}.

TABELA 9- Frequência de alelos por marcador e população destacando-se o mais freqüente.

TABELA 10- Valores relativos ao equilíbrio de Hardy – Weinberg.

TABELA 11- Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo método D_A (NEI, 1983) em cima da diagonal e segundo o método standard D_s (NEI, 1972) embaixo da mesma.

TABELA 12- Matriz de distância genética entre populações obtidas segundo método de Reynolds *et al.* (1983) em cima da diagonal e de Shriver *et al.* (1995) D_{sw} embaixo da mesma.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01- Reprodutor da raça Marajoara.

FIGURA 02- Mini cavalo da raça Puruca.

FIGURA 03- Mapa ilustrativo do Arquipélago de Marajó.

FIGURA 04- Padrão de alelos detectados para o *locus* AHT4 na raça Marajoara.

FIGURA 05- Padrão de alelos detectados para o *locus* HTG4 na raça Marajoara.

FIGURA 06- Padrão de alelos detectados para o *locus* HMS7 na raça Marajoara.

FIGURA 07- Padrão de alelos detectados para o *locus* ASB2 na raça Marajoara.

FIGURA 08- Padrão de alelos detectados para o *locus* ASB17 na raça Marajoara.

FIGURA 09- Padrão de alelos detectados para o *locus* HMS6 na raça Marajoara.

FIGURA 10- Padrão de alelos detectados para o *locus* ASB23 na raça Marajoara.

FIGURA 11- Padrão de alelos detectados para o *locus* HTG10 na raça Marajoara.

FIGURA 12- Padrão de alelos detectados para o *locus* HMS3 na raça Marajoara.

FIGURA 13- Padrão de alelos detectados para o *locus* LEX33 na raça Marajoara.

FIGURA 14- Padrão de alelos detectados para o *locus* T343 na raça Marajoara.

FIGURA 15- Padrão de alelos detectados para o *locus* T344 na raça Marajoara.

FIGURA 16- Padrão de alelos detectados para o *locus* T312 na raça Marajoara.

FIGURA 17- Padrão de alelos detectados para o *locus* T301 na raça Marajoara.

FIGURA 18- Padrão de alelos detectados para o *locus* T297 na raça Marajoara.

FIGURA 19- Padrão de alelos detectados para o *locus* T333 na raça Marajoara.

FIGURA 20- Padrão de alelos detectados para o *locus* T341 na raça Marajoara.

FIGURA 21- Padrão de alelos detectados para o *locus* T325 na raça Marajoara.

FIGURA 22- Padrão de alelos detectados para o *locus* T294 na raça Marajoara.

FIGURA 23- Padrão de alelos detectados para o *locus* T394 na raça Marajoara.

FIGURA 24- Padrão de alelos detectados para o *locus* T321 na raça Marajoara.

FIGURA 25- Padrão de alelos detectados para o *locus* T287 na raça Marajoara.

FIGURA 26- Árvore de Distância Genética.

FIGURA 27- Árvore individual. **FIGURA 28-** Análise de componentes principais.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente a raça eqüina Marajoara que é uma das mais importantes da região Amazônica, sendo originada no Brasil, mais especificamente na ilha de Marajó. Esta raça, bastante difundida e utilizada nas fazendas da ilha, é mantida em conservação no Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental – BAGAM, da Embrapa, sendo altamente adaptada às condições climáticas e ao relevo que caracterizam essa região. Foram utilizadas amostras da raça Marajoara (54), Puruca (47), Mangalarga (30), Puro Sangue Inglês coletado no Brasil (47), Árabe coletado no Brasil (25), Pantaneiro (63), Lusitano (93), Árabe coletado na Espanha (48), Asturcon (39), Pura Raça Espanhola (60), Puro Sangue Inglês coletado na Espanha (46), Losino (59), Mallorquina (30), Menorquina (69) e Potoka (27). Foram utilizados 22 iniciadores (HTG4, AHT4, HMS7, ASB2, ASB17, HMS6, ASB23, HTG10, HMS3, LEX33, T287, T294, T297, T301, T312, T321, T325, T333, T341, T394, T343 e T344) amplificados pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os produtos da PCR foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6%. Foram detectados 236 alelos, com média igual a 7,5 alelos//locus, variando entre 16 e 6 alelos. As médias de Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) e as heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), conforme as raças estudadas, foram respectivamente, 0,7610, 0,7873 e 0,7413. A estimativa da estatística F de Wright (1978) mostrou que a variação entre as raças foi maior (F_{st} 8,1%) do que dentro delas (F_{is} 0,78%), demonstrando que a diferenciação genética neste estudo foi maior entre as raças do que dentro de cada uma delas. Foram observados poucos desvios em relação ao equilíbrio de

Hardy – Weinberg. A menor distância genética observada foi entre a raça Marajoara e a Puruca seguida da Mangalarga. Os resultados sugerem que a raça Marajoara representa um grupo genético claramente distinto de outras raças excetuando-se a Puruca que pode ser utilizada como reservatório de genes para a mesma, com razoável variabilidade genética. Medidas de conservação e manejo devem ser intensificadas nesse importante recurso genético brasileiro a fim de evitar a sua descaracterização e perda de identidade genética.

Palavras-chave: conservação animal, distância genética, DNA, marcadores moleculares, raças eqüinas, variabilidade.

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize genetically the Marajoara equine breed, one of most important races of the Amazon region, which is originated in Brazil, and more specifically at Marajó island. This race, kept in conservation in the Animal Germplasm Bank at the Amazônia Oriental-BAGAM, is highly adapted to the climatic and morphological conditions that characterizes the Marajó island. In this study, samples of the Marajoara (54), Puruca (47), Mangalarga (30), Puro Sangue Inglês collected in Brazil (47), Árabe collected in Brazil (25), Pantaneiro (63), Lusitano (93), Árabe collected in Spain (48), Asturcon (39), Pura Raça Espanhola (60), Puro Sangue Inglês collected in Spain (46), Losino (59), Mallorquina (30), Menorquina (69) and Potoka (27) races were employed for the genetic characterization of the Marajoara breed. Twenty-two primers were used (HTG4, AHT4, HMS7, ASB2, ASB17, HMS6, ASB23, HTG10, HMS3, LEX33, T287, T294, T297, T301, T312, T321, T325, T333, T341, T394, T343 and T344) and amplified through the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. The PCR products were separated in 6% polyacrylamide gel. Two hundred thirty-six alleles were detected, which has a mean value of 7.5 alleles /locus, varying between 16 and 6 alleles. The averages of Polymorphism Information Content (PIC) and the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosity values were of 0.7610, 0.7873 and 0.7413, respectively. The F values statistics (Wright, 1978) showed that the variation between the races was higher (F_{st} 8.1) than within the races (F_{is} 0.78%). The loci not showed Hardy-Weinberg disequilibrium. The lowest genetic distance was observed between the Marajoara and Puruca breeds, allowed for the low genetic distance between the Marajoara and Mangalarga breeds. The results

suggest that the Marajoara breed represents a clearly distinct genetic group from the other breeds, with exception of the Puruca breed, which can be used as its genetic pool, with reasonable genetic variability. Management programs must emphasize this important Brazilian genetic resource, in order to prevent the lost of the original characteristics and genetic identity.

Keys-words: animal conservation, DNA, genetics distance, horse breeds, molecular markers, variability.

1-INTRODUÇÃO

O cavalo Marajoara é uma das raças mais importantes da região Amazônica, sendo originada no Brasil, especificamente na ilha de Marajó, na Amazônia Brasileira, estando adaptada às condições climáticas e ao relevo plano e alagado que caracterizam essa ilha. Até o momento, a origem do cavalo Marajoara não está muito clara sob o ponto de vista genético e, devido às várias introduções de eqüinos na América do Sul, há muitas controvérsias históricas sobre isso.

Segundo Miranda Neto (1993), a formação da pecuária na ilha do Marajó deveu-se à proximidade com Belém e pela disponibilidade de imensas áreas de campos naturais, características das várzeas do Marajó, onde as condições propícias para a criação desses animais eram muito superiores. A criação extensiva proporcionou ao longo dos anos a formação da raça eqüina Marajoara, com acentuada predominância de sangue Andaluz ou, ainda, segundo Ribeiro (1993) com sangue de Barbo ou Andaluz.

O fato é que a contribuição das raças ancestrais na formação do cavalo marajoara ainda não está geneticamente esclarecida. Por outro lado, o mesmo vem se descaracterizando ao longo do tempo, devido a cruzamentos indiscriminados com outras raças, ainda que seja possível identificar núcleos com características fenotípicas da Raça, conforme o padrão estabelecido pela A.B.C.C.R.M (Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Marajoara), criada em 1979.

Esses animais são imprescindíveis para o desenvolvimento da pecuária da ilha de Marajó, pois são utilizados na "lida" diária no campo, graças às

características que desenvolveram como: grande resistência às adversidades do meio e rusticidade, velocidade nos galopes curtos e versatilidade aos ambientes diversificados. São indispensáveis para suprir as necessidades de tração (de carroças), nos trabalhos rotineiros das fazendas regionais, com baixo custo operacional. Além disso, são utilizados na programação turística de esporte e lazer da Ilha, anualmente, visto que participam de “provas” de resistência, enduros e corridas.

Um núcleo de cavalos Marajoara vem sendo mantido no Banco de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental / BAGAM, da Embrapa Amazônia Oriental, com o intuito de conservar esse germoplasma, assim como, intensificar os estudos de caracterização genética que permitam elucidar as dúvidas sobre a origem desta raça e fornecer informações sobre a estrutura genética atual, visando subsidiar programas de melhoramento genético, permitindo a consolidação deste grupo genético

2-REVISAO DE LITERATURA

2.1-Classificação e origem dos eqüídeos

Os eqüinos pertencem ao Reino Animalia, Filo Chordata, Classe Mammalia. De acordo com Getty (1981) a posição dos cavalos na classificação dos mamíferos, é a seguinte:

Subclasse: Theria

Infraclasse: Eutheria

Ordem: Perissodactyla

Subordem: Hippomorpha

Família: Equidae

Gênero: *Equus*

Existem variações no cariótipo do gênero *Equus*, sendo observados números diplóides variando entre 44 e 66. O cariótipo do cavalo doméstico (*Equus caballus*), como é o caso do cavalo Marajoara, é $2n = 64$ cromossomos (TORRES & JARDIM, 1992).

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

O cavalo *Eohippus*, considerado o ancestral mais antigo, viveu no Eoceno há aproximadamente 50 milhões de anos. Era um animal com cerca de 45 cm de comprimento e 30 cm de altura, assemelhando-se a uma raposa (BECK, 1989). Por tais características, esse animal foi inicialmente domesticado para consumo de sua carne e couro, pois eram pequenos demais para serem montados (MARIANTE & CAVALCANTE, 2000).

Através da história, o cavalo deixou sua marca registrada de um animal selvagem, um verdadeiro símbolo de liberdade, utilizado pelo homem primitivo como fonte de alimento. Após a sua domesticação passou a ser figura central nas

atividades relacionadas às artes, poesia, escultura, guerra, transporte, lazer e esporte. Portanto, esses animais têm importância tanto sócio-cultural como econômica, pois se prestam ao desenvolvimento de trabalho de tração dentre outros (TORRES & JARDIM, 1992).

Há duas hipóteses para a formação da espécie eqüina. A primeira é que eles seriam originários de cavalos da Ásia Central, a segunda, de animais da América Setentrional, de onde emigraram para a Ásia, quando o Alasca ainda era ligado àquele continente pelo estreito de Bering (TEIXEIRA, 1995). Da Ásia se espalharam para a Europa e África. Alguns autores defendem apenas a última versão, na qual os primeiros passos da história evolutiva eqüina, que culminou no *Equus caballus*, deram-se em solo americano. Segundo Beck (1989), evidências fósseis do mais antigo animal aceito como primeiro ancestral do cavalo foram encontradas na América do Norte. Por motivos desconhecidos, desapareceu totalmente da América durante a era Quaternária, surgindo novamente após a colonização do novo continente.

No Brasil, os primeiros eqüinos chegaram com as introduções nas capitanias hereditárias com Martín Afonso de Souza, em 1534, na capitania de São Vicente, com animais da ilha da Madeira, Duarte Coelho, em 1535, na capitania de Pernambuco e Tomé de Souza, em 1549, na capitania da Bahia, com animais trazidos de Cabo Verde (TORRES & JARDIM, 1977), não existindo até então nenhuma espécie de eqüídeo no continente brasileiro.

A princípio, devido ao reduzido desenvolvimento na produção de éguas e cavalos na costa de Brasil, o que mantinha seus preços internos muito altos, os eqüinos existentes nas capitanias provinham, em geral, de Cabo Verde

(GÂNDAVO, 1826). De acordo com Cardim (2000), os resultados positivos obtidos posteriormente com a cria cavalar em terras brasileiras propiciaram inclusive a exportação de cavalos à Angola. O desenvolvimento do gado bovino, cavalar e lanar foi impressionante desde o México setentrional até o Pampa argentino. Sua multiplicação e expansão se deram devido, em grande parte, aos animais abandonados ou perdidos (que logo foram denominados segundo cada região), cuja progressiva adaptação ao meio os tornava cada vez mais resistentes e ágeis pela seleção natural (VIVES, 1977).

Dos vários tipos de animais domésticos que se introduziram no Brasil, os cavalos tiveram um desenvolvimento muito grande na Bahia, e desde 1580 já existia um comércio muito expressivo de cavalos da Bahia a Pernambuco. No sertão o cavalo se converteu em um meio de vida sendo utilizado também, embora raramente, nos engenhos de açúcar (BETHELL, 1990).

A importação dos eqüinos para a ilha de Marajó data de 300 anos, quando os primeiros lotes de cavalos foram trazidos de Cabo Verde, por volta de 1702, por colonizadores portugueses. Depois ocorreu uma grande miscigenação entre os cavalos das raças Árabe, Alter e outras raças da Península Ibérica, originando a raça Marajoara (MARQUES *et al.*, 2001).

2.2-Os cavalos da Península Ibérica

Segundo relatos de Sereno (2002) apud Castejón (1953), a população hípica da Península Ibérica é constituída de três grandes tipos cavалares: o pequeno cavalo Cantábrico que atualmente povoa densamente todo o norte peninsular adaptado à vida de monte ou cordilheira, pertencente ao genótipo

Equus gracilis Ewart.; o cavalo Castellano semelhante genotipicamente a Tarpán que produziu os atuais cavalos indígenas com genótipo *Equus gmelini* Antonius; e o cavalo Andaluz ou Andaluz-levantino com origem africana e com relação filogenética com o *Equus przewalsky*.

Desde os tempos mais remotos existiram na Península Ibérica três tipos de cavalos: um pônei de perfil reto ou côncavo, de pequena estatura que normalmente não se monta e outro que pode ser encontrado em zonas frias e de montanha e um cavalo maior, de perfil convexo que pode ser montado e se encontra nas planícies secas e quentes do sudoeste, considerado o mais antigo cavalo de sela do mundo (LOCH, 1986).

Esse mesmo autor, citado por Sereno (2002), relata que os cavalos Ibéricos também chamados Andaluz, Espanhol, Cartujano, Lusitano, Português, Alter, Real e Peninsular, pertencem à mesma raça e os distintos nomes surgiram principalmente em função da região geográfica em que eram criados. O cavalo Lusitano, no passado era idêntico ao Espanhol-Andaluz, ambo, possuindo, ambos, a mesma genética e evolução. As diferenças que existem na atualidade entre as duas raças são resultado dos cruzamentos seletivos ocorrido em ambas. A associação de Criadores do Cavalo Espanhol implantou em 1912 o livro genealógico da raça, chamada atualmente Pura Raça Espanhola (PRE).

Segundo Interagro (1992) o livro genealógico do cavalo Lusitano Português foi oficialmente introduzido em 1967 pela Associação Portuguesa de Criadores do Cavalo Lusitano.

Em princípios do século XVI, a maior parte dos estados europeus apresentava fronteiras bem definidas e, na Península Ibérica daquela época, se

utilizava o cavalo e o asno no transporte de mercadorias e pessoas. A quantidade de carroças indicava quando se tratava de viagens de grandes senhores ou de gente comum. O cavalo também era imprescindível para a guerra como arma de cavalaria e as carretas puxadas por cavalos serviam de transporte nos exércitos, assim podiam alcançar preços muito altos (ÁLVAREZ, 1996).

Na Península Ibérica havia intensas relações mercantis e segundo Aguiar (1880) os dados da balança comercial de 1874, entre Espanha e Portugal, já mostravam um grande número de mercadorias importadas e exportadas, observando-se fluxo de compra de animais de origem cavalar, muar, bovina, caprina e suína.

A diferenciação entre o cavalo lusitano e o espanhol começou no início do século XVII com a introdução do torei com cavalo na Espanha, o que forçou a introdução de um novo processo de seleção na cria de eqüinos com enfoque na seleção de um cavalo de esporte e exuberante nos movimentos. (INTERAGRO, 1992).

2.3-O cavalo marajoara e o mini cavalo puruca

O cavalo Marajoara foi introduzido, inicialmente, em Belém-Pará. Porém, em virtude da alta prolificidade, juntamente com os bovinos, devastadores das rocinhas de Belém, tornou-se necessária à trasladação desses animais para a ilha Grande Joanes, atualmente Marajó.

Segundo relatos históricos, os primeiros cavalos introduzidos no Marajó são de procedência lusitana. Após a sua introdução, foram submetidos às mais adversas condições de um ecossistema totalmente diferente do seu continente de

origem (TEIXEIRA, 1995). Segundo este mesmo autor, foi nessa região de grande adversidade do ecossistema, porém, compensado pela ocorrência de farta variedade de pastagens nativas, que o cavalo Marajoara, originário do cruzamento de várias raças, desenvolveu características bem definidas, como a rusticidade, força, resistência, adaptação ao meio e ao trabalho no campo.

O rebanho cavalar marajoara adquiriu uma aclimação completa, vencendo obstáculos e tirando proveito do ecossistema da região, chegando a possuir, há cerca de 150 anos uma população estimada em um milhão de cabeças. O aumento demasiado da população de cavalares, devorando as pastagens, que não mais cresciam o suficiente para o uso dos bovinos, fez com que se procedessem abates de éguas, das quais aproveitavam-se as peles e as crinas. Assim, somando o sacrifício das matanças deliberadas à devastação causada pela epizootia, a população eqüídea do Marajó sofreu uma redução considerável (TEIXEIRA, 1995). O efetivo atual está em torno de 150.000 cabeças, a grande maioria mestiçada com outras raças (MARQUES *et al.*, 2001).

De acordo com relatos dos fundadores da Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Marajoara - ABCCRM, fundada em 1979, dada a importância desses animais, quando o exército precisou de cavalos para sela, fundou um núcleo de reprodução em Soure-PA e outro em Cachoeira do Arari-PA, introduzindo uma estação de monta, trazendo cavalo Árabe e Anglo-árabe para cruzamentos.

Pode-se inferir, portanto, que o cavalo Marajoara é o resultado do cruzamentos entre as raças Árabe e Anglo-Árabe, desenvolvendo, ao longo dos anos, um ecotipo próprio que culminou com o estabelecimento de um padrão

racial específico. No entanto, as características atuais, demonstram que o cavalo Marajoara está em processo de descaracterização, principalmente pelos cruzamentos indiscriminados que ocorreram com outras raças como Mangalarga, Quarto de Milha, e outras, alterando o padrão do cavalo Marajoara.

Atualmente, não há muitos machos e fêmeas padronizados dentro das características do cavalo Marajoara original, conforme o padrão estabelecido pela ABCCRM.

Pelas aptidões desenvolvidas, como grande resistência, velocidade a galopes curtos, rusticidade e versatilidade, o Marajoara mesmo com o advento das máquinas, ainda é indispensável para suprir as necessidades de tração (de carroças) de trabalhos rotineiros das fazendas regionais, com baixo custo operacional, revelando condições de suportar intensos trabalhos. O cavalo Marajoara é de fundamental importância para a pecuária, no manejo quase sempre extensivo de bubalinos e bovinos. Apresenta também um comportamento enérgico, vivo, ativo e dócil, com perfil adequado para novas atividades como turismo.

Por sua vez, o mini-cavalo Puruca é o resultado de cruzamentos do cavalo Marajoara com pôneis da raça “Shetland”, de origem inglesa, vindos da França na penúltima década do século XIX. Esse animal desenvolveu, também, adaptação ao ambiente adverso, fixando características de força e rusticidade, tornando-se indispensável nas atividades pecuárias do arquipélago. Desses cruzamentos foram selecionados animais, cuja principal característica era a altura padrão de, no máximo, 1,18 m (TEIXEIRA, 1995), formando-se, desse modo, um plantel considerável que levou à formação de uma Associação própria.

Segundo a Associação Brasileira dos Criadores de Puruca-ABCP, fundada em 1986, a raça Puruca possui características morfológicas que o diferenciam de outros eqüinos. Apresenta temperamento enérgico, vivo, ativo e dócil, com o andamento na forma de trote.

3.1- Padrão da raça Marajoara

O padrão da raça do cavalo Marajoara (Figura 01), segundo a ABCCRM, ainda é provisório, e leva em consideração: aparência geral, cabeça e pescoço, tronco, membros, andamento e defeitos desclassificantes.



Figura 1 - Reprodutor da raça Marajoara. Fonte: jrfmarques, 2006.

a) Aparência geral:

Pelagem: Qualquer pelagem, exceto Pampa e Albina;

Altura: Mínima de 1,35 m e máxima de 1,56 m para os machos e mínima de 1,30 m e máxima de 1,50 m para as fêmeas;

Forma: Porte médio bem proporcionado e musculatura definida;

Constituição: Forte;

Temperamento: Enérgico, vivo e ativo;

Aptidão: Cavalo de serviço.

b) Cabeça e Pescoço:

Cabeça: Harmônica em relação ao pescoço de tamanho moderado;

Perfil: Sub-convexo, com tendência ao retilíneo;

Olhos: Vivos e expressivos;

Orelhas: Proporcionais, medianas e bem implantadas;

Lábios: Móveis, finos, firmes e justapostos;

Narinas: Grandes e flexíveis;

Pescoço: Comprimento médio, inserção bem definida.

c) Tronco:

Cernelha: Bem definida e bem implantada;

Peito: Profundo e amplo;

Costelas: Arqueadas, conferindo boa amplitude torácica;

Tórax: Amplo e profundo;

Dorso: Curto proporcional;

Garupa: Harmoniosamente inserida na região lombar e suavemente inclinada, de comprimento médio e de altura superior a cernelha;

Ancas: Suavemente inclinada;

Cauda: De boa inserção, bem implantada e dirigida;

Órgãos genitais: Externos, bem conformados.

d) Membros:

Espádua: Bem pronunciada e oblíquas;

Braços: Médios e de boa cobertura muscular;

Antebraço: De comprimento médio e musculoso;

Joelhos: Retos e bem suportados;

Coxas: Musculosas;

Jarretes: Secos e lisos;

Canelas: Secas;

Boleto: Definido e bem suportado;

Quartelas: Médias e fortes;

Cascos: Médios, arredondados, de preferência pretos.

e) Andamento:

Trote em todas as modalidades, andamento com apoio, bipedal diagonalizado

f) Defeitos desclassificantes:

Perfil: Excessivamente convexilíneo;

Pelagem: Albina e Pampa;

Orelhas: Mal implantadas ou mal dirigidas;

Lábios: Com relaxamento, caídos;

Andamento: Qualquer outro que não seja o trote em todas as modalidades.

2.3.2-Padrão da raça Puruca.

O padrão desta raça estabelecido pela ABCP (Figura 2) ainda é provisório, dividido em aparência geral, cabeça e pescoço, tronco, membros, andamento, defeitos permissíveis e desclassificantes.

a) Aparência geral:

Pelagem: Qualquer pelagem exceto albina e pampa;

Altura: Entre 1,10 m e 1,18 m para os machos e entre 1,00 m e 1,16 m para as fêmeas;

Forma: Porte pequeno, bem proporcionado e com musculatura bem definida, principalmente a espádua;

Constituição: Forte;

Temperamento: Enérgico, vivo, ativo e dócil;

Aptidão: Serviço e passeio;

Andamento: Trote.

b) Cabeça e Pescoço:

Cabeça: Harmônica em relação ao pescoço, tamanho moderado, larga, aparência seca e bem implantada;

Perfil: Convexilíneo com tendência ao retilíneo;

Olhos: Grandes, vivos e expressivos;

Orelhas: Tamanho proporcional, pequenas à medianas e bem implantadas;

Lábios: Móveis, finos, firmes e justapostos;

Pescoço: Comprimento mediano, musculoso, bem inserido, piramidal e na base superior arredondada;

Crina: Abundante e larga.

c) Tronco:

Cernelha: Baixa, bem implantada, com altura não superior a da garupa;

Peito: Profundo e largo;

Costelas: Arqueadas, proporcionando boa amplitude torácica;

Tórax: Largo e profundo;

Dorso-lombo: Firme, curto, proporcional e bem sustentado;

Garupa: Longa, larga sem proeminência no sacro, boa cobertura muscular, harmoniosamente inserida na região lombar, suavemente inclinada e de altura inferior a cernelha;

Ancas: Suavemente inclinadas;

Cauda: De inserção baixa, bem inserida e dirigida, larga na sua base, com pêlos abundantes;

Órgãos genitais: Bem definidos e bem conformados.

d) Membros:

Espáduas: Bem pronunciadas, fortes, musculosas e oblíquas;

Braços: Pequenos, bem articulados e de boa cobertura muscular;

Antebraços: Pequenos e musculosos;

Coxas: Musculosas;

Jarretes: Secos e lisos;

Canelas: Secas, retas descarnadas, com tendões fortes;

Boletos: Definidos e bem articulados;

Quartelas: Pequenas e bem suportadas;

Cascos: Pequenos, arredondados, sólidos, fortes, não encastelados e de preferência escuros.

e) Andamentos:

Trote em todas as suas modalidades, andamento com apoio bipedal diagonalizado.

f) Defeitos permissíveis:

Cascos: Rajados ou brancos;

Cernelhas: Altura levemente superior a altura da garupa;

Garupa: Altura levemente superior a altura da cernelha.

g) Defeitos desclassificantes:

Temperamento: Vícios considerados graves e transmissíveis;

Orelhas: Mal dirigidas (acabanadas);

Perfil: Excessivamente convexilíneo;

Lábios: Com relaxamento de suas comissuras (belfo);

Dorso- lombo: Concavilíneo (lordose, selado), convexilíneo (cifose, dorso de carpa) e de desvio lateral da coluna (escoliose);

Garupa: Demasiadamente inclinada (derreada, caída), mais alta do que a altura da cernelha, tolerando uma diferença de até 2,0 cm nas fêmeas;

Membros: Taras ósseas congênicas ou hereditárias e de defeitos graves de aprumo;

Aparelho genital: Anorquidia (roncolho), criptorquidia (1 ou 2 testículos retidos na cavidade abdominal), anomalias congênicas do sistema genital;

Pelagem: Albina ou pampa;

Altura: Acima ou abaixo do limite permitido.



Figura 2 - Mini cavalo da raça Puruca. Fonte: jrfmarques, 2006.

2.4- A ilha de Marajó

Situa-se na foz do rio Amazonas, no Estado do Pará, e é considerada a maior ilha flúvio-marinha do mundo, sendo um dos principais pólos ecoturísticos da Amazônia. Possui área de, aproximadamente, 49.000 km², apresentando dois tipos fisiográficos, sendo o lado Oriental, predominante de terras altas de vegetações que não sofrem com as inundações, e a parte Ocidental, com terras baixas, predominando os campos naturais, sujeitas à inundações (Figura 3). Apresenta, ainda, estações climáticas bem definidas, um período seco e outro chuvoso (MIRANDA NETO, 1976; SOUZA *et al.*, 1998).

As chuvas, nessa região, concentram-se entre fevereiro e maio, ocasionando uma cheia, que inunda aproximadamente 2/3 da superfície da ilha, fenômeno esse agravado por não haver escoamento para as águas. Quando há

prolongamento da estiagem, entre os meses de agosto a dezembro, os lagos e rios secam, os campos ficam estorricados, o clima fica mais ameno, pois a ilha está próxima ao mar aberto (MIRANDA NETO, 1993).

A água do rio é geralmente barrenta, o que dá um aspecto peculiar às suas margens. Juntam-se a isso inúmeros outros recursos naturais que colocam o Marajó numa condição privilegiada no contexto do turismo ecológico. Seus rios, praias, furos, igarapés, fazendas, fauna e flora diversificadas são os principais atrativos, assim como o folclore, a gastronomia, o artesanato, a música e os costumes encontrados em todos os seus dezesseis municípios.

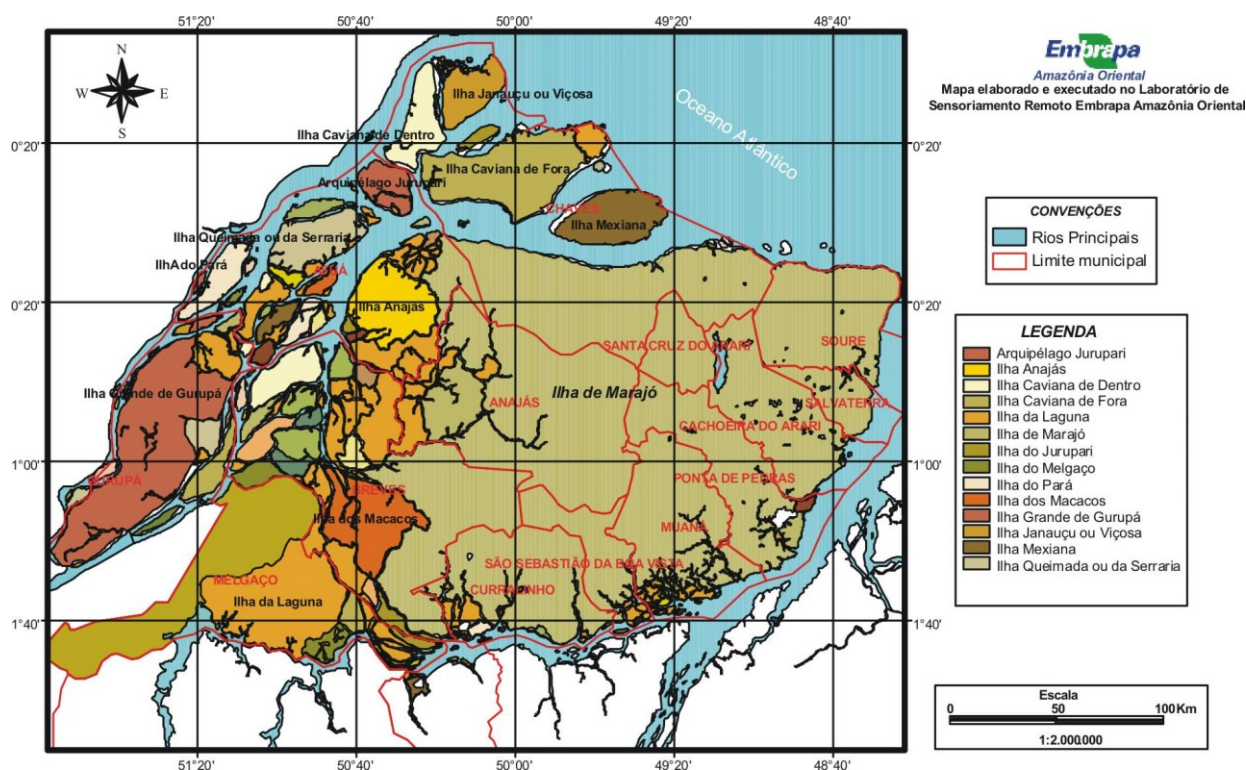


Figura 3 - Mapa ilustrativo do Arquipélago de Marajó. Fonte: IBGE.

2.5 - Conservação de recursos genéticos

“Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO,1998), para planificar uma estratégia de conservação e caracterização é necessário definir, registrar e avaliar os recursos genéticos que estejam em risco de extinção e/ou descaracterização. É necessário, portanto, uma descrição e caracterização completa dos mesmos propondo quatro níveis de atuação: a elaboração de um inventário nacional dos recursos genéticos animais, o controle destes recursos pelo Estado, um maior conhecimento genético e econômico das qualidades das raças com objetivo de desenvolver estratégias que façam um melhor uso destas características a curto e longo prazo e uma descrição molecular comparativa mediante marcadores moleculares para estabelecer que raças possuem uma diversidade genética significativa para dirigir

melhor as ações de conservação”

2.6 - Estratégias de conservação da variação genética

Segundo Egito *et al.* (1999), a caracterização genética surge como alternativa para a quantificação da diversidade genética e como auxiliar nos programas de conservação de recursos genéticos. A diversidade genética em animais domésticos é tipicamente distinta em dois componentes: diferenças genéticas entre raças e diferenças genéticas entre indivíduos dentro de uma raça.

A sobrevivência de uma espécie depende da variabilidade genética existente em suas populações e, por meio da caracterização genética, é possível avaliar o grau de diversidade e de variabilidade dentro e entre raças, permitindo a inclusão dos animais em programas de melhoramento e de conservação genética de forma orientada, ou seja, introduzindo animais com altos índices de variabilidade genética (SILVA, 2006).

Martinez (2001) cita que para evitar consangüinidade e minimizar a deriva em populações submetidas a esquemas de seleção, as associações de criadores devem prestar atenção ao número de animais fundadores, à relação entre eles, ao esquema de cruzamentos e ao número efetivo de reprodutores em cada geração. Uma população efetiva grande é uma garantia para a conservação da variação genética.

A variabilidade entre populações, seja entre raças ou espécies, se pode estimar usando ferramentas matemáticas que traduzem as diferenças em medidas de distâncias entre duas populações. Existem dois tipos de variabilidade: a fenotípica, que pode ser observada e medida diretamente, e a genética, que é

medida em estudos de variabilidade. A variabilidade fenotípica se mede mediante a distância fenotípica. O fenótipo é determinado pelo genótipo e pelo meio (e sua interação).

Van Hintum (1994) discute a eficácia de alguns caracteres fenotípicos (sobre tudo os caracteres quantitativos) como medidas para estimar a diversidade genética e sugere que as distâncias baseadas em caracteres quantitativos são mais indicativas da adaptação a fatores ambientais. Isto se comprova com um estudo no qual se encontrou que distâncias genéticas pequenas se associam com distâncias fenotípicas pequenas, mas grandes distâncias genéticas se associam com uma grande amplitude de distâncias fenotípicas, o que significa que duas populações distantes geneticamente não necessitam ser fenotipicamente diferentes (BURSTIN & CHARCOSSET, 1997).

Em outras palavras, duas raças podem mostrar as mesmas características fenotípicas sem estar muito relacionadas geneticamente, o que significa que as raças podem chegar a um fenótipo similar por diferentes rotas genéticas.

A maior parte das informações geradas se refere à diversidade genética neutra ou simplesmente diversidade genética. O campo da diversidade fenotípica ou expressa é novo e ainda que se tenha feito alguns intentos para quantificar esta diversidade, mediante análises de componentes principais (MORRISON, 1967), se necessita seguir investigando neste campo.

A FAO (1998) define a biodiversidade como a variabilidade genética dos diferentes tipos de recursos genéticos animais em nível de espécies, populações, raças e genes, que se deve conservar tantos alelos ou variantes quanto seja possível (SMITH,1984; HENSON, 1992; CROSSA *et al.*, 1993).

A variabilidade genética é um parâmetro extremamente importante para a conservação dos recursos genéticos, sendo uma característica que permite a adaptação animal às mudanças ambientais. O conhecimento da diversidade genética intra e inter-raciais poderá ajudar a evitar a erosão genética, assim como, a extinção de raças (GAMA, 2004).

Nos últimos anos, existe uma grande preocupação em conservar os recursos genéticos locais, com esforços aplicados na manutenção da diversidade genética dos animais por várias organizações em diversos países do mundo (EGITO *et al.* 2002).

Segundo Ruane (1999), muitas raças atuais têm origem recente e sua história genética é freqüentemente descrita na literatura e essa informação pode ser útil para identificar raças geneticamente divergentes dentro da mesma espécie. Quando essa documentação é limitada, a genética da raça pode ser estimada através de estudos de distância genética.

2.7 - Polimorfismos de DNA

O genoma dos mamíferos é constituído por aproximadamente 3×10^9 pares de bases (pb) distribuídos em um número de cromossomos característico de cada espécie. O genoma contém toda a informação necessária para o desenvolvimento e funcionamento correto do organismo.

O advento da tecnologia do DNA recombinante proporcionou uma nova via para a identificação de novos marcadores genéticos mediante a análise direta da molécula de DNA. As duas cópias de um gene presentes no par de cromossomos homólogos podem diferir em sua seqüência de DNA e estes dois alelos podem ou

não codificar dois produtos funcionalmente diferentes, dependendo da natureza exata da mudança produzida na sequência do DNA. Em uma população pode estar presente um determinado número de alelos que diferem uns dos outros na sequência de DNA. Os marcadores genéticos são *loci* que apresentam características detectáveis que podem diferir entre indivíduos. Se aceita que são sinônimos de variação nas sequências do DNA e que esta pode ser revelada mediante diferentes técnicas.

Os marcadores genéticos moleculares apresentam algumas vantagens sobre os marcadores bioquímicos e os imunogenéticos. Com a existência de tecnologias modernas relativamente fáceis de realizar e de interpretar, a elevada heterozigosidade que apresentam e podem ser estudados a partir de amostras pequenas de DNA extraído de qualquer tecido, provenientes de animais de qualquer idade e pode ser conservado indefinidamente (MARTINEZ, 2001).

Os polimorfismos de DNA podem ser classificados segundo sua própria natureza e o sistema de detecção. Assim, dentre outros, se pode distinguir:

2.7.1 - DNA repetitivo

Cerca de 50-60% do DNA dos mamíferos está constituído por DNA não-repetitivo (LODISH *et al.*, 1999).

A fração de DNA repetitivo é composta de sequências de DNA presentes em mais de uma cópia no genoma, podendo ser dividido em DNA moderadamente repetido e DNA altamente repetitivo, de acordo com a frequência de repetição. Geralmente, as sequências repetidas em tandem são divididas em duas categorias: minissatélites e os microssatélites.

Nos organismos eucariotos existe uma disparidade entre a quantidade total de DNA e a que teoricamente seria necessária para seu funcionamento celular. Estima-se que mais de 90% do DNA não têm função codificadora (GALL, 1981). Uma parte do DNA repetitivo corresponde a seqüências que se acumulam na célula e aproveitam a maquinaria celular para sua integração e sua replicação (BULL *et al.*, 1992, HURST *et al.*, 1992).

O grau de repetição, o tamanho da unidade repetitiva e o padrão de distribuição das seqüências repetitivas no genoma são os principais critérios de classificação do DNA repetitivo. O polimorfismo das seqüências repetidas em tandem consiste na existência de um número variável de repetições em tandem de uma seqüência básica que oscila entre um só nucleotídeo e dois quilobases. Detecta-se mediante eletroforese. Destacam-se duas categorias: minissatélites (JEFFREYS *et al.*, 1985) ou VNTR's (NAKAMURA *et al.*, 1987) e polimorfismos de longitude de seqüência simples ou microsatélites (TAUTZ, 1989).

Microsatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) ou STRs (*short tandem repeats*) são trechos do genoma compostos pela repetição de uma seqüência curta e simples de nucleotídeos, seqüência essa que pode ser di, tri ou tetra de nucleotídeos (TAUTZ *et al.*, 1986; WEBER & MAY, 1989). A maioria dos microsatélites encontrados nas numerosas espécies são dinucleotídeos (WANG *et al.*, 1996). As repetições (CA)_n são as mais estudadas até agora, já que são as mais abundantes no genoma dos mamíferos. Em todos os genomas eucarióticos analisados observou-se pouca presença ou total ausência, de repetições tipo (CG)_n e a média desta seqüência representa somente 0,2% de todas as repetições (TAUTZ, 1986).

Têm uma característica que as unidades que se repetem são pequenas (1 a 6 nucleotídeos) e são facilmente detectáveis pela Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (TAUTZ, 1989; WEBER & MAY 1989; FRIES *et al.*, 1990). Encontram-se distribuídos ao acaso por todo o genoma, são muito abundantes e fáceis de identificar.

Nos indivíduos eucariotos pode-se encontrar uma sequência microssatélites a cada 10.000 pb aproximadamente, possivelmente, estão distribuídos uniformemente nos cromossomos (TAUTZ, 1989). Embora pouco observado nas regiões teloméricas e centroméricas, tanto no homem (STALLING *et al.*, 1991) como em animais domésticos (WINTER *et al.*, 1992).

Os microssatélites, de acordo com a sua estrutura, podem ser de três tipos: perfeitos, que contém unicamente uma unidade repetida n vezes, imperfeitos, que contém uma sequência não-repetitiva intercalada entre as repetições, e compostos, que estão constituídos por dois ou mais segmentos repetitivos diferentes (WEBER, 1990).

Quanto à função dos microssatélites, existem algumas hipóteses: uma delas é que podem ter uma função de manutenção da estrutura dos cromossomos, principalmente pela capacidade que têm algumas sequências tipo $(CA)_n$ de tomar uma conformação Z-DNA (NORDHEIM & RISSE, 1983) e, embora a função deste DNA não seja conhecida completamente, acredita-se que poderia facilitar o empacotamento do DNA durante a condensação cromossômica na meiose (GROSS & GARRAD, 1986). Pode ser que esteja associado com a regulação gênica, tanto com um incremento na velocidade da transcrição de um gene (HAMADA, *et al.*, 1984). Também pode estar relacionado com pontos de

altas frequências de recombinação (“*hot spots*”) (SLIGHTTON *et al.*, 1980; MURPHY & STRINGER, 1986). Por outro lado, é possível que os microsatélites não tenham uma função comum, mas, sim um mecanismo comum de evolução (TAUTZ, 1989).

A incorporação em 1985 da técnica de PCR (MULLIS *et al.*, 1986) possibilitou o descobrimento do polimorfismo dos microsatélites (TAUTZ, 1989; LITT & LUTTY, 1989). A alta frequência e alta taxa de mutação a que estão sujeitos, resultando em grande variabilidade, são algumas das características que favorecem o uso de microsatélites como marcadores de DNA (MÜHLEN, 1999).

O primeiro trabalho publicado em que estas seqüências foram denominadas microsatélites foi feito em humanos (LITT & LUTTY, 1989). As principais características dos microsatélites como marcadores de DNA são: alta frequência, ampla dispersão pelo genoma, alta taxa de mutação resultando em grande variabilidade, co-dominância e segregação mendeliana.

Para amplificar um microsatélite utiliza-se um par de *primers*, que são seqüências únicas de oligonucleotídeos, homólogas às regiões flangeadoras dos microsatélites (Litt & Luty, 1989). Assim, é possível obter uma amplificação específica da região que contém a seqüência repetida. O polimorfismo entre bandas será decorrente do número de repetições. Cada segmento diferente de DNA representa um alelo daquele *locus* específico (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996).

Os microsatélites são altamente polimórficos, de fácil identificação, de *loci* únicos, de ampla distribuição no genoma, factíveis de automação e apresentando taxa de mutação adequada para serem utilizados como marcadores genéticos.

Este tipo de marcador tem sido amplamente utilizado em estudos intensivos de mapeamento nas espécies domésticas de animais (HETZEL, 1993; BARKER, 1994), incluindo os mapas de ligação da maioria dos mamíferos, provas de identificação individual, controle de paternidade e para a caracterização de populações.

São co-dominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados no gel, bem como, multi-alélicos e suficientemente estáveis para serem utilizados em análises genéticas, sendo ideais para aplicação em genética de populações e evolução em populações naturais (SLATKIN, 1995).

Os microssatélites também podem oferecer uma discriminação de alta resolução entre populações relacionadas dentro de uma mesma espécie (BARKER, 1994) ou para diferentes espécies animais (MOORE *et al.*, 1991; HETZEL, 1993). Os mais comumente identificados são as repetições CA e TG, porém outros tipos de microssatélites também têm sido descobertos incluindo, tri e tetranucleotídeos que são utilizados em alguns estudos do genoma eqüino (SHIUE *et al.*, 1999).

2.8-Técnicas para uso de microssatélites

2.8.1-Extração de ácidos nucléicos

Existem, na literatura, inúmeros protocolos para extração de DNA que variam em função do material biológico disponível e da utilização futura do DNA obtido. Atualmente a extração de DNA a partir dos diferentes tecidos não apresenta grandes dificuldades.

Os protocolos de extração de DNA clássicos tendem a ser mais

trabalhosos, o que é compensado por se obter um material de grande qualidade e alto peso molecular, útil a análise da biologia molecular. A escolha do protocolo a ser utilizado depende do material disponível e as possibilidades de desenvolver a técnica escolhida. Geralmente, os protocolos apresentam duas partes, na primeira é realizado o lise das células e solubilização do DNA e na segunda por métodos enzimáticos e/ou químicos, elimina-se as proteínas, o RNA e outras macromoléculas. Esses protocolos apresentam muitas vantagens, dentre elas a eficácia com a obtenção de grandes quantidades de DNA de alto peso molecular a partir de pequenas amostras de tecido fresco ou congelado, assim como, a possibilidade de manter conservado durante muito tempo o material obtido.

Inicialmente, foram desenvolvidos diversos métodos de extração de DNA submetendo amostras de tecidos a uma digestão com proteinase K em presença de SDS (Dodecil sulfato de sódio) e EDTA (Etilenodiamina tetra acetato de sódio), várias extrações com fenol e clorofórmio e finalmente precipitação alcoólica em presença de sais (BLIN e STAFFORD, 1976; MANIATIS *et al.*, 1982; DAVID *et al.*, 1986). A partir daí, foram surgindo novos protocolos buscando reduzir o risco do manipulador, o tempo para obter o DNA purificado e principalmente, os custos. Assim, foram desenvolvidas várias técnicas (BOWTELL, 1987; JEANPIERRE, 1987; CIULLA *et al.*, 1988; MILLER *et al.*, 1988; GROBET *et al.*, 1991).

Para utilizar o DNA obtido exclusivamente para amplificar mediante a PCR, as exigências de purificação diminuem enormemente, havendo estratégias relativamente simples para preparar as amostras.

Kawasaki (1990) desenvolveu um método que consiste em digerir uma amostra de poucos microlitros de sangue com proteinase K e empregar

diretamente o produto à digestão na PCR.

Classicamente as amplificações mediante PCR são realizadas a partir de DNA purificado, no entanto em determinadas circunstâncias a extração desse DNA pode não ser possível por não se dispor de uma fonte de qualidade suficiente, como ossos antigos, pêlo, manchas de sangue, saliva, etc. Por outro lado, existe por parte dos pesquisadores, uma grande inquietude por simplificar a técnica e adequá-la para realizar amplificações a partir de material biológico diretamente no sentido de reduzir o trabalho de isolar o DNA das amostras, sendo isto extremamente importante, sobretudo, em laboratórios que processam muitas amostras por dia

2.8.2-A técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR)

A partir da década de 80, a descrição da técnica revolucionária concebida por Kary Mullis, denominada reação em cadeia da polimerase – PCR (Polymerase Chain Reaction) facilitou o entendimento dos processos biológicos, assim como, a aplicação em diagnósticos e em melhoramento genético de plantas e animais domésticos. A técnica de PCR tem sido utilizada com os mais diferentes propósitos que vão desde a identificação de indivíduos a partir de restos mortais em guerra, análise de DNA pré-histórico, diagnóstico de doenças, auxílio em investigações policiais, caracterização genética de populações e determinação de paternidade, dentre outras aplicações

A PCR é uma técnica rápida e versátil que envolve a síntese enzimática “in vitro” de milhões de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase . A reação de PCR se baseia no pareamento e extensão

enzimática de um par de oligonucleotídeos (17-25 pares de bases) utilizados como iniciadores (*primers*) que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que flanqueiam a região alvo.

A reação envolve ciclos seqüenciais completos compreendendo três etapas básicas: a) Desnaturação – Compreende a dissociação das ligações que mantém unida a dupla fita de DNA. Obtida tipicamente pela elevação para temperaturas entre 93-95°C; b) Pareamento – Ligação das seqüências iniciadoras com a seqüência alvo. Neste passo normalmente a temperatura é reduzida para 50-65°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência dos iniciadores utilizados, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo; c) Síntese do DNA – A partir dos iniciadores já ligados a seqüência alvo, começa a síntese de uma nova seqüência complementar. As temperaturas que conferem maior eficiência nessa etapa estão entre 70-75°C. Geralmente, 30 a 35 ciclos são suficientes para produzir de 100 ng a 1µg de DNA a partir de uma cópia simples de DNA molde.

2.8.3-Amplificação das seqüências de microssatélites

As concentrações de DNA molde e polimerase podem afetar a eficiência de amplificação. Quantidades elevadas de DNA podem inibir a reação por si mesmo ou até por possíveis substâncias que podem ser arrastadas ao final da purificação. Por outro lado, quantidades reduzidas podem fazer com que uma só copia possa ser amplificada. A concentração da polimerase varia de 0,50 a 2U

para uma reação de 50 µl. Uma concentração baixa limitará a quantidade de produtos obtidos e uma alta produzirá amplificações inespecíficas (SAIKI *et al.*, 1989).

A composição do tampão de reação é a seguinte: Tris HCL 75 mM (pH 9,0), MgCl₂ 2mM, KCl 50mM, (NH₄)₂SO₄ 20mM. As concentrações de íons de magnésio afetam a reação de tal forma que em quantidades baixas reduzem drasticamente o rendimento desta e quantidades altas diminuem a especificidade da amplificação. A concentração ótima de MgCl₂ varia entre 0,5 e 10 mM. Os desoxinucleosídeos (dNTPs) captam íons de magnésio, portanto, qualquer ajuste em sua concentração na reação requerem uma compensação na concentração de MgCl₂. Para os dNTPs, usam-se normalmente concentrações variando entre 50-200 µM de cada um deles. Concentrações mais elevadas facilitam que a polimerase possa cometer erros (INNIS *et al.*, 1988).

As análises de seqüências de DNA específicas tornaram-se mais rápidas e eficazes com o advento da PCR. A maioria dos protocolos de PCR estão desenvolvidos para amplificar um seqüência molde com um par de iniciadores. No entanto, muitos estudos experimentais requerem a análise de várias seqüências de DNA e é necessário realizar sucessivas reações da mesma amostra. Assim, com a PCR multiplex realiza-se a amplificação de várias seqüências simultaneamente em uma só reação, desta forma, reduz o tempo, trabalho e custos (CHAMBERLAIN *et al.*, 1988; CHAMBERLAIN *et al.*, 1989).

Um fator importante na produção de produtos de PCR é a escolha correta dos iniciadores ou *primers* que devem estar enfocados na especificidade e eficiência da amplificação, utilizando-se iniciadores com mínima longitude e

evitando que os oligonucleotídeos sejam complementários uns com outros (RYCHLIK *et al.*, 1990). Com a PCR multiplex, aumenta a probabilidade de obter produtos de amplificação inespecíficos. Este problema pode ser evitado substituindo qualquer iniciador que gere produtos indesejáveis.

A otimização de uma PCR multiplex requer provar distintas condições de reação. Os iniciadores devem ter temperaturas de anelamento similares e devem amplificar fragmentos por suas diferenças de tamanho. Deve-se procurar ajustar as concentrações de iniciadores, o tampão, a enzima, assim como, o tempo das distintas etapas da PCR até conseguir uma boa amplificação e ausência de produtos inespecíficos.

A eletroforese em gel é a técnica mais utilizada para detecção de variantes de microssatélites. Para localizar as bandas de migração do DNA nos geles, classicamente, revelam-se os mesmos em soluções de brometo de etídio ou mediante a impressão de placas radiográficas pela emissão de isótopos radioativos (WEBER, 1990; MOORE *et al.*, 1991). Pode-se usar tintura de prata como método alternativo pela sua simplicidade e segurança (HEUKESHOVEN & DERNICK, 1985; BUDOWLE, 1991). A partir daí, começa a realizar-se algumas técnicas radioativas com marcadores fluorocromos em distintos tipos de trabalhos com estudos de paternidade (BATES *et al.*, 1996) e em genética de populações (MOAZAMI-GOUDARZI *et al.*, 1994).

A detecção das bandas pode ser feita também com iniciadores marcados com substâncias fluorescentes, emissores de raio laser e fotodetectores de fluorescência, apresentando uma grande vantagem quando comparados com os outros métodos, pois as amostras são detectadas em tempo real e mediante

programas de densitometria, determinando o tamanho de cada banda de forma praticamente automática. A introdução desta técnica necessita de um seqüenciador automático.

Os seqüenciadores automáticos são sistemas capazes de determinar as seqüências, tamanhos de fragmentos, quantificando a fluorescência emitida por oligonucleotídeos ou dNTPs marcados com fluorocromos. Os marcadores emitem uma fluorescência quando se excitam com um laser, cada um deles tem seu máximo de emissão de fluorescência numa determinada faixa de comprimento de onda.

Para calcular o tamanho dos fragmentos de DNA desconhecido utiliza-se um padrão formado por fragmentos marcados com tamanhos conhecidos. As informações são transferidas a um computador para serem processadas e se apresentam em forma de eletroferograma, onde cada pico representa um fragmento. Os picos que aparecem têm uma determinada cor diferente dependendo do fluorocromo utilizado e possibilitam conhecer o tamanho dos pares de bases de cada pico, sua altura e sua área que serão reflexo da quantidade de cópias amplificadas.

Esta técnica apresenta algumas vantagens como: possibilidade de trabalhar em multiplex, maior automatização dos resultados pelo uso de software específicos para interpretar os eletroferogramas, maior sensibilidade nos resultados e menores quantidades de produtos amplificados.

3-OBJETIVOS

3.1-Geral

Caracterizar geneticamente a raça Marajoara, utilizando *loci* microssatélites, visando esclarecer a estrutura genética da população atual e especular sobre sua origem.

3.2-Específicos

Analisar a variabilidade genética intra- grupo, definindo a composição genética atual da raça Marajoara;

Efetuar comparações com outras raças através de medidas de distância genética e construção de árvores filogenéticas.

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Área experimental /animais

As amostras de sangue de cavalos das raças Marajoara (MJ) e Puruca (PU) foram obtidas de animais pertencentes ao Núcleo de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental - BAGAM - PA e em fazendas localizadas na ilha de Marajó- PA, nos municípios de Salvaterra e Soure. Primeiramente, foram selecionados animais das tropas de diferentes fazendas de criadores que possuíam animais registrados. A amostragem foi efetuada com animais o menos aparentados possível, conforme livro de registro da Associação Brasileira de

Criadores de Cavalos da Raça Marajoara-ABCCRM, nos principais rebanhos da ilha do Marajó. Foram amostrados 54 indivíduos da raça Marajoara (MJ) e 47 da raça Puruca (PU). Para a amostragem das raças Mangalarga (MG), Puro Sangue Inglês (PSIBR) e Árabe (EA) utilizou-se amostras de DNA pertencentes ao Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-DF, sendo utilizadas 30, 47 e 25 respectivamente.

Para os estudos comparativos com a raça Pantaneiro (PA) e Raças Puras Espanholas e Lusitanas se utilizou a base de dados do Laboratório de Genética Molecular que pertence ao Serviço de Cría Cabalar do Ministério da Defesa Espanhol, sendo utilizadas 63 de Pantaneiro (PA), 93 de Lusitano (LUS), 48 de Árabe (ARA), 39 de Asturcon (AST), 60 de Pura Raça Espanhola (ESP), 46 de Puro Sangue Inglês (ING), 59 de Losino (LOS), 30 de Mallorquina (MAL), 69 de Menorquina (MEN) e 27 de Potoka (POT).

4.2-Extração de DNA

Amostras de 10 ml de sangue foram coletadas em tubos de vacutainer com Etilenodiamina Tetra Acetato de Sódio- EDTA (anticoagulante). Após a colheita, as amostras foram mantidas em baixa temperatura numa caixa térmica com gelo, para conservação até serem levadas ao laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental (LABGEN), em Belém-PA.

O sangue foi mantido resfriado até o processamento e o DNA genômico foi extraído de acordo com um protocolo inorgânico pré-estabelecido descrito na Tabela 1. A metodologia utilizada para obtenção de DNA é simples, rápida e eficaz para uso em estudos de marcadores com PCR.

Após a extração, o DNA foi centrifugado e lavado com 1 ml de álcool etílico (etanol 70%) para remover sais, e colocado para secar à temperatura ambiente. O precipitado foi dissolvido em 20 ml de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA), contendo RNase (10 ml.ml⁻¹). As alíquotas foram armazenadas a -20°C.

Os DNAs extraídos foram submetidos à eletroforese horizontal e quantificados em gel de agarose a 1%. Foi utilizado 5 µl de DNA, acrescido de 2 µl de tampão de carregamento e 4 µl de água destilada autoclavada. A interpretação do gel foi baseada na intensidade das bandas dos DNAs de eqüinos comparadas com as intensidades das bandas do DNA íntegro de bacteriófago Lambda (50, 100 e 200 ng/ul). Após a quantificação, os DNAs foram diluídos a partir da amostra total com água destilada autoclavada para a concentração de 3 ng/µl. As alíquotas foram armazenadas a -20°C.

Tabela 1-Protocolo para a extração de DNA a partir de sangue.

Material:

TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH=8

Tampão 1: (10 X): 82,91 g de NH₄Cl; 10,01g de KHCO₃; 40 ml de EDTA 0,2 M pH 7,4.

Tampão 2: 10 ml de Tris-Hcl 1M pH 8,0; 23,38 g de NaCl 4M; 10 de EDTA 0,2 M pH 8,2

Amostra: 10 ml de sangue

Metodologia:

Inversão do tubo para obter uma solução homogênea

Centrifugar 10 minutos à 3.000 rpm

Pescagem e transferência do linfócito

Adicionar 15 ml de tampão1

Agitar em vórtex

Colocar em gelo por 30 minutos

Centrifugar 10 minutos à 3.000 rpm

Descartar o sobrenadante

Adicionar 10ml de tampão 1

Centrifugar 5 minutos à 3.000 rpm

Descartar o sobrenadante

Ressuspender o *pellet* em 5 ml de tampão 2

Agitar em vórtex

Adicionar 20 µl de Proteinase K

Adicionar 300 µl de SDS 10%

Incubar 37 ° C durante 30 minutos

Adicionar 1 ml de NaCl 5M

Agitar vigorosamente por 15 segundos

Centrifugar 10 minutos à 3.000 rpm

Transferir o sobrenadante

Centrifugar 10 minutos a 3000 rpm

Transferir o sobrenadante

Precipitar o DNA com álcool etílico

4.3- Microssatélites estudados

Foram utilizados vinte e dois microssatélites (Tabela 2) para a realização dos estudos de caracterização da raça Marajoara e comparação com as demais raças.

Tabela 2 - Microssatélites tipificados para a caracterização da raça Marajoara.

Locus	direto (5'-3') e reverso (5'-3')	(bp)	Referência
HTG4	CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC	127-141	Ellegren <i>et al.</i> , (1992)
AHT4	CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC AACCGCCTGAGCAAGGAAGT	138-170	Binns <i>et al.</i> , (1995)
HMS7	GCTCCCAGAGAGTTTACCCT CAGGAACTCATGTTGATACCATC	167-191	Guerín <i>et al.</i> , (1994)
ASB2	TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT CCTTCCTGTAGTTTAAGCTTCTG	222-256	Breen <i>et al.</i> (1997)
ASB17	CACAACTGAGTTCTCTGATAGG GAGGGCGGTACCTTTGTACC	89-131	Breen <i>et al.</i> , (1997)
HMS6	CACAACTGAGTTCTCTGATAGG GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG	153-171	Guerín <i>et al.</i> , (1994)
ASB23	CTCCATCTTGTGAAGTGTAAGTCA GCAAGGATGAAGAGGGCAGC	179-213	Lear <i>et al.</i> , (1999)
HTG10	CTGGTGGGTTAGATGAGAAGTC CAATTCCCGCCCCACCCCGGCA	89-115	Marklund <i>et al.</i> , (1994)
HMS3	TTTTTATTCTGATCTGTCACATTT CCAAGTCTTTGTACATAACAAGA	150-174	Guerín <i>et al.</i> , (1994)
LEX33	CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT TTTAATCAAAGGATTCAAGTTG	194-220	Shiue <i>et al.</i> (1999)
T287	TTTCTCTTCAGGTGTCCTC ATCAGAGAACACCAAGAAGG	230	Tozaki <i>et al.</i> , (2001)
T294	TCTCTGCTATAGGTAAGGTC GATCTATGTGCTAGCAAACAC	221	Tozaki <i>et al.</i> , (2001)
T297	CTAGTGTTTCAGATAGCCTC GTCTTTTGTGCCTCGGTG	228	Tozaki <i>et al.</i> , (2001)
T301	TCAGGGGACAGTGGCAGCAG AATGGTGGCTAATCAATGGG GTGTATGATGCCCTCATCTC	151	Tozaki <i>et al.</i> , (2001)

(continuação da Tab. 2)

Locus	direto (5'-3') e reverso (5'-3')	(bp)	Referência
T312	AACCTGGGTTTCTGTTGTTG	114	Tozaki et al., (2001)
T321	GATCCTTCTTTTTATGGCTG TTGTTGGGTTTAGGTATGAAGG	200	Tozaki et al., (2001)
T325	GTGTCAATGTGACTTCAAGAAC GGATGGAGTGAGATAATACC	191	Tozaki et al., (2001)
T333	TGGATGAACCATGAATAGTG CCTTCACTAGCCTTCAAATG	107	Tozaki et al., (2001)
T341	TTGTGTTTAGACAGTGCTGC TATCCAGTCACCCATTTTAC	156	Tozaki et al., (2001)
T394	TTGTGTCAGTACACTCTATG GCATCATCGCCTTGAAGTTG	244	Tozaki et al., (2001)
T343	CCTTTCTGGTTGGTATCCCTG TAGTCCCTATTTCTCCTGAG	171	Tozaki et al., (2001)
T344	AAACCCACAGATACTCTAGA GTGTCCATCAATGGATGAAG CTTAAGGCTAAATAATATCCC	109	Tozaki et al., (2001)

A amplificação dos microsatélites foi realizada com a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (Tabela 3) e as condições de amplificação específicas de cada microsatélite se encontram na Tabela 4. Preparou-se uma mistura de reação em um volume suficiente para que as amostras que se queria amplificar se distribuíssem nos poços em um volume de 10 µl para cada uma. Acrescentou-se o DNA correspondente a cada uma. Se acrescentou óleo mineral e se levou à 95 °C durante 4 min. Realizou-se a amplificação em um termociclador Amplitron II, modelo DB. 80225, sendo 30 ciclos de 95 °C a 45 seg, 56-60 °C a 45 seg, 75 °C a 1 min e no final 10 min a 72 °C.

Tabela 3- Protocolo para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Materiais e soluções para as reações multiplex:

Taq Polimerase (5Unidades/ μ l)

Tampão de amplificação 10x

DNTP's

Mistura de primers

DNA genômico

H₂O MiliQ

Óleo mineral

Procedimento:

Mistura de reação para uma amostra (μ l)

- H₂O MiliQ-1,3

-Taq -0,5

- Tampão (10x) -2,0

- MgCl₂ (50 mM)-1

- dNTPs (25 mM)- 0,2

- Mistura de primers- 5 e 8

- DNA Genômico-5

Total: 15

- Óleo mineral- 15

Com o objetivo de reduzir o número de reações e os custos dos experimentos os microssatélites foram agrupados em duas reações multiplex. As condições para cada reação multiplex para os microssatélites estudados se observa na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições de amplificação específicas para cada microssatélite.

Reação multiplex	Microssatélite	(μM)	TA ($^{\circ}$C)	Fluorocromo
M1	AHT4	0,060	60 $^{\circ}$ C	FAM
	ASB17	0,110		HEX
	ASB23	0,070		HEX
	HMS6	0,120		HEX
	HMS7	0,100		FAM

Continuação da Tab. 4)

Reação multiplex	Microssatélite	(μM)	TA ($^{\circ}$C)	Fluorocromo
M2	HTG4	0,060	56 $^{\circ}$ C	FAM
	HMS3	0,150		NED
	ASB2	0,160		FAM
	HTG10	0,200		NED
M1	LEX33	0,500	60 $^{\circ}$ C	NED
	T287	0,060		FAM
	T294	0,110		NED
	T297	0,070		HEX
	T301	0,120		HEX
	T312	0,100		HEX
	T321	0,060		FAM
	T325	0,150		NED
	T333	0,160		NED
	T341	0,200		NED
	T394	0,500		NED
	T343	0,120		FAM
	T344	0,160		FAM

Para a separação dos diversos fragmentos obtidos através da PCR se submeteu estes produtos a eletroforese em gel de poliacrilamida (Tabela 5) no seqüenciador automático ABI 377XL. As amostras foram previamente misturadas com um marcador de tamanhos de fragmentos e com formamida. Desnaturalizou-se a mistura submetendo-a a uma temperatura de 95 $^{\circ}$ C durante 2 minutos e se colocou em cada poço do gel 1,5 μ l.

Tabela 5 - Protocolo para preparação de gel de poliacrilamida 6%.

Material:

Uréia 6M

TBE 5X: Tris base 0,45 M; ácido bórico 0,45 M; EDTA 10 mM, pH=7,5-7,8

Solução de acrilamida/bisacrilamida 19/1 40%.

Persulfato de amônia 10% (p/v)

Temed

Água ultrapura

Cristais e separadores de plástico

Pente de 46 poços

Método:

Diluir 16,8 g de uréia em 10 ml de água destilada e 8 ml de TBE 5X.

Aquecer a 50 °C até a completa dissolução da uréia

Acrescentar 6 ml de acrilamida/bisacrilamida, e completar com água até 40 ml e deixar esfriar

Acrescentar 20 ml de Temed e 300 µl de persulfato de amônia

Verter o gel entre os cristais, evitando formar bolhas e deixar polimerizar umas 2 horas

Os resultados das análises de fragmentos e a caracterização alélica realizaram-se mediante os softwares GENESCAN ANALISYS v 3.1.2 e GENOTYPER v 2.5, respectivamente. No GENESCAN ANALYSIS v.3.2.1 o tamanho dos produtos amplificados é calculado utilizando uma curva de regressão que toma como referência um marcador interno de tamanhos pré-estabelecidos. O marcador interno utilizado é o Genescan HV 400 que produz fragmentos de seguintes tamanhos: 50, 60, 90, 100, 120, 150, 160, 180, 190, 200, 220, 240, 260, 280, 290, 300, 320, 340, 360, 380 e 400

A utilização do seqüenciador automático e do programa GENESCAN

ANALYSIS possibilita a marcação dos *primers* com fluorocromos de três cores distintas (azul, verde, e amarelo), utilizando a cor vermelha para marcar o padrão interno, o que otimiza os gastos já que se pode compatibilizar o uso de vários microssatélites carregados com fluorocromo distintos em uma mesma corrida. Os dados resultantes desta análise alimentam o software Genotyper v2.5 que, pela leitura de cada pico detectado, identifica os tamanhos dos alelos em cada indivíduo para cada *locus* estudado.

A distribuição da variabilidade genética dentro e entre raças foi estudada através da estatística F de Wrigth (1969), de acordo com Weir & Cockerman (1984) com o software GENETIX v 4.04 (BELKHIR *et al.*, 2001). Foram calculadas as distâncias genéticas entre populações segundo a proposta de Nei (1972), utilizando o programa Populations 1.2.28 (LANGELA 2002) e construiu-se uma árvore de topologia genética, segundo o método UPGMA. Realizou-se uma análise fatorial de correspondência (LEBART *et al.*, 1977) para detectar possíveis misturas entre indivíduos de diferentes populações. Esta análise é feita com o módulo “AFC Populations”, do GENETIX v 4.04.

O valor das frequências alélicas foi obtido contando-se diretamente os alelos presentes em cada microssatélite, considerando-se a presença de homozigose quando se observou um só alelo. A análise das frequências alélicas obtidas para cada microssatélite por população foi realizada através do GENEPOP v3.1c (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

4.4-Análise da heterozigosidade

A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto para o locus marcador e é dependente do número de alelos do marcador e de sua frequência na população e segundo Susol *et al.*, (2000), marcadores com heterozigosidade esperada $\geq 70\%$ são considerados mais informativos para realizar estudos de populações mais confiáveis e precisos (apud SERENO, 2002).

A heterozigosidade observada é a medida da variação genética de uma população, sendo obtida através dos *loci* presentes na população. Quando uma população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg a heterozigosidade observada é igual a heterozigosidade esperada.

Para a análise da heterozigosidade do conjunto de marcadores e para cada um deles se utilizou o GENETIX v 4.04. Obteve-se os valores da heterozigosidade esperada ($\bar{H}_e$) e heterozigosidade observada ($\bar{H}_o$).

A heterozigosidade esperada se calculou pela equação (Nei & Roychoudhury, 1974):

$$H_c = \frac{2n \left(1 - \sum_{i=1}^k x_i^2 \right)}{(2n - 1)}$$

onde n é o tamanho da amostra, x_i é a frequência do alelo i .

4.5-Conteúdo de informação polimórfica - PIC

Para o cálculo do conteúdo de informação polimórfica (PIC) se introduziu os dados das frequências alélicas em uma planilha de cálculo EXCEL (Microsoft). Os valores de PIC foram realizados segundo Botstein *et al.*, (1980):

$$PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^k x_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2x_i^2 x_j^2$$

onde k é o número de alelos, x_i , x_j : frequência dos alelos i e j respectivamente.

Segundo Botstein *et al.* (1980) os valores superiores a 0,5 são considerados muito informativos, os valores entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos e os valores inferiores a 0,25 pouco informativos.

4.6-Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizada para cada *locus*/população segundo Guo & Thompson (1992) com o uso do algoritmo em cadeia Markoviana, através do GENEPOP v 3.1 (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

4.7-Análise dos índices de diferenciação genética(Fis, Fst e Fit) e G_{ST}

A ação das forças da evolução leva a diferenciação intra-específica e para quantificar esta diferenciação se utiliza a estatística F que oferece uma medida que

quantifica o grau de relação entre os diversos pares de alelos. Segundo Wright (1969) a estatística F_{ST} constitui uma medida de diversidade genética animal já que avalia o grau de consangüinidade de uma subpopulação dentro da população.

As estatísticas F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} propostas por Wright medem os desvios das frequências genotípicas em populações subdivididas. Weir & Cockerham (1984) propõe três medidas equivalentes às estatísticas de Wright, a serem utilizados em indivíduos diplóides :

$$F=F_{IT}, \Theta=F_{ST} f=F_{IS}$$

As estatísticas F , Θ e f foram obtidas pelo programa GENEPOP. No cálculo do coeficiente de diferenciação genética G_{ST} se utilizou o DISPAN (OTA, 1993) em que:

$$G_{ST} = \frac{He_s}{He_t}$$

He_s : diversidade genética ou heterozigosidade esperada entre subpopulações

He_t : diversidade genética ou heterozigosidade na população total (NEI, 1973).

As estatísticas F (F , Θ e f) segundo Weir & Cockerham (1984), foram calculadas usando o programa computacional GENETIX v 4.04

Também foi realizada a Análise da Componente Principal pelo método de comparação dos valores de F_{ST} estimados tanto entre os pares de cada raça quanto entre pares de todos os indivíduos contidos em cada raça avaliada. Valores de *bootstrap* foram obtidos com 1000 repetições para testar a

consistência dos componentes principais obtidos. Os resultados foram gerados do *software* PCA (GOUDET, 1999).

4.8-Estudo de distâncias genéticas

As medidas de distância genética são indicadores das relações entre espécies e são úteis para reconstrução histórica das relações filogenéticas entre grupos.

4.8.1-Estudos populacionais

O *software* POPULATIONS foi utilizado para o cálculo da distância padrão de Nei (D) e a distância de Reynolds (D_{Reynolds}):

$$D = -\ln \left(\frac{\sum_i x_i y_i}{\sqrt{\sum_i x_i^2 \sum_i y_i^2}} \right) \quad D_{\text{Reynolds}} = \frac{1}{2} \frac{\sum_i (x_i - y_i)^2}{1 - \sum_i x_i y_i}$$

Na obtenção da distância de Nei (D_A) se empregou a aplicação DISPAN.

$$D_A = 1 - \sum_i \sqrt{x_i y_i}$$

Para o cálculo da distância de Shriver (D_{SW}) se empregou o programa MICROSAT v.1.5b (MINCH, 1998).

$$D_{\text{SW}} = W_{XY} - (W_X + W_Y)/2$$

onde:

$$W_X = \sum_{i \neq i'} |i - i'| x_i x_{i'} \quad W_Y = \sum_{i \neq i'} |i - i'| y_i y_{i'} \quad W_{XY} = \sum_{i \neq i'} |i - i'| x_i y_{i'}$$

Para as distâncias estudadas x_i e y_i são a frequência do i -ésimo alelo respectivamente na população X e Y.

4.8.1.1-Árvores de distância genética

Utilizou-se a distância D_A para a construção da árvore filogenética baseada no método Neighbour-Joining (SAITOU & NEI, 1987) e o método UPGMA de Sneath & Sokal (1973). Para a confiabilidade das medidas de distância e das árvores obtidas para cada medida de distância se utilizou o “bootstrapping” (com 1.000 pseudoréplicas) com substituição dos *loci* (FELSENSTEIN, 1995).

Para a construção de uma árvore filogenética tomando os indivíduos como unidades taxonômicas operacionais (OTU) se utilizou o POPULATIONS para calcular os pares de distâncias genéticas entre indivíduos baseados na proporção de alelos. Os valores das distâncias obtidos a partir dos pares de distâncias genéticas entre indivíduos baseados na proporção de alelos compartilhados P_{SA} (BOWCOCK *et al.*, 1994) foram utilizados para construir uma árvore individual filogenética baseado no algoritmo UPGMA (RUIZ-LINARES, 1999) empregando a aplicação PHYLIP v.3.57c (FELSENTEIN, 1995).

$$D_{SA} = 1 - \left(\sum_{j=1}^r i_{SA} / 2r \right)$$

onde:

r : número de *loci*

i_{SA} : variável lógica tomando o valor do alelo i : se $i_{SA} = 0$, não se compartilham alelos; se $i_{SA} = 1$, se compartilha um alelo; se $i_{SA} = 2$, se compartilham dois alelos.

5-RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados refletem a caracterização genética da raça Marajoara realizada a partir de vinte e dois microssatélites estudados, além de um estudo comparativo, através de distâncias genéticas com as raças Árabe, Asturcon, Pura Raça Espanhola, Puro Sangue Inglês, Losino, Mallorquina, Menorquina, Potoka, Mangalarga, Marajoara, Puruca, Pantaneiro e Lusitano, como contribuição na tentativa de esclarecer a origem da raça foco do trabalho que é a Marajoara.

5.1-Microssatélites genotipados

O padrão dos alelos detectados para os *locus* HTG4, AHT4, HMS7, ASB2, ASB17, HMS6, ASB23, HTG10, HMS3, LEX33, T287, T294, T297, T301, T312, T321, T325, T33, T341, T394, T343 e T344 na raça Marajoara podem ser observado nas figuras de 4 a 25.

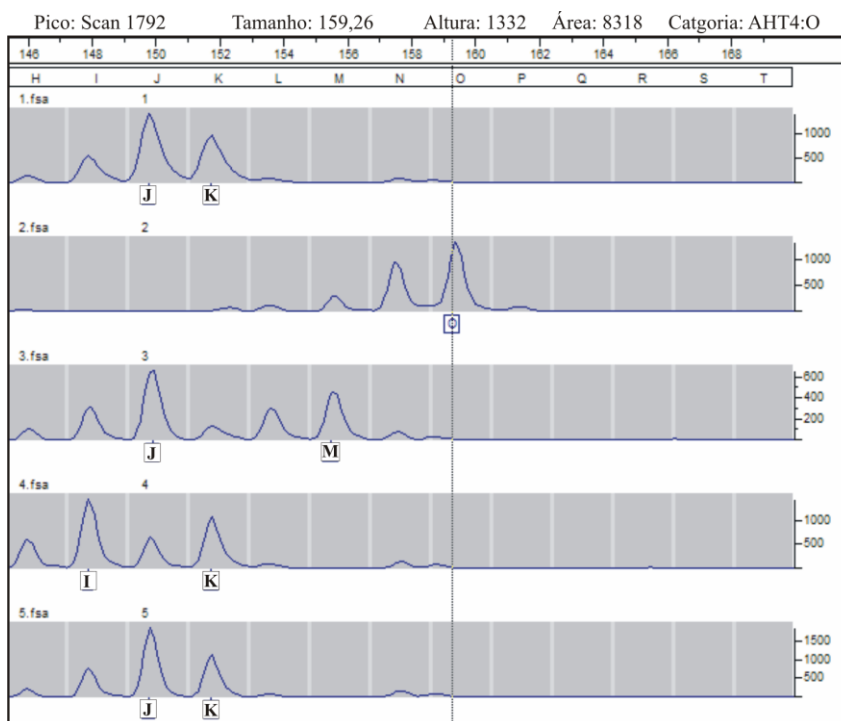


Figura 4- Padrão de alelos detectados para o *locus* AHT4 na raça Marajoara.

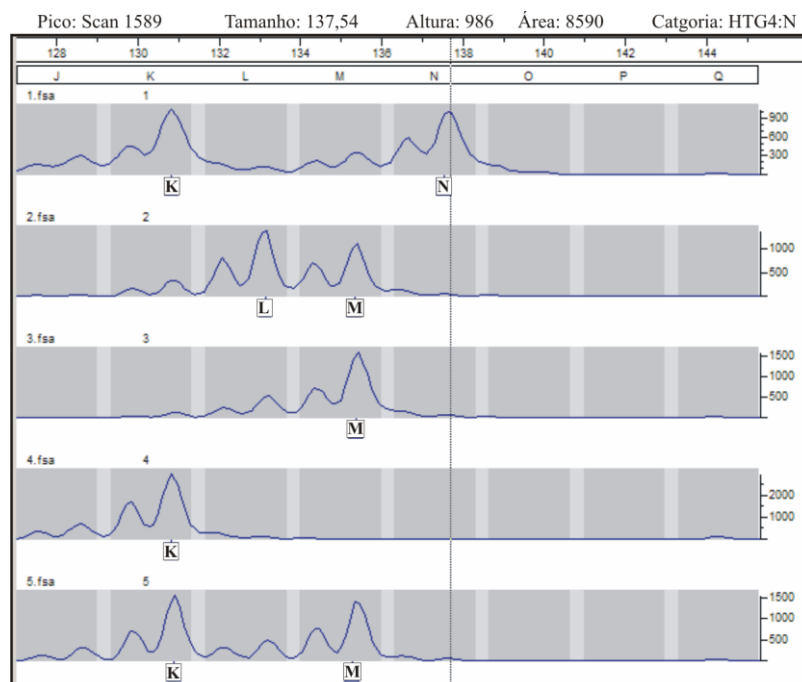


Figura 5- Padrão de alelos detectados para o *locus* HTG4 na raça Marajoara.

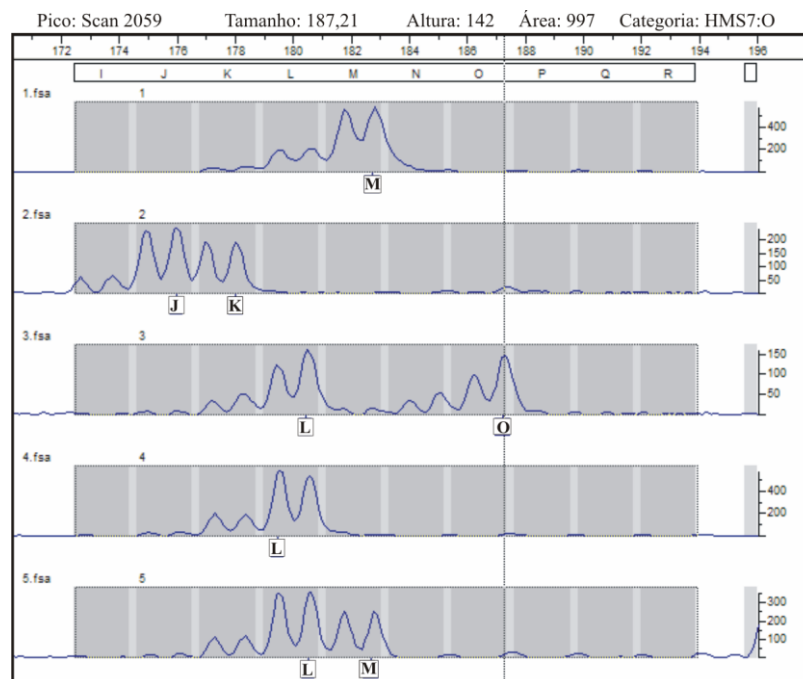


Figura 6- Padrão de alelos detectados para o *locus* HMS7 na raça Marajoara.

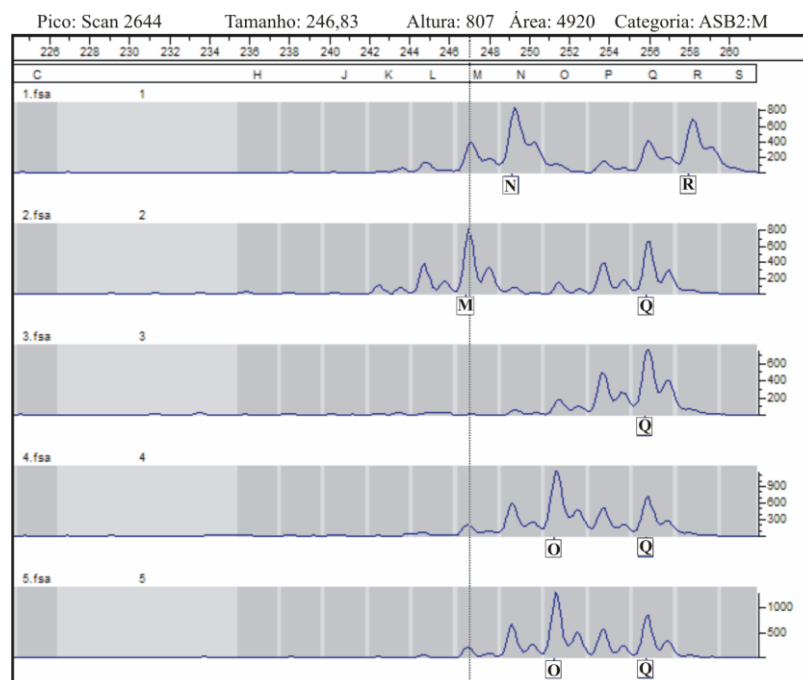


Figura 7- Padrão de alelos detectados para o locus ASB2 na raça Marajoara.

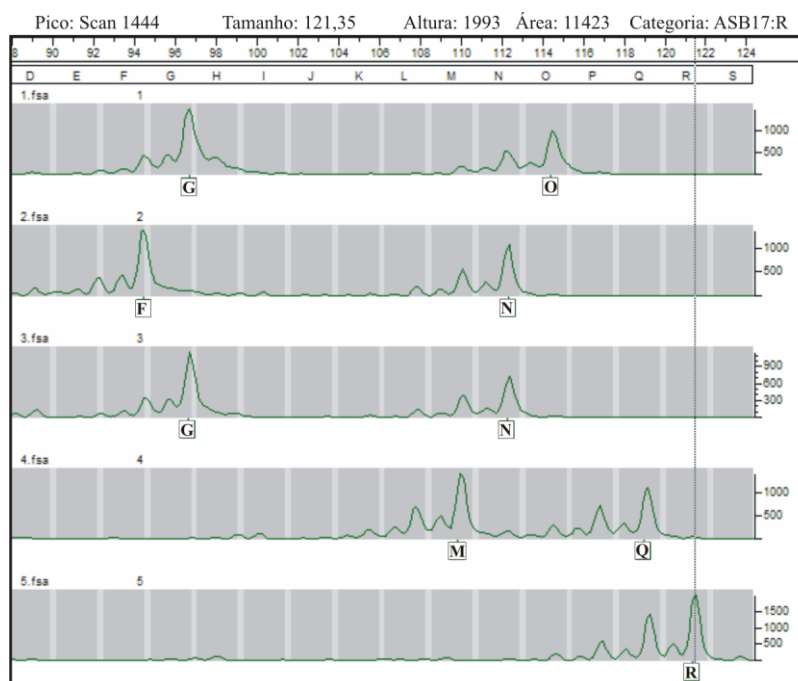


Figura 8- Padrão de alelos detectados para o *locus* ASB17 na raça Marajoara.

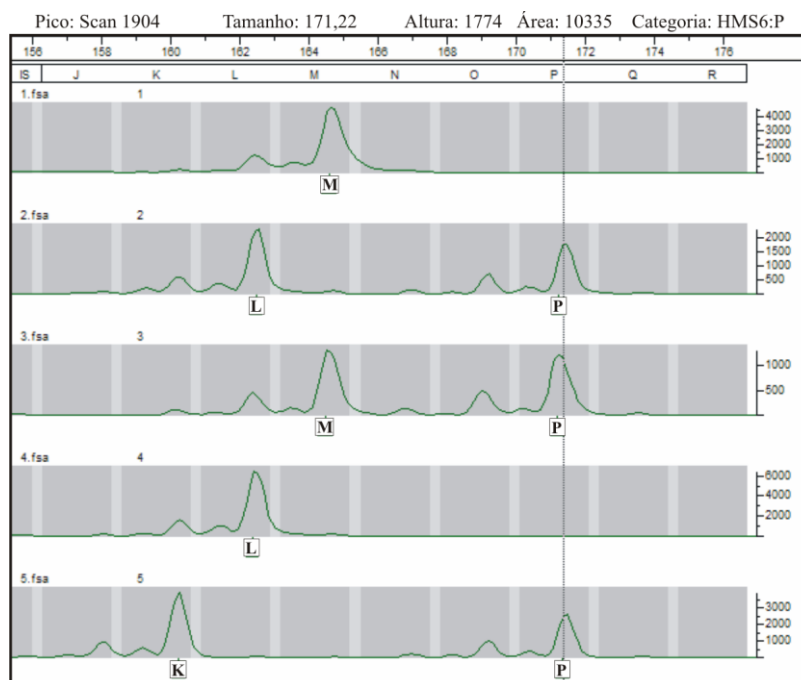


Figura 9- Padrão de alelos detectados para o *locus* HMS6 na raça Marajoara.

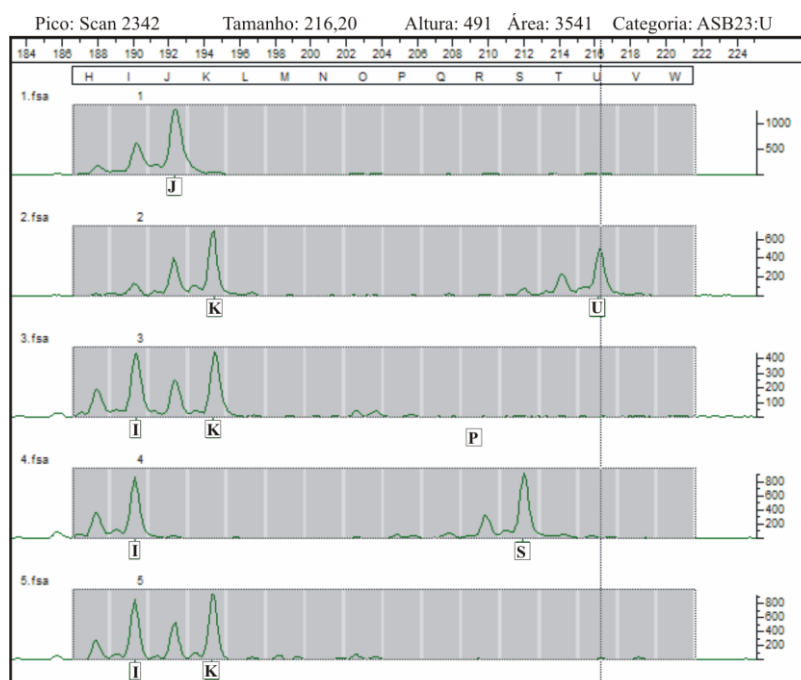


Figura 10- Padrão de alelos detectados para o *locus* ASB23 na raça Marajoara.

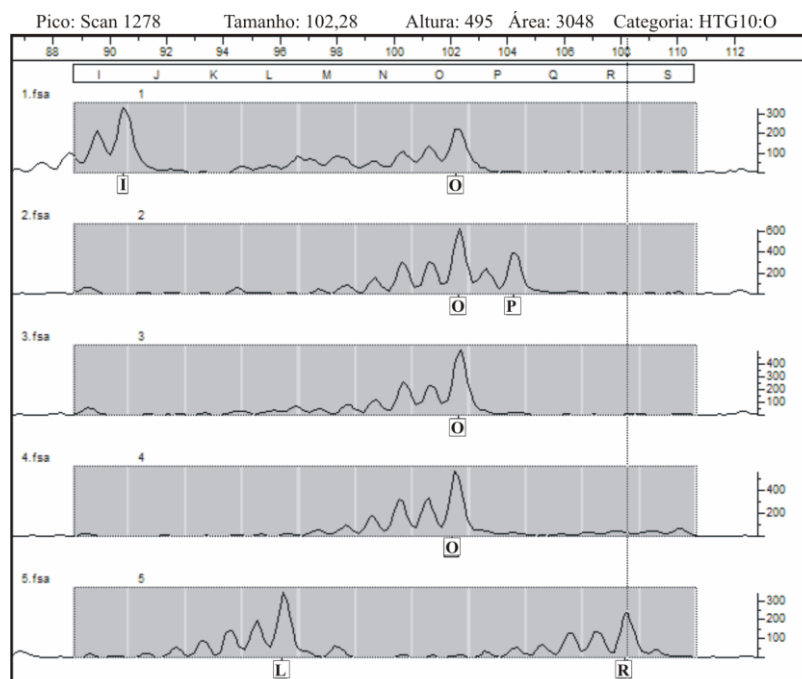


Figura 11- Padrão de alelos detectados para o *locus* HTG10 na raça Marajoara.

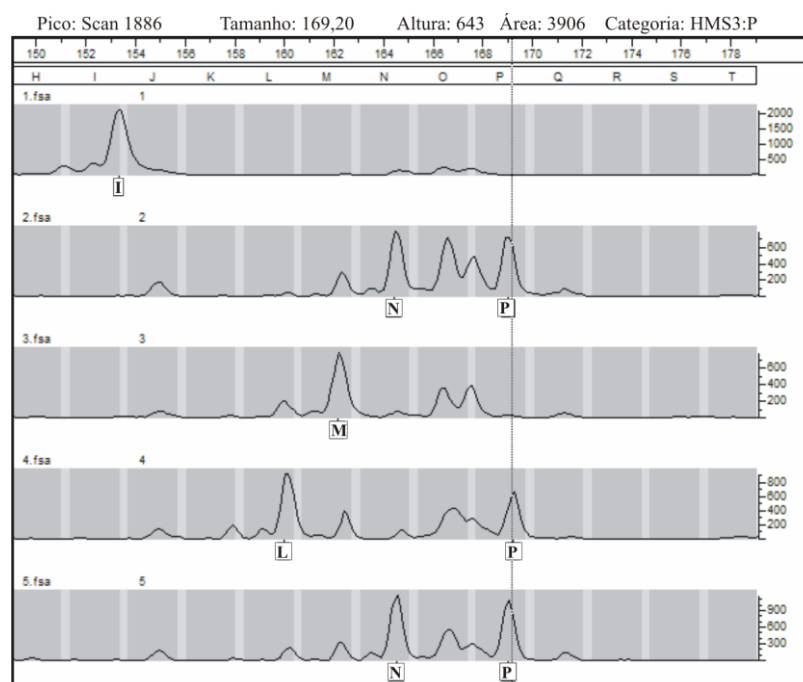


Figura 12- Padrão de alelos detectados para o *locus* HMS3 na raça Marajoara.

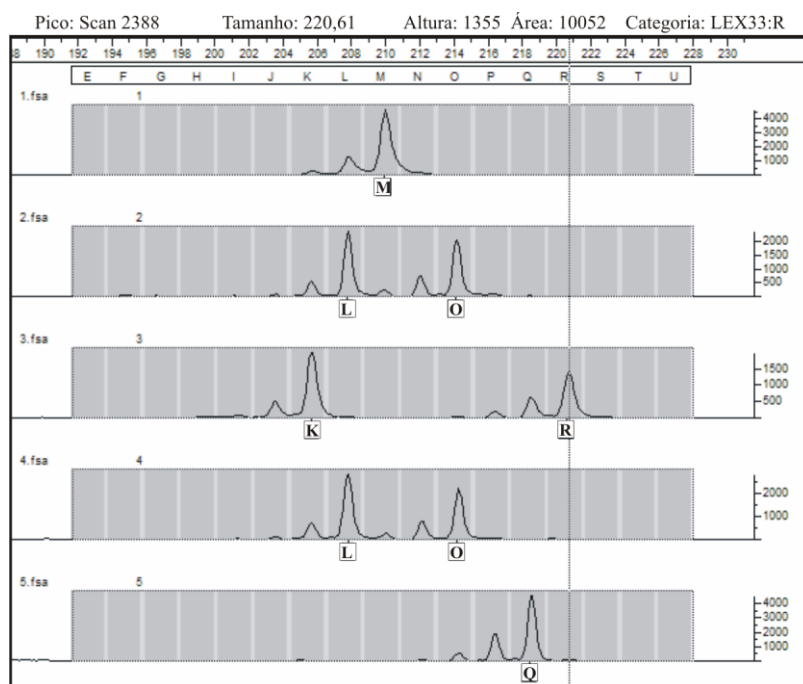


Figura 13- Padrão de alelos detectados para o *locus* LEX33 na raça Marajoara.

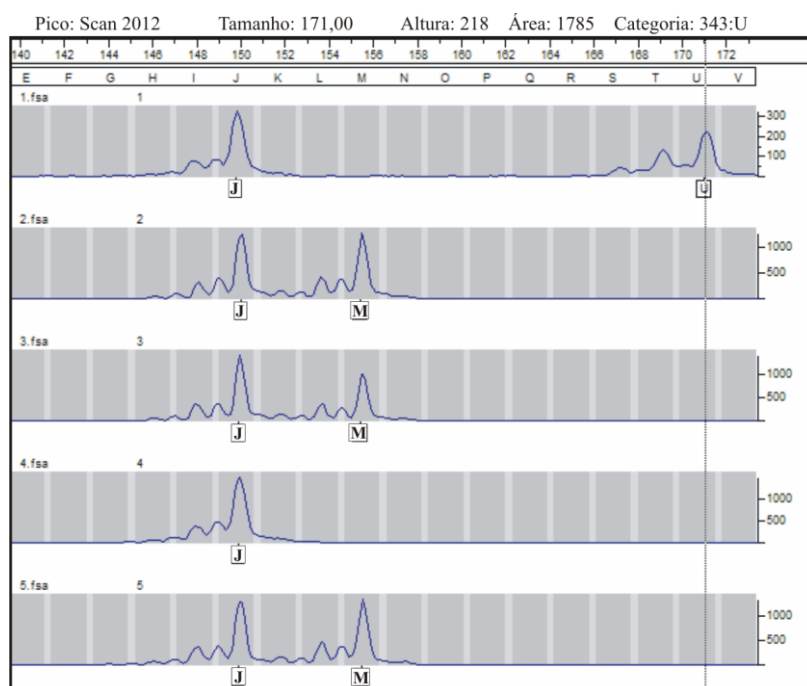


Figura 14- Padrão de alelos detectados para o *locus* T343 na raça Marajoara.

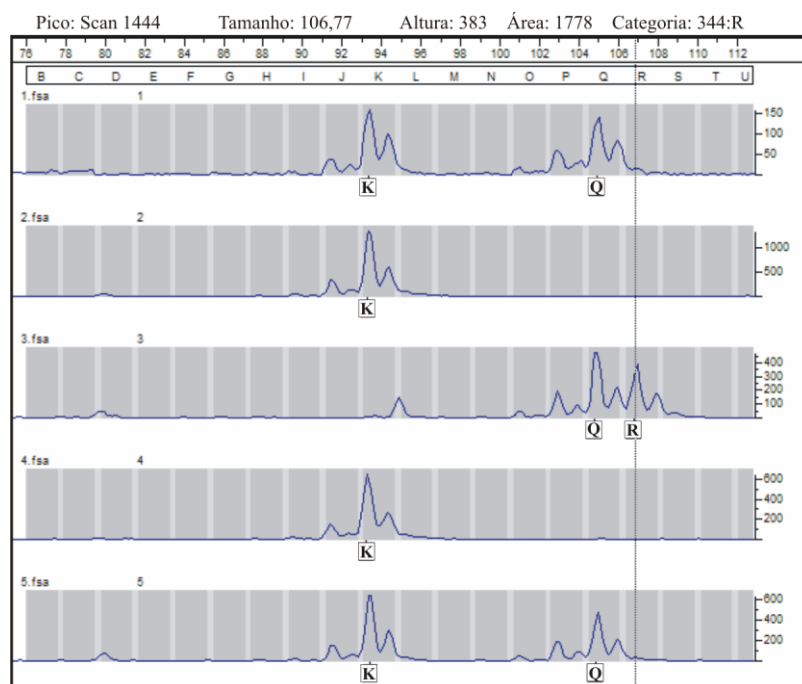


Figura 15- Padrão de alelos detectados para o *locus* T344 na raça Marajoara.

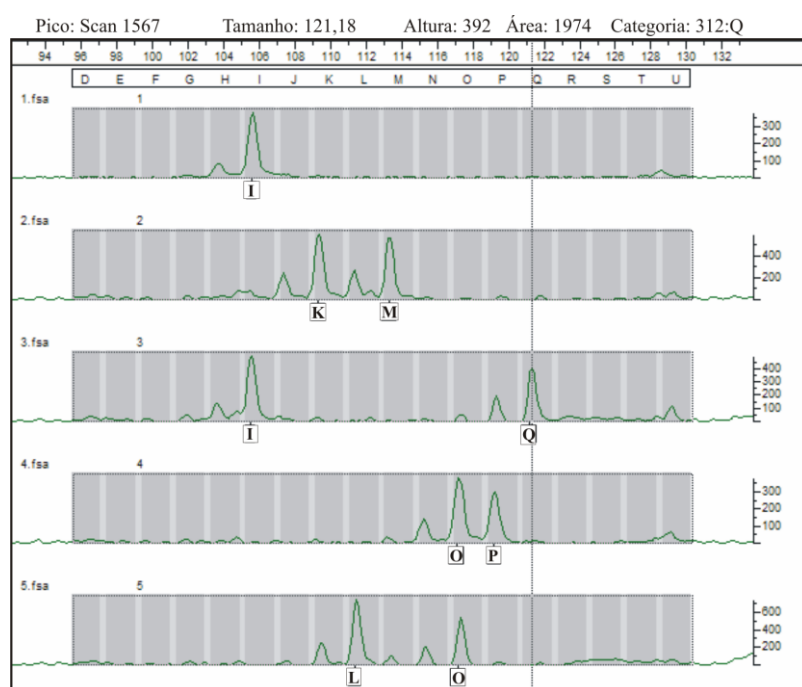


Figura 16- Padrão de alelos detectados para o *locus* T312 na raça Marajoara.

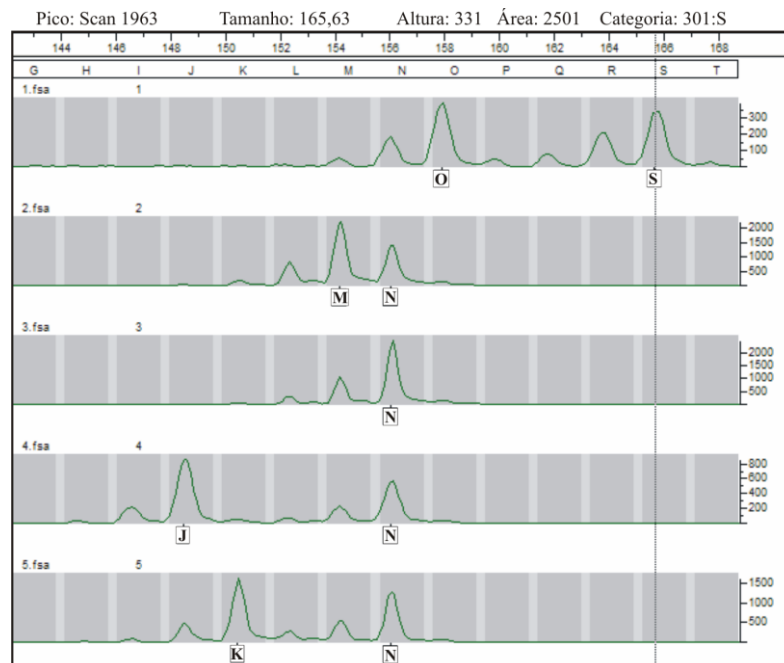


Figura 17- Padrão de alelos detectados para o *locus* T301 na raça Marajoara.

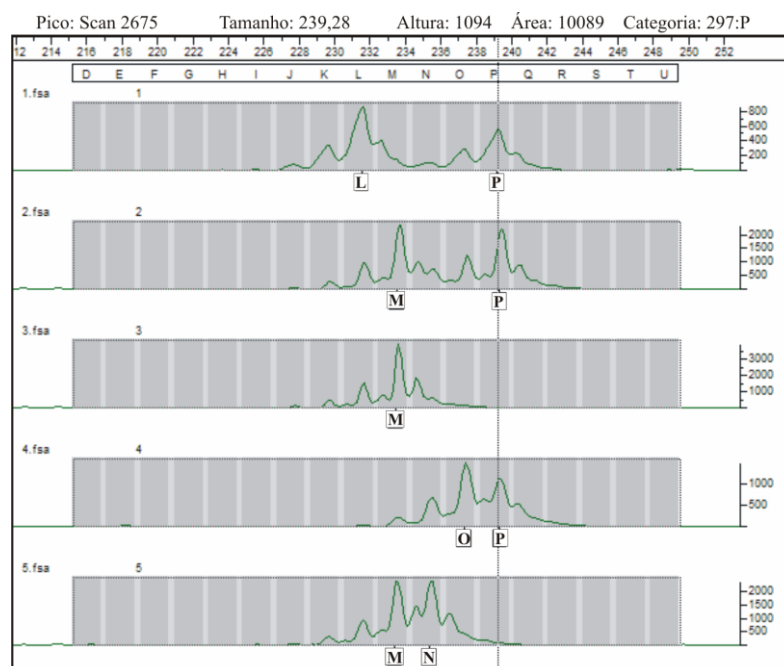


Figura 18- Padrão de alelos detectados para o *locus* T297 na raça Marajoara.

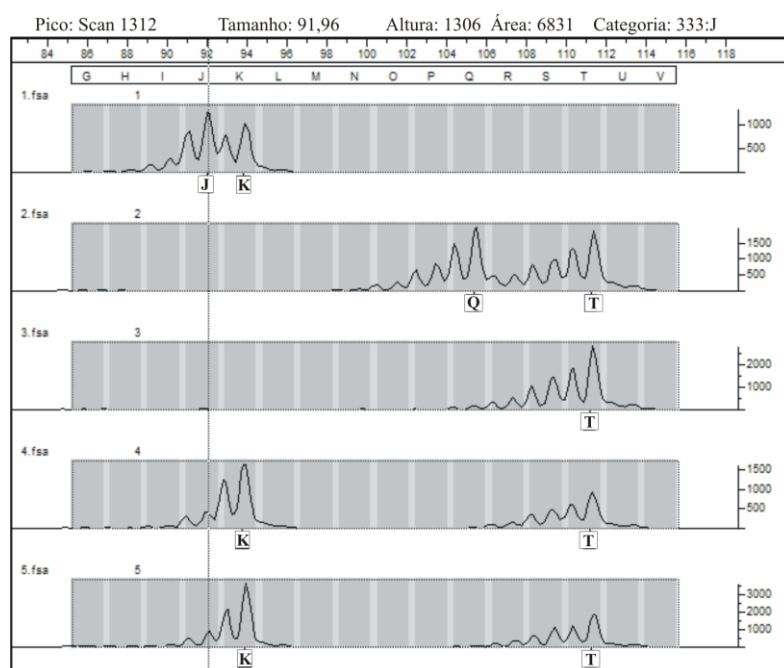


Figura 19- Padrão de alelos detectados para o *locus* T333 na raça Marajoara.

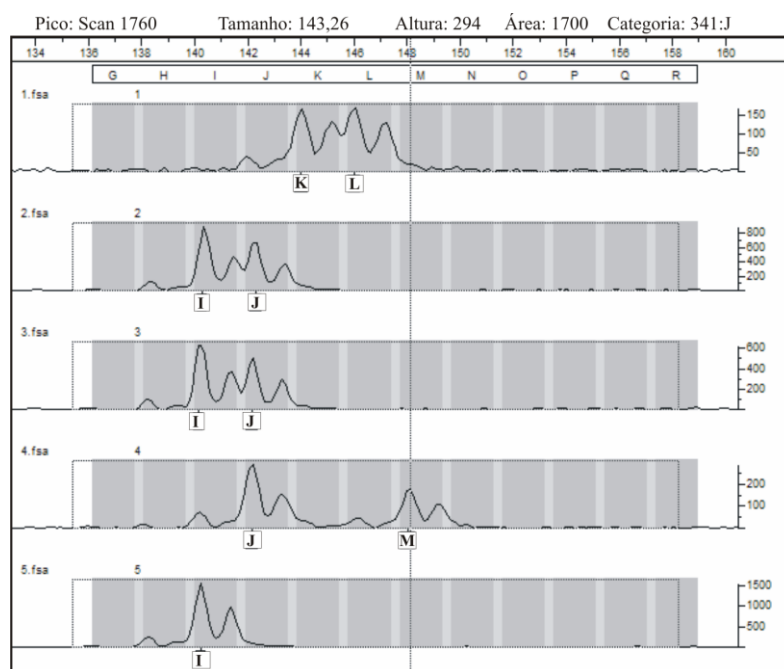


Figura 20- Padrão de alelos detectados para o *locus* T341 na raça Marajoara.

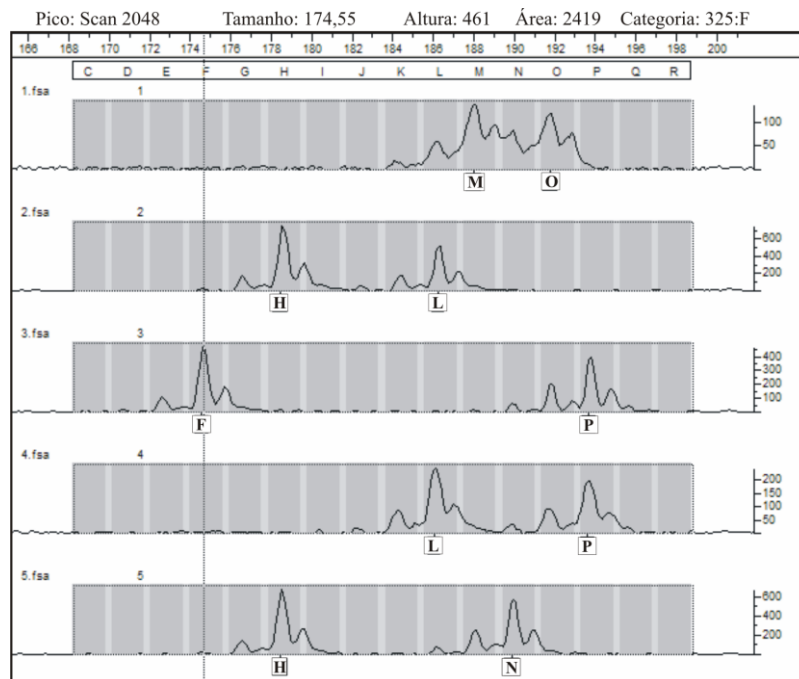


Figura 21- Padrão de alelos detectados para o *locus* T325 na raça marajoara.

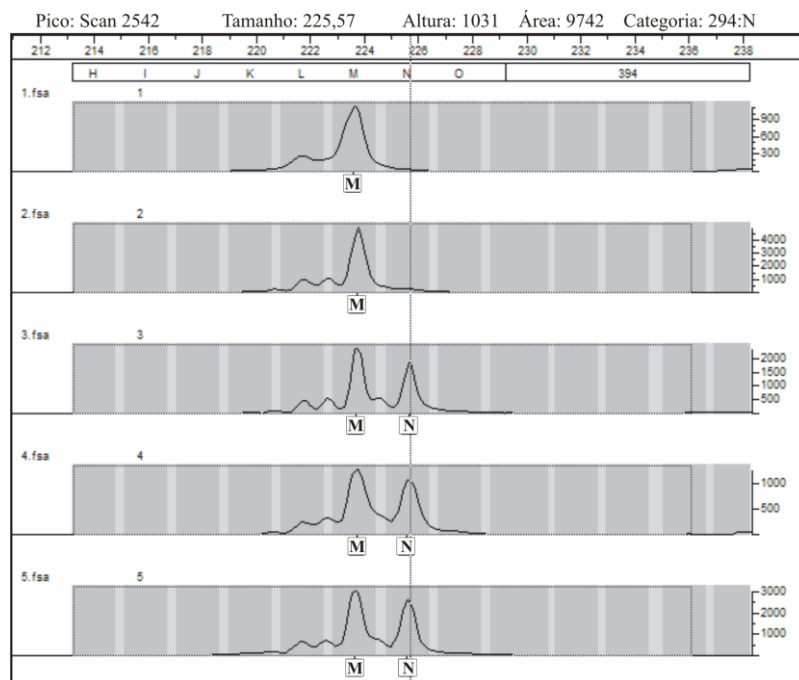


Figura 22- Padrão de alelos detectados para o *locus* T294 na raça Marajoara.

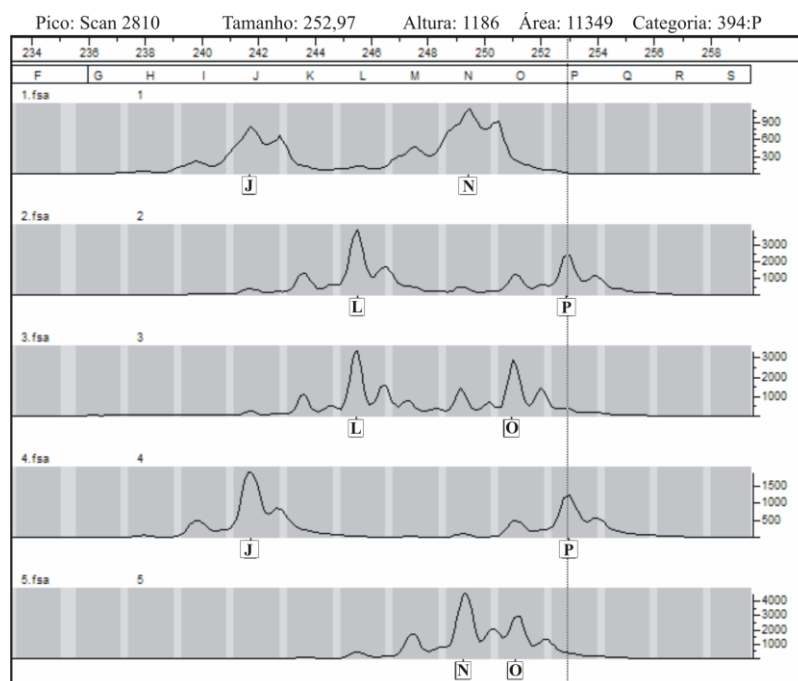


Figura 23- Padrão de alelos detectados para o *locus* T394 na raça Marajoara.

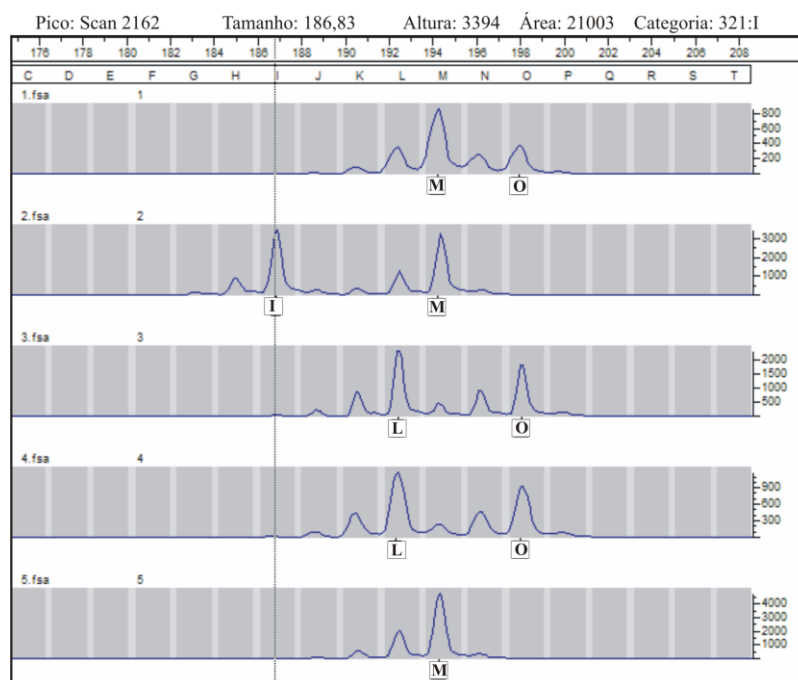


Figura 24- Padrão de alelos detectados para o *locus* T321 na raça Marajoara.

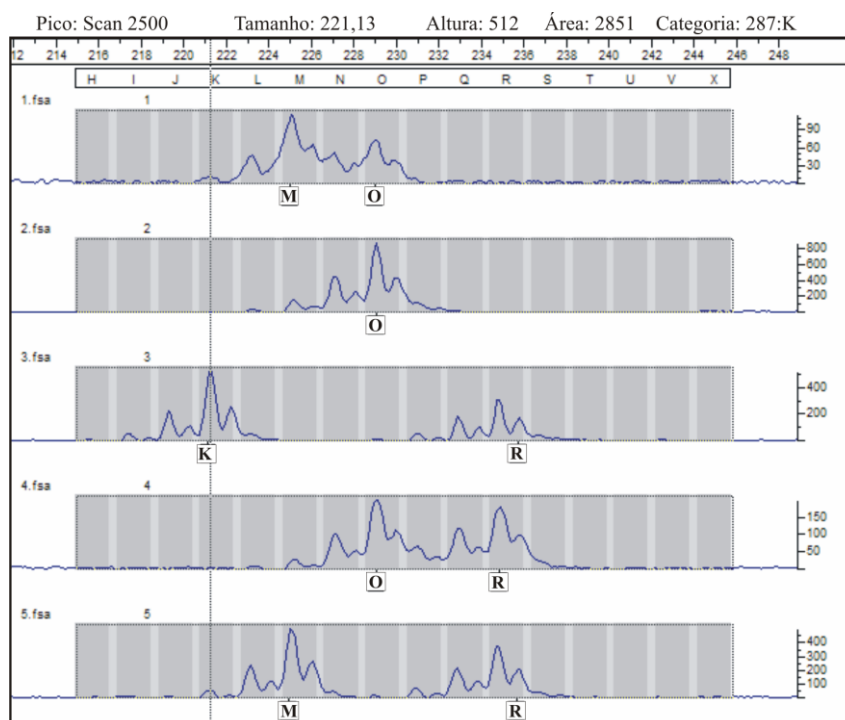


Figura 25- Padrão de alelos detectados para o *locus* T287 na raça Marajoara.

5.2- Número total de alelos (NTA), PIC e heterozigosidades

Foram detectados 236 alelos para os 22 microssatélites estudados, sendo que todos os *loci* foram polimórficos e o número de alelos detectados variou de 6 para o *locus* HMS6 até 16 para o *locus* ASB17 (Tabela 6). Barker (1994) sugere para estudos de diversidade a utilização de *loci* com, no mínimo, quatro diferentes alelos. A média dos alelos variou entre 4,8 para o *locus* ASB23 e 9,6 para o *locus* ASB17, indicando, em média, a alta diversidade alélica nos grupos estudados. Em geral, observa-se uma relação direta entre o número de alelos de cada marcador e a média de alelos, sendo o microssatélite ASB17 o mais polimórfico apresentando 16 alelos..

Normalmente há uma relação direta entre o número de alelos que exhibe cada microssatélite e a média de alelos, porém, esta circunstância nem sempre se cumpre, podendo ocorrer microssatélites que apresentam muitos alelos e têm média de alelos mais baixa que outros microssatélites, com um número menor de alelos totais. Este é o caso do microssatélite *ASB23* com 10 alelos e uma média de 4,8.

Os valores de PIC para cada microssatélite variaram entre 0,8396 para o *locus T394* e 0,5872 para o *T294*. Os marcadores *AHT4*, *HTG10*, *T297*, *T321*, *T333*, e *T394* apresentaram valores de PIC maiores que 0,80. Em relação ao PIC, que mostra o quão informativo é o marcador, valores acima de 50% são considerados bastante informativos, conferindo maior confiabilidade à seleção dos mesmos (BOTSTEIN *et al*, 1980) e os marcadores escolhidos para este trabalho estão de acordo com este critério.

Os valores de *He* variaram entre um máximo de 0,80 para o marcador *T394* e um mínimo de 0,65 para os marcadores *HTG4* e *HMS6*. Para a heterozigosidade observada o mínimo foi de 0,66 para o *locus HTG4* e o máximo de 0,82 para o *locus T394* (Tabela 6)

Valores de heterozigosidade ligeiramente superiores foram obtidos por Sereno (2002) caracterizando a raça Pantaneira com doze marcadores, dentre os quais nove foram analisados neste trabalho sendo *HTG4*, *AHT4*, *HMS7*, *ASB2*, *ASB17*, *HMS6*, *ASB23*, *HTG10* e *LEX33*. Valores semelhantes foram obtidos por Guérin *et al.* (1994) e Cañon *et al.* (2000).

Deve-se avaliar, ainda, as diferenças entre as heterozigosidades, pois são indicativas do quanto os marcadores estão equilibrados comparando-se com os

resultados da prova de Hardy-Weinberg. Neste estudo, observou-se uma considerável homogeneidade, em todos os casos, pois, mesmo nas maiores diferenças obtidas nos marcadores T321 e HMS6 os valores foram baixos (0,046 e 0,035). Por outro lado, as menores diferenças foram encontradas para os marcadores ASB17 e LEX33 (0,002).

Analisando-se de maneira conjunta os valores do PIC e das heterozigosidades encontrados, observa-se que, neste estudo, refletem o polimorfismo de cada marcador nas populações estudadas.

Tabela 6.- Microssatélites analisados, número e média de alelos detectados, PIC e Heterozigosidades esperada e observada.

Locus	Nº	Média	P/C	He	Ho
<i>HTG4</i>	7	5,6	0,6775	0,6533	0,6623
<i>AHT4</i>	9	6,2	0,8042	0,7804	0,8061
<i>HMS7</i>	8	5,6	0,6915	0,7402	0,7233
<i>ASB2</i>	11	8,5	0,7822	0,7566	0,7705
<i>ASB17</i>	16	9,6	0,7836	0,7743	0,7727
<i>HMS6</i>	6	5,2	0,7363	0,6586	0,6933
<i>ASB23</i>	10	4,8	0,7641	0,7613	0,7469
<i>HTG10</i>	10	8,4	0,8210	0,7693	0,7366
<i>HMS3</i>	8	5,4	0,7920	0,7426	0,7611
<i>LEX33</i>	9	6,4	0,7928	0,7361	0,7385
<i>T287</i>	11	8,4	0,7662	0,7393	0,7241
<i>T294</i>	14	9,2	0,5872	0,6653	0,6947
<i>T297</i>	12	8,2	0,8167	0,7644	0,7702
<i>T301</i>	11	8,4	0,7926	0,7360	0,7491
<i>T312</i>	11	8,4	0,7332	0,7763	0,7922
<i>T321</i>	12	8,4	0,8377	0,6649	0,7108
<i>T325</i>	13	8,6	0,7266	0,7893	0,7965
<i>T333</i>	13	8,8	0,8062	0,7546	0,7396
<i>T341</i>	9	6,4	0,7359	0,7293	0,7077
<i>T394</i>	10	8,2	0,8396	0,8052	0,8286
<i>T343</i>	15	9,4	0,7634	0,7288	0,7315
<i>T344</i>	11	8,2	0,7076	0,7070	0,7042

He: Conteúdo de Informação Polimórfica-PIC Heterozigosidade esperada. *Ho*: Heterozigosidade observada.

5.3-Média de alelos e heterozigosidades por população

A média de alelos em cada população (Tabela 7) indica, de uma certa forma, a variabilidade genética das populações estudadas. Os valores oscilaram entre 5,68 (Puro Sangue Inglês) e 8,50 (Pantaneiro). Em geral, espera-se que os

valores mais altos procedam das variedades mais numerosas e difundidas e os mais baixos se associem a variedades cujos animais sejam mais consangüíneos.

Outra maneira de avaliar a diversidade genética para um determinado grupo genético é mediante a proporção de indivíduos heterozigotos presentes na população ou heterozigosidade. Nessa mesma Tabela pode ser observado os valores para a heterozigosidade média esperada, que é a diversidade genética e para a heterozigosidade média observada. No caso da heterozigosidade observada o valor mais baixo (0,6353) foi obtido na raça Árabe e o maior (0,7854) na raça Pantaneiro.

Para a heterozigosidade esperada o menor valor corresponde a raça Árabe (0,6725) e o maior valor de 0,7960 corresponde a Marajoara. Isto pode ser explicado pela condição de ambas as raças, pois, enquanto à Árabe constitui um grupo genético fixado e homogêneo, sendo, inclusive, fornecedora de genes em todo o mundo, a raça Marajoara encontra-se ainda em fase de fixação como um grupo genético definido, ocorrendo, ainda, provavelmente, algum fluxo gênico na população em virtude de cruzamentos com outras raças eqüinas.

Os valores obtidos apontam para uma situação de equilíbrio de Hardy-Weinberg, no caso deste estudo, porém, nem sempre isto ocorre sobretudo, quando se trata de populações animais submetidas à seleção. Quando as diferenças entre as heterozigosidades observada e a esperada são muito grandes significa que a população não está em equilíbrio, seja pelos efeitos de consangüinidade ou porque o tamanho da amostra é reduzido. Em geral, se considera que um nível de heterozigosidade média superior a 0,5 indica que a bateria de microssatélites é aceitavelmente informativa para estudos de

caracterização genética. As menores diferenças entre as H_e e H_o ocorreram na Pura Raça Espanhola, Menorquina, Potoka, Árabe, Puruca, Pantaneiro, Losino e Puro Sangue Inglês. A maior diferença foi no Lusitano.

Os resultados de heterozigosidade observada aqui obtidos são ligeiramente superiores aos encontrados por Silva (2006), quando estudou a caracterização de seis raças de cavalos naturalizados, dentre as quais três foram incluídas neste trabalho (Pantaneiro, Mangalarga e Puro Sangue Inglês), que apresentaram os valores de 0,63; 0,70 e 0,62, respectivamente. Tal resultado é bem coerente, pois, na prática, se observa que tais raças são de formação recente, envolvendo cruzamentos com outras raças, como é o caso do PSI e Mangalarga ou formação através de isolamento reprodutivo, porém com base genética dos fundadores bem aberta, como é o caso do Pantaneiro.

Tabela 7 - Média de alelos e heterozigosidades esperada e observada por população.

Populações	Código	Alelos	H_e	H_o
Árabe	ARA	6,05	0,6725	0,6353
Asturcon	AST	7,18	0,7361	0,7584
Pura Raça Espanhola	ESP	7,77	0,7522	0,7477
Puro Sangue Inglês	ING	5,73	0,7350	0,7418
Losino	LOS	8,27	0,7444	0,7522
Mallorquina	MAL	6,50	0,7354	0,7583
Menorquina	MEN	7,50	0,7450	0,7483
Potoka	POT	7,86	0,7796	0,7850
Puro Sangue Inglês	PSIBR	5,68	0,7451	0,7611
Árabe	EA	5,73	0,6887	0,6873
Mangalarga	MG	7,09	0,7630	0,7439
Marajoara	MJ	8,27	0,7960	0,7737
Puruca	PU	8,23	0,7773	0,7686
Pantaneiro	PA	8,50	0,7795	0,7854
Lusitano	LUS	8,18	0,7551	0,7082
Média		7,23	0,7413	0,7873

5.4- G_{ST} e a estatística F- Fis (f), Fst (Θ) e Fit(F).

Na Tabela 8 encontram-se os resultados da estrutura das populações de acordo com os valores do coeficiente de diferenciação genética (G_{ST}) e os de Fis, Fst e Fit, de acordo com o marcador, para todas as populações

Tabela 8 - Microssatélites analisados, G_{ST} e as estatísticas Fis, Fst e Fit

<i>Locus</i>	<i>Gst</i>	<i>Fis (f)</i>	<i>Fst (Θ)</i>	<i>Fit (F)</i>
<i>HTG4</i>	0,0882	-0,0138	0,0882	0,0755
<i>AHT4</i>	0,0592	-0,0329	0,0592	0,0281
<i>HMS7</i>	0,0681	0,0228	0,0681	0,0894
<i>ASB2</i>	0,0835	-0,0184	0,0835	0,0666
<i>ASB17</i>	0,0883	0,0020	0,0883	0,0902
<i>HMS6</i>	0,0760	-0,0526	0,0760	0,0274
<i>ASB23</i>	0,0819	0,0188	0,0760	0,0992
<i>HTG10</i>	0,0760	0,0424	0,0819	0,1152
<i>HMS3</i>	0,0990	-0,0249	0,0760	0,0765
<i>LEX33</i>	0,0903	-0,0032	0,0903	0,0873
<i>T287</i>	0,0860	0,0206	0,0860	0,1049
<i>T294</i>	0,0959	-0,0440	0,0959	0,0560
<i>T297</i>	0,0958	-0,0076	0,0958	0,0889
<i>T301</i>	0,1050	-0,0177	0,1050	0,0891
<i>T312</i>	0,0938	-0,0204	0,0938	0,0753
<i>T321</i>	0,1354	-0,0678	0,1354	0,0768
<i>T325</i>	0,0903	-0,0090	0,0931	0,0820
<i>T333</i>	0,1095	0,0198	0,1095	0,1272
<i>T341</i>	0,0753	0,0296	0,0753	0,1027
<i>T394</i>	0,0726	-0,0292	0,0726	0,0454
<i>T343</i>	0,1007	-0,0037	0,1007	0,0973
<i>T344</i>	0,0788	0,0039	0,0788	0,0825
<i>TOTAL</i>	0,0900	0,0078	0,0809	0,0881

Nota: Destacam-se os valores de F que superam 0,10. Intervalos de confiança (IC) de 95%, Fis:-0,0041-0,0177; Fit 0,0772-0,098, Fst 0,0737- 0,0881, estimados com base na reamostragem de 1000 bootstraps por *locus*.

Os valores de G_{ST} são bastante similares aos de $F_{ST} (\Theta)$ e *oscilam* entre 0,0592 para o *locus* AHT4 e 0,1354 para o T321. O valor médio de $F_{ST} (\Theta)$ para todos os *loci* foi de 8% e variou de 13% para o *locus* T321 a 5 % para o *locus* AHT4, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Analisando-se tal diferenciação pode-se deduzir que, apesar das raças eqüinas apresentarem fenótipos diversos e viverem nos mais diversos ambientes em todo o mundo, apresentam-se bem semelhantes no genótipo, evidenciando que formam grupos homogêneos bem fixados. Para o G_{ST} este valor é de 9%, indicando que somente esta proporção é responsável pela diferença entre populações e 91% corresponde às diferenças entre indivíduos. Um resultado superior a 0,10 já indica um considerável nível de diferenciação.

Os valores de $F_{ST}(\Theta)$ indicam o nível de diferenciação genética médio que se manifesta nas subpopulações definidas e é a fração da diversidade total que é causada pela diferença entre populações ou mesmo pela proporção da variância gênica total devida à subdivisão. De acordo com Wright (1969), valores de F_{ST} entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25 alta e acima de 0,25 muito alta.

A coluna F (*Fit*) indica o coeficiente de consangüinidade para o total da população e a coluna f (*Fis*) a média deste obtida a partir do coeficiente de consangüinidade de cada uma das subpopulações em que se divide a população e indica a proporção da variância contida em subpopulações ou variabilidade genética intra-racial e podem assumir valores entre -1 e 1.

Os valores de $Fit(F)$ vão de 0,0274 para o *locus* HMS6 até 0,1272 para o

locus T333. O Fis (f) oscila entre valores de -0,0090 para o *locus* T325 e 0,0424 para o *locus* HTG10. Os valores baixos de Fis (f) indicam que há pouca consangüinidade dentro das populações para cada um dos marcadores e comprovam que os marcadores se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os valores negativos indicam que há um excesso de heterozigotos, ainda que em nenhum caso tenha alcançado o valor de -0,1.

Esta baixa expressão de consangüinidade e o excesso de heterozigosidade indicam que os grupos genéticos, conseguiram, ao longo dos tempos, nos mais diversos ambientes, desenvolver genes próprios, conferindo características singulares e peculiares. Neste estudo o cavalo Marajoara demonstra isso, quando sobrevive em região inóspita, onde a combinação de alta umidade e temperatura, resultou num fenótipo bem adaptado e produtivo.

O valor de F de 8,8%, para todos os loci, demonstra que as subpopulações são homogêneas em uma análise global. Valores de Fit (F) superiores a 0,10 indicam uma baixa resolução dos marcadores em estudos de diferenciação genética. Neste caso somente quatro marcadores apresentaram um F superior a 0,10. Valores similares foram obtidos por Sereno (2002) estudando a caracterização genética da raça Pantaneira que, igualmente à Marajoara, sobrevive em condições adversas.

Resumindo-se, pode-se afirmar que a diferenciação genética entre as populações é maior do que dentro de cada uma delas. Disto deduz-se que apesar das raças eqüinas, em geral, estarem muito próximas geneticamente, conseguiram fixar grupos genéticos ou ecotipos bem característicos, de acordo

com as condições ambientais de cada local onde se desenvolveram e receberam manejo diferenciado.

5.5-Freqüências alélicas

Na Tabela 9 observa-se as freqüências alélicas por população e marcador.

No caso dos microssatélites HMS6 e ASB23 o cavalo Marajoara apresenta uma distribuição de freqüências uniforme com cinco dos seis alelos com freqüências superiores a 10%. Os *loci* ASB2, ASB17, HTG10, T287 e T344 exibem 10 alelos para o Marajoara mais que no restante das populações, ainda que a distribuição das freqüências seja muito irregular. No *locus* T294 o alelo mais freqüente foi o 202 com uma freqüência de 57,41%, mas não foi exclusivo da raça Marajoara, uma vez que está presente nas outras raças com freqüências superiores a 20%, excetuando-se na raça Pantaneira. Os *loci* em que o Marajoara apresenta menos alelos são o ASB23 e o T294 com seis alelos.

Outros *loci* são pouco informativos já que o alelo mais freqüente é o mesmo para a maioria das populações, por exemplo, T344, T343, T325, T341, T321, T312, T287, LEX33, HMS6 e HTG4.

O alelo mais freqüente do *locus* HMS6 para todas as populações é o 196, o que o torna pouco informativo. Neste *locus* as populações com mais alelos são a Marajoara, Puruca e Pantaneiro que exibem seis alelos.

A maioria das populações exibe mais que cinco alelos em todos os marcadores excetuando-se a Árabe que exibe três marcadores no *locus* T341.

Tabela 9- Frequência de alelos por marcador e população destacando-se o mais freqüente.

Locus	HTG4	196	198	200	202	204	206	208
PSIBR		59,57		30,85	3,19		6,38	
EA		32,00	16,00	50,00	2,00			
MG		3,33	30,00	43,33	5,00	3,33	15,00	
MJ		8,33	25,00	44,44	6,48	5,56	10,19	
PU		9,57	35,11	35,11	4,26	8,51	6,38	1,06
PA		5,56	20,63	52,38	10,32	1,59	9,52	

Locus	190	192	194	196	198	200	202	204	206
AHT4									
PSIBR	20,21		19,15	26,60					34,04
EA	4,00	10,00	36,00	8,00		12,00			30,00
MG	13,33	8,33	21,67	43,33			3,33	10,00	
MJ	21,30	16,67	20,37	21,30	6,48	3,70	0,93	8,33	0,93
PU	15,96	8,51	17,02	36,17	1,06		4,26	15,96	1,06
PA	34,13	15,87	6,35	14,29	3,17	6,35	0,79	19,05	

Locus	194	196	198	200	202	204	206	208
HMS7								
PSIBR	14,89		12,77	25,53	28,72	18,09		
EA	16,00	14,00	42,00	4,00	2,00	22,00		
MG	1,67		35,00	26,67	18,33	16,67	1,67	
MJ	0,93	5,56	25,93	7,41	21,30	37,96	0,93	
PU	1,06	7,45	35,11	21,28	9,57	24,47	1,06	
PA			38,10	7,14	22,22	20,63	11,11	0,79

Locus	178	180	192	196	198	200	202	204	206	208	210
ASB2											
PSIBR	6,38			23,40		14,89	12,77	5,32	3,19	20,21	13,83
EA			2,00	4,00		6,00		16,00		72,00	
MG	6,67	6,67	5,00	8,33		25,00	26,67	11,67		10,00	
MJ	9,26	1,85	4,63	3,70	0,93	15,74	16,67	11,11		34,26	1,85
PU	3,19	1,06	2,13	5,32	8,51	28,72	17,02	6,38		27,66	
PA	4,76	2,38	8,73	7,14	7,14	27,78	11,11	8,73		22,22	

(Continuação da Tab. 9)

<i>Locus</i>	182	186	188	190	192	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212	216
ASB17																
PSIB			26,6						7,45	34,0	17,0			15,0		
EA	2,0	2,00	14,0				2,0		20,0	14,0	6,00		4,00	36,0		
MG		16,7	3,33						13,3	13,3			10,0	40,0	1,7	1,7
MJ		10,2	2,78	5,6				3,7	7,41	37,0	1,85	12,0	4,63	14,8		
PU		5,32			2,1	1,1		8,5	17,0	33,0	1,06	11,7	4,26	14,9		
PA		2,38	2,38	0,8	4,8		5,6	1,6	15,9	20,6	8,73		1,59	35,7		

<i>Locus</i>	196	198	200	204	206	208
HMS6						
PSIBR	17,02	5,32	27,66	1,06	48,94	
EA	16,00	40,00	10,00	4,00	30,00	
MG	3,33		15,00	25,00	56,67	
MJ	5,56	13,89	17,59	12,96	38,89	11,11
PU	5,32	13,83	17,02	14,89	45,74	3,19
PA	6,35	15,87	15,08	21,43	35,71	5,56

<i>Locus</i>	188	192	194	196	198	200	210	212	214	216
ASB23										
PSIBR		7,45	23,40	37,23	12,77	1,06		14,89		3,19
EA		50,00	16,00	18,00	6,00			8,00		2,00
MG	3,33	11,67	20,00	21,67	6,67			1,67		35,00
MJ		10,19	31,48	22,22	16,67			7,41		12,04
PU		2,13	25,53	36,17	8,51			18,09	2,13	7,45
PA		17,46	25,40	12,70	13,49		2,38	11,11	3,17	14,29

<i>Locus</i>	192	196	198	200	202	204	206	208	210	212
HTG10										
PSIBR	35,11	8,51	10,64	17,02		15,96			12,77	
EA		6,00	24,00			54,00	4,00		12,00	
MG	1,67	6,67	3,33	10,00	3,33	20,00		3,33	51,67	
MJ	0,93	17,59	8,33	6,48	12,96	19,44	1,85	1,85	24,07	6,48
PU	1,06	6,38	21,28	10,64	7,45	23,40		4,26	18,09	7,45
PA	2,38	1,59	9,52	23,02	15,08	15,08		8,73	24,60	

(Continuação da Tab. 9)

Continuação da Tab. 3)

Locus	192	198	200	202	204	206	208	210
HMS3								
PSIBR	43,62		22,34	4,26	11,70	17,02		1,06
EA	14,00	4,00	26,00	34,00	2,00	20,00		
MG	15,00		18,33	3,33	26,67	30,00	6,67	
MJ	11,32		15,09	15,09	28,30	18,87	1,89	9,43
PU	7,61		9,78	35,87	15,22	23,91	1,09	6,52
PA	11,11	0,79	3,17	6,35	19,05	48,41	10,32	0,79

Locus	188	196	198	200	204	206	208	210	214
LEX33									
PSIBR			23,40	40,43	3,19		26,60	6,38	
EA		10,00	34,00	6,00	30,00		6,00	14,00	
MG	16,67		36,67	5,00	15,00	1,67	20,00	5,00	
MJ	10,19	15,74	25,93	1,85	21,30	5,56	17,59	0,93	0,93
PU	4,26	13,83	39,36	5,32	15,96		21,28		
PA	7,14	8,73	44,44	1,59	15,08		15,87		7,14

Locus	192	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212
T287											
PSIBR			10,64			19,15	19,15			51,06	
EA	2,00		30,00				26,00	4,00		36,00	2,00
MG	3,33	13,33	11,67		8,33		18,33		16,67	28,33	
MJ	1,85	1,85	25,00	0,93	12,04		4,63	3,70	15,74	31,48	2,78
PU	2,13		22,34		7,45	1,06	2,13	4,26	19,15	38,30	3,19
PA	3,97		1,59		25,40	28,57	31,75	2,38		0,79	5,56

Locus	182	186	188	192	194	196	200	202	204	206	210	212	214	216
T294														
PSIBR					34,0		17,02	28,7	5,3	15,0				
EA	8,0				4,00			44,0		44,0				
MG	1,7					3,3	50,00	26,7		18,3				
MJ	5,6				2,78	6,5	10,19	57,4		17,6				
PU	3,2				3,19	7,5	5,32	55,3		25,5				
PA		7,1	1,6	7,1	18,3	3,2	38,10	0,79	15,9	0,8	1,6	1,6	2,4	1,6

(Continuação da Tab. 9)

Locus	192	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212	214
T297												
PSIBR				30,85	13,83	21,28	26,60	7,45				
EA				12,00	28,00	18,00	6,00	36,00				
MG	1,67	5,00		15,00	43,33	8,33	8,33	16,67			1,67	
MJ	3,10	2,78		11,11	20,37	20,37	13,89	20,37		0,93	6,48	
PU	3,19	2,13	1,06	18,09	36,17	21,28	3,19	7,45			7,45	
PA		34,92	12,70		11,90	1,59	1,59	2,38	3,17	19,05	7,14	5,56
Locus	186	192	194	196	198	200	202	204	206	210	212	
T301												
PSIBR				8,51	3,19	24,47	19,15	41,49	3,19			
EA				2,00		2,00	14,00	48,00	32,00		2,00	
MG			6,67	13,33	1,67	20,00	45,00	8,33			5,00	
MJ				22,22	4,63	17,59	22,22	20,37	5,56		7,41	
PU				18,09	10,64	8,51	14,89	32,98	3,19		11,70	
PA	0,79	8,73	0,79	0,79	8,73	54,76		10,32	0,79	11,11	3,17	
Locus	188	192	196	198	200	202	204	206	208	210	212	
T312												
PSIBR	5,32	12,77			35,11	23,40	1,06		19,15	3,19		
EA	2,00	14,00		2,00	48,00	6,00	8,00			20,00		
MG	5,00	23,33	5,00	11,67	10,00	1,67	11,67	13,33	10,00	8,33		
MJ	12,96	42,59		3,70	2,78	4,63	11,11	1,85	4,63	15,74		
PU	8,51	32,98	2,13	5,32	13,83	1,06	12,77		11,70	11,70		
PA	4,76	30,16		2,38	13,49	7,14	7,94	21,43	0,79	11,11	0,79	
Locus	190	192	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212
T321												
PSIBR		39,36			11,70	10,64		1,06		10,64	17,02	9,57
EA		2,00			2,00	78,00		10,00		6,00	2,00	
MG		6,67			25,00	31,67		28,33			3,33	5,00
MJ	3,70	6,48			17,59	21,30		14,81	1,85	14,81	11,11	8,33
PU	1,06	4,26		2,13	26,60	36,17		1,06	1,06	8,51	8,51	10,64
PA		7,14	6,35		23,81	22,22	7,14	7,14	15,08	0,79	7,94	2,38

(Continuação da Tab. 9)

<i>Locus</i>	186	190	192	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212
T325													
PSIBR	3,19		8,51	8,51		5,32	1,06		37,23	36,17			
EA	22,0			40,00		18,00	2,00		12,00	6,00			
MG	10,00	10,00		11,67	11,67	11,67	15,00	1,67	15,00	11,67		1,67	
MJ	4,72			16,04	2,83	21,70	39,62		8,49	3,77	2,83		
PU	8,51	3,19		17,02	6,38	17,02	25,53		11,70	8,51	2,13		
PA				18,25	2,38	11,11	22,22	9,52	7,94	17,46	8,73		2,38

<i>Locus</i>	19	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212	214	218
T333	2												
PSIBR		7,45	19,2						8,5	9,57	33,0	22,3	
EA		32,0	6,00		10,0					10,0	38,0	2,00	2,0
MG		15,0	13,3		10,0	1,67	1,67		3,3	3,33	10,0	41,7	
MJ		8,33	20,4		1,85		7,41	1,85	3,7	15,7	26,9	13,9	
PU		6,38	11,7		4,26		4,26	3,19		19,2	29,8	21,3	
PA	1,6	6,35	1,59	11,9	34,1	11,1	11,1	21,4	0,8				

<i>Locus</i>	192	194	196	198	200	202	204	206	208
T341									
PSIBR		17,02	20,21		46,81	12,77			3,19
EA		34,00	26,00		40,00				
MG	16,67	25,00	21,67	5,00	28,33		3,33		
MJ	0,94	30,19	14,15	6,60	28,30	1,89			17,92
PU	5,32	25,53	12,77	4,26	27,66	1,06	1,06		22,34
PA	10,32	26,98	22,22	0,79	24,60		11,90	1,59	1,59

<i>Locus</i>	182	194	196	198	200	202	204	206	208	210
T394										
PSIBR		21,28	12,77	20,21	21,28		19,15	5,32		
EA	18,00	18,00		26,00	20,00		8,00	10,00		
MG	1,67	20,00	3,33	11,67	5,00	25,00	18,33	15,00		
MJ	9,26	10,19	8,33	23,15	17,59	12,04	1,85	12,96	4,63	
PU	11,70	2,13	4,26	28,72	19,15	7,45	4,26	8,51	13,83	
PA			26,72		4,31	0,86	32,76	1,72	28,45	5,17

(Continuação da Tab. 9)

<i>Locus</i>	186	188	192	194	196	198	200	202	204	206	20	210	212	214	216
T343											8				
PSIBR							41,5	14,9	2,13				14,9	1,06	25,5
EA	4,0			2,00		4,0	68,0		14,0		2,0		6,00		
MG	6,7			38,3	1,7		43,3		3,33					1,67	5,00
MJ	1,9	3,70	2,8	13,0	12,0		37,0		7,41				18,5		3,70
PU	2,1	11,7	4,3	24,5	2,13		25,5		1,06			4,26	21,3	2,13	1,06
PA				11,1	2,4	3,2	7,94	37,3	1,59	36,5					

<i>Locus</i>	192	194	196	198	200	202	204	206	208	210	212
T344											
PSIBR	3,19		15,96		24,47		17,02	11,70	27,66		
EA			30,00		30,00		4,00	14,00	22,00		
MG		1,67	38,33		1,67	3,33	11,67		35,00	8,33	
MJ	1,85		36,11	0,93	1,85	2,78	10,19	2,78	31,48	11,11	0,93
PU	1,06		61,70	3,19	1,06	1,06	8,51	4,26	15,96	3,19	
PA	3,17	7,94	32,54		0,79	5,56	8,73	1,59	12,70	26,98	

<i>Locus</i>	192	194	196	198	200	202	204	206	208
HTG4									
PSIBR	0,045	0	0,080	0,193	0,216	0	0,034	0,034	0,398
EA	0,233	0	0,089	0,044	0,389	0	0,011	0,056	0,178
MG	0,244	0	0,233	0,333	0,144	0,011	0	0,033	0
MJ	0,106	0,066	0,131	0,081	0,232	0,005	0,111	0,121	0,146
PU	0,320	0	0,200	0,060	0,060	0	0,040	0,140	0,180
PA	0,1628	0,0252	0,1395	0,1356	0,2248	0,0039	0,0543	0,0814	0,1725

5.6-Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Foram usados os dados obtidos nas frequências genotípicas. Assim, observa-se na Tabela 10 os valores por *locus*/população, na qual os valores em negrito indicam desvios significativos $P < 0,05$ e $P < 0,01$. Realizaram-se testes exatos de Fisher para testar as proporções de Hardy-Weinberg (HALDANE, 1954). No caso destas populações (6) e destes marcadores (22) consideraram-se 150 testes. Os loci HTG4, AHT4, HMS7, ASB23, HMS3, T287, T294, T297, T301,

T312, T325, T333, T343 e T344 não estão em equilíbrio em apenas um grupo estudado e os loci ASB2, ASB17, HMS6, HTG10, LEX33, T321, T341 e T394 estão em equilíbrio em todos os grupos

Tabela10- Valores relativos ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Locus	PSIBR	EA	MG	MJ	PU	PA
<i>TG4</i>	0,47	1	0,00	0,23	0,78	0,69
<i>AHT4</i>	0,07	0,01	0,54	0,45	0,50	0,55
<i>HMS7</i>	0,21	0,64	0,77	0,63	0,04	0,94
<i>ASB2</i>	0,73	0,40	0,67	0,67	0,39	0,44
<i>ASB17</i>	0,64	0,41	0,65	0,47	0,64	0,40
<i>HMS6</i>	0,30	0,29	0,63	0,37	0,86	0,63
<i>ASB23</i>	0,67	0,33	0,00	0,51	0,42	0,87
<i>HTG10</i>	0,34	0,93	0,65	0,15	0,46	0,16
<i>HMS3</i>	0,02	0,90	0,17	0,64	0,31	0,98
<i>LEX33</i>	0,25	0,20	0,48	0,66	0,40	0,66
<i>T287</i>	0,77	0,29	0,09	0,12	0,50	0,03
<i>T294</i>	0,39	0,31	0,45	0,02	0,33	0,09
<i>T297</i>	0,38	0,33	0,55	0,01	0,31	0,13
<i>T301</i>	0,73	0,46	0,03	0,39	0,89	0,33
<i>T312</i>	0,64	0,57	0,21	0,44	0,02	0,80
<i>T321</i>	0,20	1	0,77	0,53	0,61	0,51
<i>T325</i>	0,04	0,71	0,19	0,06	0,98	0,54
<i>T333</i>	0,23	0,01	0,88	0,10	0,65	0,36
<i>T341</i>	0,78	0,50	0,43	0,46	0,54	0,46
<i>T394</i>	0,63	0,71	0,96	0,10	0,41	0,27
<i>T343</i>	0,44	0,42	0,17	0,30	0,76	0,00
<i>T344</i>	0,93	0,31	0,39	0,29	0,06	0,00

Valores de $P < 0,05$ e $P < 0,01$ são destacados por não se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Ainda, na mesma Tabela, ao se observar os marcadores por raças, destacam-se as raças Mangalarga e Pantaneiro que apresentam um maior

número de marcadores em desequilíbrio, ou seja, com 3 dos 22 marcadores estudados. Provavelmente os desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg são resultantes de influências ambientais.

Em geral, o equilíbrio observado nas populações estudadas demonstra uma aceitável homogeneidade gênica da espécie, resultante da proximidade dos genótipos, não obstante que cada grupo mantém a sua identidade genética.

5.7-Distâncias genéticas e árvores

Na estimativa das distâncias genéticas se incluiu a totalidade dos indivíduos tipificados. Foram calculadas quatro distâncias genéticas distintas.

Os valores obtidos pela D_A (Nei, 1973) e D_s (NEI, 1972) estão na Tabela 11, enquanto os valores obtidos pelas distâncias de Reynolds (1983) e de Dsw Shriver *et al.* (1995) estão na Tabela 12.

Levando-se em conta a raça Marajoara, objeto deste estudo, observa-se na Tabela 11, na parte superior, que as maiores distâncias genéticas obtidas, no caso a D_A , de Nei, foram com o Puro Sangue Inglês (ING e PIBR), seguindo-se Mallorquina (MAL) e Árabe (ARA e EA); as menores distâncias foram com o Puruca (PU) e Mangalarga (MG). Ainda na mesma Tabela, para a distância D_s , as maiores distâncias foram com o Puro Sangue Inglês (ING e PSIBR), Mallorquina (MAL) e Pura Raça espanhola (ESP). Para as menores distâncias repetiu-se a mesma ordem, ou seja, Puruca (PU) seguindo-se a Mangalarga (MG).

Na Tabela 12 encontram-se as distâncias de Reynolds (1983) e Shriver *et al.*, (1995). No primeiro caso, na parte superior, as maiores distâncias foram com o Árabe (ARA e EA), Puro Sangue Inglês (ING e PSIBR), e Pantaneiro (PA). As

menores foram com o Puruca (PU), Potoka (POT) e Mangalarga (MG). Do mesmo modo, no segundo caso, as maiores distâncias genéticas obtidas, foram com o Puro Sangue Inglês (ING e PSIBR) e Árabe (EA e ARA). Para as menores distâncias repetiu-se o resultado mais constante, ou seja, Puruca (PU) seguindo-se a Mangalarga (MG) e Lusitano (LUS).

Observando as duas Tabelas pode-se inferir que as matrizes obtidas, nas diferentes metodologias de cálculo, são proporcionalmente similares, pois, na maioria dos casos, as maiores distâncias estão entre a raça Marajoara e o Puro Sangue Inglês (ING e PIBR), em seguida o Árabe (ARA e EA) e o Malloquina (MAL), havendo algumas inversões nesta ordem, sendo quase constante na maior diferenciação o Puro sangue Inglês (ING e PSIBR) . Por outro lado, as menores distâncias estão sempre o Puruca (PU) e Mangalarga (MG).

Tais resultados podem indicar que a raça Marajoara iniciou um processo de diferenciação genética com o cavalo árabe há bastante tempo, não obstante esse compartilhar do conjunto gênico que lhe deu origem. Por sua vez, os dados sugerem que a raça Mangalarga tem formação recente no genoma da raça Marajoara, o que é comprovado pela pouca diferenciação observada em todos os casos. Já a raça Puruca aparece, constantemente, muito próxima da Marajoara, sugerindo que repartem o mesmo ou grande parte do mesmo conjunto gênico, isto é, não se encontra divergências entre o cavalo Marajoara e o mini cavalo Puruca, pelo contrário, observa-se que estes grupos estão muito próximos geneticamente.

A partir da matriz de distância D_A construí-se as árvores de distância segundo o método UPGMA (Figura 26). Na qual estas afirmações podem ser

constatadas quando se observa claramente que os grupos genéticos mais distantes da raça Marajoara são PA, ARA, MAL, ING e PSIBR e as mais próximas são o PU, MG; LOS, POT, LUS e ESP.

Vale a pena ressaltar que as árvores obtidas não dão informação sobre a evolução das populações e tampouco quais são as mais antigas ou mais modernas e sim as relações genéticas entre as populações estudadas.

Com o método UPGMA, os valores de replicação são maiores, obtendo-se árvores com maior consistência e as diferenças estão mais de acordo com a porcentagem de replicações que geram cada ramo.

Assim, observa-se, claramente, grande proximidade genética entre as raças Marajoara e Puruca, com valor de “bootstrap”, demonstrando total confiabilidade (100%), mostrando pouca diferença dos genomas, onde os cruzamentos absorventes na raça Puruca fizeram com que, hoje, se possa considerar esta raça como um verdadeiro reservatório de genes para a raça Marajoara, não obstante as diferenças fenotípicas, que nada mais são que o resultado de uma forte pressão de seleção, sobre poucos caracteres, principalmente com base em características morfológicas, destacando-se a altura.

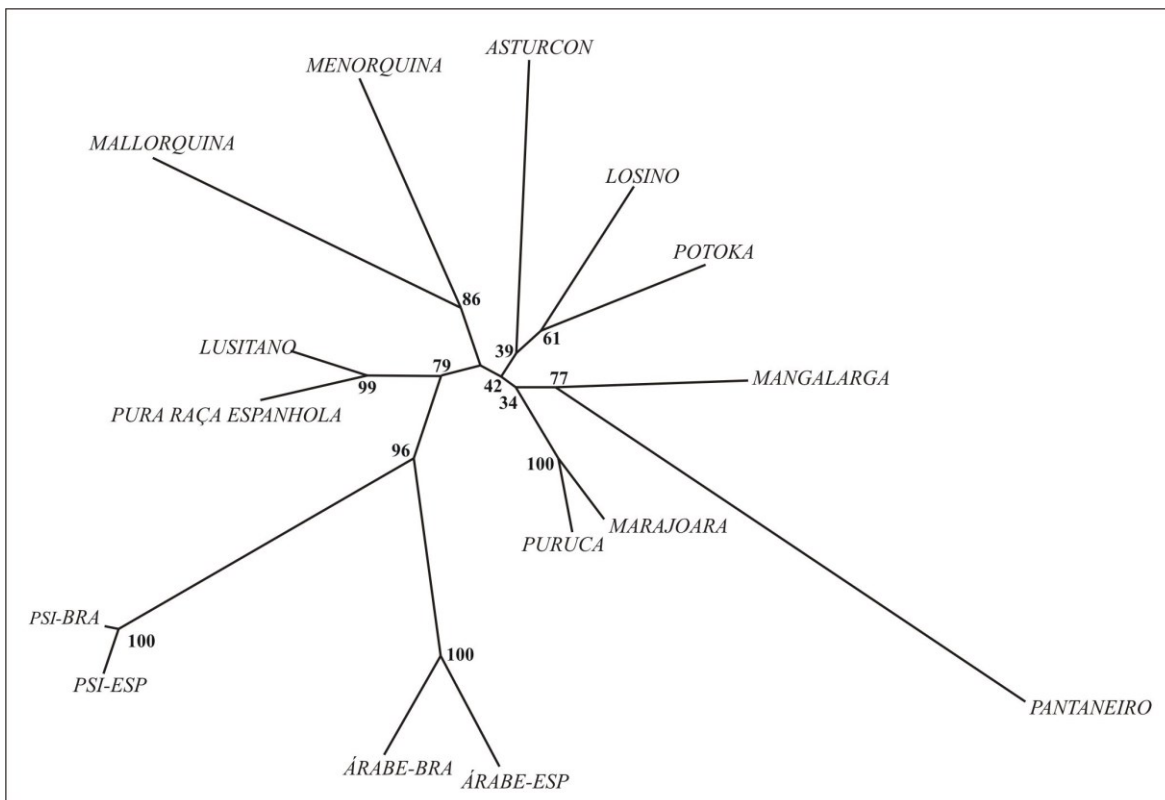


Figura 26 - Árvore de Distância Genética. Obtida com o Método UPGMA Nota: PSI-BRA= PSIBR; PSI-ESP= ING.

Tal fato vem ocorrendo desde a formação desta última, ressaltando-se que o fluxo genético entre as mesmas é contínuo, tendo, principalmente o Marajoara como raça absorvente em muitos casos. Em outros, para se obter animais de menor porte, como é o caso do mini- cavalo Puruca, usa-se o macho desta raça com fêmeas Marajoaras de boa procedência, principalmente devido a comercialização que, no Puruca, atinge maior preço.

Por outro lado, observa-se que estas duas raças estão em processo de estabilização sob o ponto de vista genético e o que pode comprometer tal fato é o fluxo gênico indiscriminado com outras raças introduzidas, colocando em risco de descaracterização o grupamento que possuir menor número de animais. Soma-se a isto o fato de serem raças com base em rebanhos fundadores com pouca

diversidade e tempo de formação, haja vista que o início de todo o processo ocorreu há pouco mais de cem anos.

Com a informação proporcionada pelos resultados obtidos é possível realizar uma boa gestão dos rebanhos e elaborar um programa de melhoramento, recuperação e conservação que impeça que duas das populações de cavalos mais características da Amazônia possam desaparecer e, ainda, otimizar os acasalamentos entre indivíduos que sejam geneticamente mais distintos, reduzindo-se o risco de aumentar a endogamia o que seria drástico para o manejo dos grupos, em função da pouca informação que os criadores dispõe, o que os leva às decisões equivocadas, que podem levar ambos os grupos à perda da identidade genética .

A árvore individual (Figura 27), construída a partir das distâncias genéticas dos 274 indivíduos, distribuídos em seis raças, mostra a formação de grupamentos bem nítidos envolvendo todas as raças.

As raças Marajoara e Puruca apresentam-se misturadas como era de se esperar e, observa-se que, apesar dos cruzamentos indiscriminados que ocorrem entre as mesmas, elas se apresentam homogêneas, como um núcleo bem definido, compartilhando os mesmos genes.

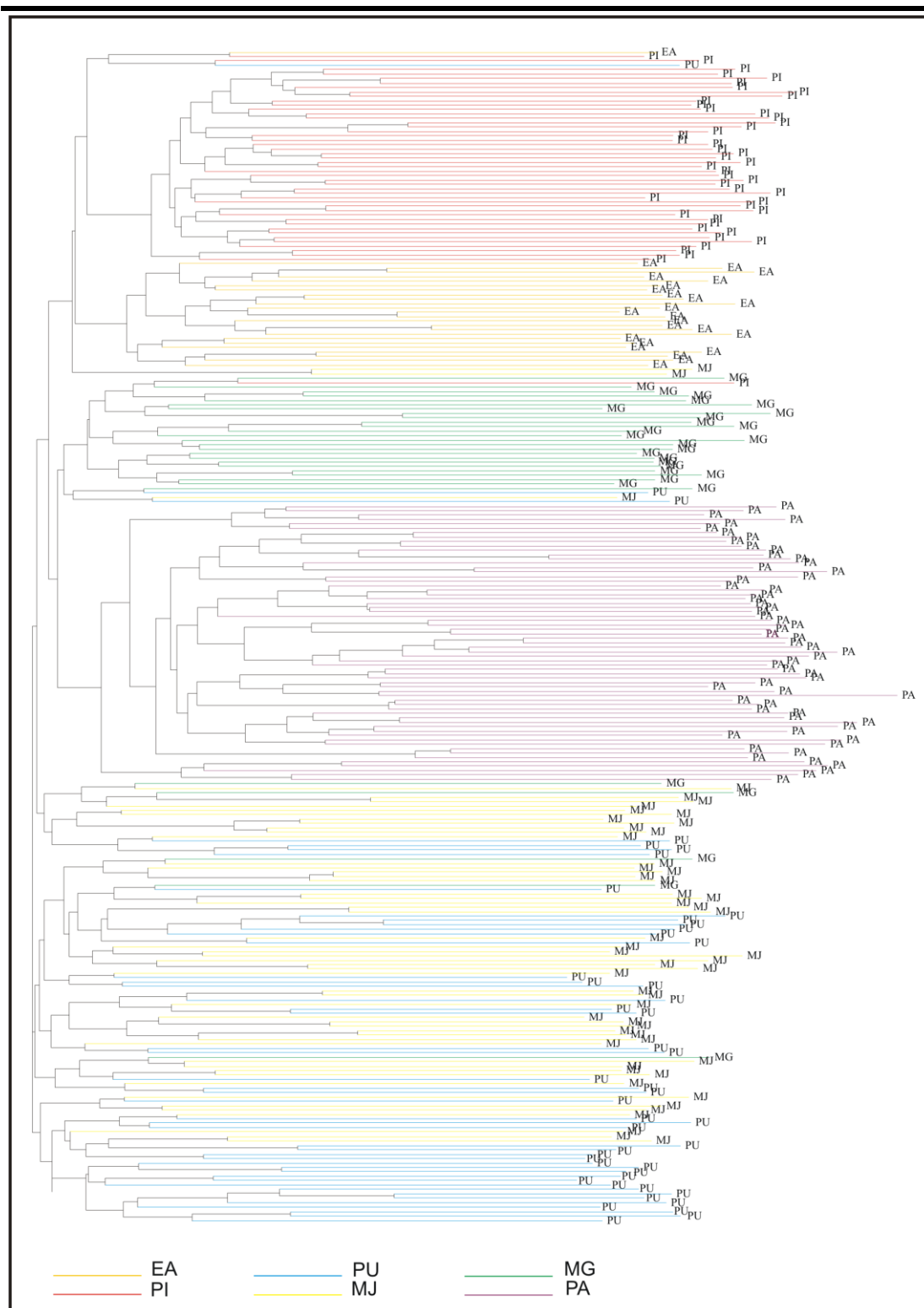


Figura 27 – Árvore individual. Nota: PI=PSIBR

5.8-Análise de Componentes principais

Os resultados da análise dos componentes principais (Figura 28) mostram um claro agrupamento das variedades brasileiras, confirmando as distâncias

obtidas no dendograma anteriormente mostrados. Observa-se que as raças Marajoara e Puruca estão mais próximas entre si que as demais, demonstrando, como se observa na análise de distância genética, a proximidade dos genomas e pouco divergentes da Mangalarga. As mais divergentes são Puro Sangue Inglês e Árabe que formam grupos bem definidos.

O primeiro e o segundo componente explicaram 45,13% e 25,28%, respectivamente, somando 70,41% da variação total observada entre as raças estudadas.

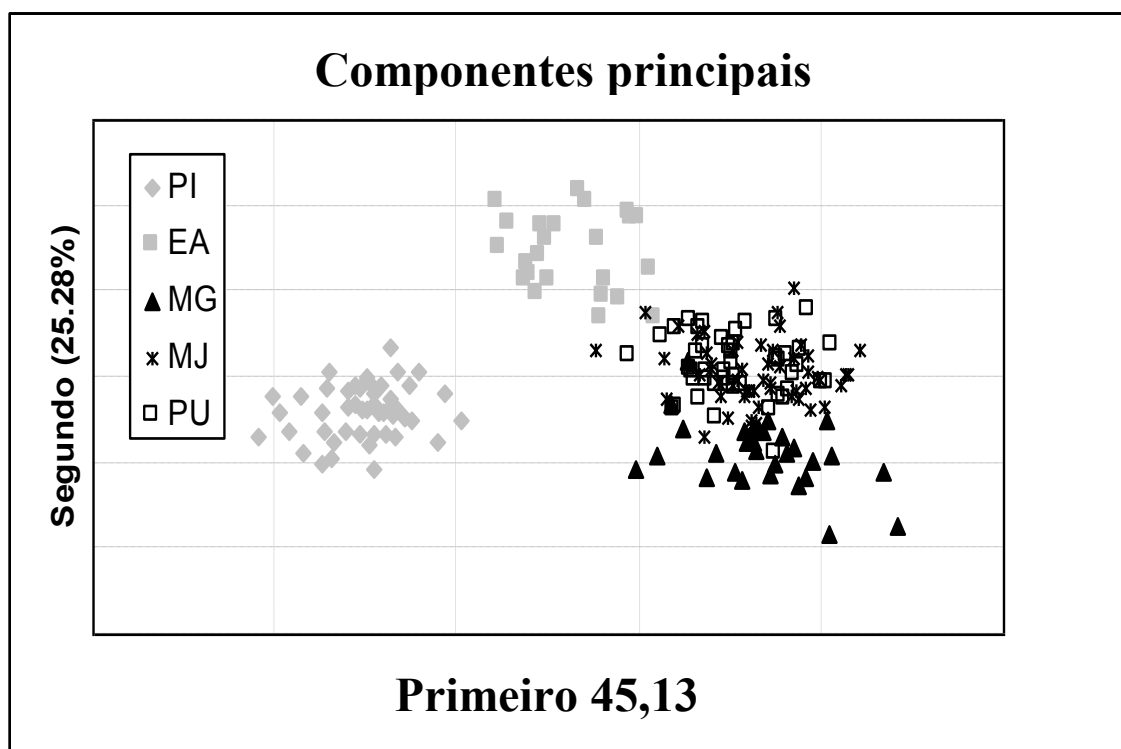


Figura 28- Análise de componentes principais. Nota PI= PSIBR

6-CONCLUSÕES

- Os valores significativos de distâncias genéticas obtidos mostram o cavalo Marajoara bem estruturado geneticamente, muito próximo do Puruca e bastante diferenciado das outras raças;
- O número de alelos detectados e os valores das heterozigosidades, mostraram que existe variabilidade genética moderada nos grupos estudados;
- A raça Puruca pode ser utilizado como reservatório genético para a raça Marajoara e vice-versa;
- Os grupos genéticos Marajoara e Puruca devem continuar nos programas de conservação genética para proteção do germoplasma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. M. P. **Estudios acerca de las relaciones mercantiles entre España y Portugal**. Cadiz: Imprenta Ibérica, 1880. 112p.

ÁLVAREZ, M. F. **El siglo XVI. Economía. Sociedad. Instituciones**. Madrid: Ed. Espasa Calpe, 1996. 749p.

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: 501-508. **Proceedings**. Guelph, 1994.

BATES, S.; PETERSON-KNABE, C.; HOLM, T.; VAN HAERINGEN, H.; LANGE, K.; ZIEGLE, J.; HEYEN, D.; DA, Y. & LEWIN, H. **XXVth International Conference on Animal Genetics**. Tours. 1996.

BECK, S. L. **Eqüinos: raças, manejo e equitação**. 2. ed. São Paulo: Criadores. 1989. p. 397- 402.

BELKHIR, K. **Genetix: Logiciel sous windowsTM por la génétique des populations**. En: Laboratoire Génome, PopulationS, Interactions. Vol. CNRSUPR. 9060. 2001.

BETHELL, L. **Historia de América Latina**. V. 3. América Latina colonial: economía. Barcelona: Crítica, 1990. 416p.

BINNS, M. M.; HOLMES, N. G.; HOLLIMAN, A.; SCOTT, A. M. 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.

BLIN, N.; STAFFORD, D. W. Isolation of high molecular weight DNA. **Nucleic Acid Research**. 3, 2303-2308.1976.

BOWTELL, D. Rapid isolation of eukariotic DNA. **Analytical Biochemistry**. 162, 463-465.1987.

BOWCOCK, A. M.; RUIZ-LINARES, A.; TOMFOHRDE, J.; MINCH, E.; KIDD, J. R.; CAVALLI-SFORZA, L. L. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. **Nature**, v. 368, p. 455-457, 1994.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLMICK, H.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal Animal Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BREEN, M.; LINDGREN, G.; BINNS, M. M.; NORMA, J.; IRVIN, Z.; BELL, K.; SANDBERG, K.; ELLEGREN, H. Genetical and physical assignments of equine

microsatellites - First integration of anchored markers in horse genome mapping. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 267-273, 1997.

BUDOWLE, B. **AMPFLPS-Genetic markers for forensic identification**. *Crime Laboratory Digest*.v. 18, 134-136.1991.

BULL, L. N.; PABÓN-PEÑA, C. R.; FREIMER, N. B. Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. **Genome Research**, v. 9, p. 830-838, 1992.

BURSTIN, J.; CHARCOSSET, A. Relationship between phenotypic and marker distances: theoretical and experimental investigations. **Heredity**. V. 79, 477-483. 1997.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; CASKEY, C. T. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. **PCR protocols: A Guide to Methods and Applications**. Eds. Innis, M., Gelfand, D., Sninski, J., White, T. Orlando. p. 272-281.1989.

CHAMBERLAIN, J. S.; GIBBS, R. A.; RANIER, J. E.; NGUYEN, P. N.; CASKEY, C. T. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic Acid Research**. V. 16, 11141-11156. 1988.

CAÑON, J.; CHECA, M. L.; CARLEOS, C.; VEGA-PLA, J. L.; VALLEJO, M., DUNNER, S. The genetic structure of Spanish celtic horse breeds inferred from microsatellite data. **Animal Genetics**, v. 31, p. 39-48, 2000.

CARDIM, F. **Tratados da terra e gente do Brasil**. Lisboa: Comissão Nacional para as Comemorações dos Descobrimentos Portugueses, 2000. 337p.

CASTEJÓN, R. Razas primitivas caballares de la Península Ibérica. **Archivos de Zootecnia**, v. 2, n. 5, p. 3-10, 1953.

CIULLA, T. A.; SKLAR, M.; HAUSER, S. L. A simple method for DNA purification from peripheral blood. **Analytical Biochemistry**. v. 174, 485-488. 1988.

CROSSA, J.; HERNANDEZ, C. M.; BRETTING, P.; EBERHART, S. A.; TABA, S. Statistical genetic considerations for maintaining germplasm collections. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 86, 673-678.1993.

DAVID, L. G.; DIBNER, M. D.; BATTEY, J. F. **Basic Methods in Molecular Biology**. Elsevier. New York. 1986.

EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. **Situação atual da caracterização genética animal na empresa recursos genéticos e biotecnologia**. In: II SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE – SIRGEALC. Brasília. 1999. **Anais...** Brasília. 1999.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE M, S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais, **Archivos de Zootecnia**, v. 51: 39-52. 2002.

ELLEGREN, H.; JOHANSSON, M.; SANDBERG, K.; ANDERSSON, L. Cloning of highly polymorphic microsatellites in horse. **Animal Genetics**, v. 23, p. 133-142, 1992.

FAO, **Secondary Guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans: Management of small populations at site**, Rome: FAO, 1998. 215 p.

FELSESTEIN, J. PHYLIP (**Phylogeny Inference Package**) Version 3.5c. University of Washington. 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1996. 220p.

FRIES, R.; EGGEN, A.; STRAZINGER, G. The bovine genome contains polymorphic microsatellites. **Genomics**. V. 8, 403-406. 1990.

GALL, J. G. Chromosome structure and c-value paradox. **Journal of Cellular Biology**, v. 91, 3-14. 1981.

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

GÂNDAVO, P. M. **Tratado de terra do Brasil**. In: Coleção de notícias para a história e geografia das nações ultramarinas que vivem nos domínios portugueses, ou lhes são vizinhos. Academia Real das Ciências de Lisboa, Tomo IV, n. IV, 1826.

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

GROBET, L.; SCHWERS, A.; ROUPAIN, J.; JANSET, R. Les empreintes gènétiques et autres marqueurs dans les contrôles de filiation chez les animaux domestiques. **Annales de Médecine Veterinaire**, 135, 245-253. 1991.

GROSS, D. S.; GARRAD, W. T. The ubiquitous potential z-forming sequence of eukaryotes (dT-dG)_n(dA-dC)_n is not detectable in the genomes of eubacteria, archaebacteria or mitochondria. **Molecular Cell Biology**. v. 6, 3010-3013. 1986.

GOUDET, J. **FSTAT Version 2.9.3.2 for windows**: a computer program to calculate F-statistics Disponível em <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.

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

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. (1992). **Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles**. 48: 361-372.

HALDANE, J. B. S. The combination of linkage values and the calculation of distance between the loci of linked factors. **J. Genetic**. v. 8. p. 299-309. 1954.

HAMADA, H.; SEIDMAN, M.; HOWARD, B. H.; GORDMAN, C. M. Enhanced gene expression by the poly (dT-dG) poly (dA-dC) sequence. **Molecular Cell Biology**. v. 4, 2622-2630. 1984.

HENSON, E. L. **In situ conservation of livestock and poultry**. *FAO Animal Production and Health*. Paper 99. FAO/UNEP. Rome. 1992.

HETZEL, J. Livestock genome research on march. **Nature Genetics** 4: 327-328, 1993.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. **Electroforesis**. 6, 103-112. 1985.

HURST, G. D. D.; HURST, L. D.; MAJERUS, M. E. N. Selfish genes move sideways. **Nature**. 356, 659-660. 1992.

<http://www.pge.cnrs.gif.fr/bioinfo/populations/index.php>.

INNIS, M. A.; MYAMBO, K. B.; GELFAND, D. H.; BROW, M. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**. 85, 9436-9440. 1988.

INTERAGRO LUSITANOS. **O cavalo Lusitano**. Ed. Interagro. 1992 <http://www.lusitano-interagro.com>

JEANPIERRE, M. A rapid method for the purification of DNA from blood. **Nucleic Acid Research**. 15-22. 1987

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**. 314, p. 67-73. 1985.

KAWASAKI, E. **Sample preparation from blood, cells and other fluids. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. p. 146-152. Academic Press

Inc., New York. 1990.

LANGELA, O. (2002) **Populations 1.2.28**. CNRS UPR9034. <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php>

LEAR, T.L.; BRANDON, R.; BELL, K. Physical mapping of ten equine dinucleotide repeat microsatellites. **Animal Genetics**, v. 30, p. 235, 1999.

LEBART, L.; MORINEAU, A.; TABARD, N. Statistique de la descrição das técnicas. Paris: Dunod.1977.

LOCH, S. **The royal horse of Europe. The story of the Andalusian and Lusitano**. London: Ed. J. A. Allen, 1986. 266 p.

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; et al. J. **Molecular Cell Biology**. W. H. Freeman and Company, 4 ed., 1999. 1084 p.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **America Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 398-401, 1989.

MACFADDEN, B.J.; HUBBERT, R.C.: Explosive speciation at the base of the adaptive radiation of Miocene grazing horses. *Nature*, 336: 466-68.1988.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory handbook**. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 1982.

MARQUES, J. R. F. M; COSTA, M. R; SILVA, A. O. A. da. Banco de Recursos Genéticos Animais. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 21, p. 32-39, 2001.

MARIANTE, A. S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da História do Brasil**. Brasília: Embrapa Sede. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

MARKLUND, S.; ELLEGREN, H.; ERIKSSON, S.; SANDBERG, K.; ANDERSSON, L. Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. **Animal Genetics**, v. 25, p. 19-23, 1994.

MARTINEZ, A. **Caracterización genética del cerdo Ibérico mediante marcadores moleculares**. Faculdade de veterinária. Universidade de Córdoba. Tese de doutorado. 2001. 157 p.

MIRANDA NETO, M. J. **Desafio da Amazônia, aspectos da reação a modelos exógenos de desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Record. p. 180. 1976.

MIRANDA NETO, M. J. **Marajó: desafios da Amazônia**. 2 ed. Belém: CEJUP, 1993.

MOAZAMI-GOUDARZI, K. ; VAIMAN, D. ; MERCIER, D. ; GROHS, C. ; FURET, J. P. ; LEVEZIEL, H. ; Martin, P. (1994). Emploi de microsatellites pour l'analyse de la diversité génétique des races bovines françaises: premiers resultants. **Genetics Selection and Evolution**, 26, 155-165. 1994.

MOORE S. S.; SARGEANT L. L.; KING, T. J.; MATTICK, J. S.; GEORGES, M.; HETZEL, D. J. S. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics** ,10, 654-660, 1991.

MORRISON, D. F. **Multivariate statistical methods**. McGraw-Hill. New York. 1967.

MULLIS, K.; FALCOMA, F.; SCHARF, S.; SNIKL, R.; HORN, G. T.; ERLICH, H. . Specific amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**. 51, 260.1986.

MÜHLEN, G. S. **Avaliação da diversidade genética de etnovarietades de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) com marcadores de DNA: RAPD, AFLP e Microsatélites**. Piracicaba, 176 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1999.

MURPHY, K. E.; STRINGER, J. R. Recombination independent recombination of poly d(GT)-d(CA) in PBR322. **Nucleic Acid Research**. 14, 7325-7340.1986.

NAKAMURA, Y.; LEPPERT, M.; O'CONNELL, P.; WOLFF, R.; HOLM, T.; CULVER, M.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIN, E.; WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**. 235, 1616-1622.1987.

NEI, M. Genetic distance between populations. **American Naturalist**, v. 106, p. 283-292, 1972.

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

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

NORDHEIM, A.; RICH, A. The sequence (dC-dA)_n(dG-sT)_n forms left-handed Z-DNA in negatively supercoiled plasmids. **Proceedings of the National Academy of the Sciences**. USA. 80, 1821-1825. 1983.

OTA, T. **Distance and Phylogenetic Analysis (DISPAN)**. Computer software distributed by author. 1993.

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

REYNOLDS, J. Estimation of the coancestry coefficient basis for a short-term genetic distance. **Genetics**. 105, 767-779. 1983.

RIBEIRO, D. B. **O cavalo: raças, qualidades e defeitos**. 3 ed. São Paulo: Globo, 1993. 318 p.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. (1990). Optimization of annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acid Research**. 18, 6409-6412. 1990.

RUANE, J. **Selection breeds for conservation**. p. 59-73. In: Genebanks and the management of farm animal genetic resources. Netherlands: Ed. J.K.Oldenbroek, 1999. 119p.

RUIZ-LINARES, A. **Microsatellites and the reconstruction of the history of human population**. p. 183-197. In: Goldsteni, D. B., Schlötterer, C. Microsatellites. Evolution and Applications. New York: Oxford University Press, 1999. 352p.

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

SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. 1350-1354. 1989.

SERENO, F. T. P. S. **Caracterización genética del caballo pantaneiro**. Tese de doutorado. Faculdade de veterinária. Universidade de Córdoba, 2002. 126 p.

SHIUE, Y.-L.; BICKEL, L. A.; CAETANO, A. R.; MILLON, L. V.; CLARK, R. S.; EGGLESTON, M. L.; MICHELMORE, R.; BAILEY, E.; GUÉRIN, G.; GODARD, S.; MICKELSON, J. R.; VALBERG, S. J.; MURRAY, J. D.; BOWLING, A. T. A synteny map of the horse genome comprised of 240 microsatellite and RAPD markers. **Animal Genetics**, v. 30, p. 1-9, 1999.

SHRIVER, M. D.; JIN, L.; BOERWINKLE, E.; DEKA, R.; FERRELL, R. E.; CHAKRABORTY, R. A. NOVEL. Measure of genetic distance for highly polymorphic tandem repeat *loci*. **Molecular Biology Evolution**, v. 12, p. 914-920, 1995.

SILVA, A. C. M e. **Caracterização Genética de Cavalos Naturalizados Usando Marcadores Microssatélites**. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 69 p. 2006.

SILVA, A. C. M. e. **Caracterização Genética de cavalos naturalizados usando marcadores microssatélites**. Dissertação de mestrado. Faculdade de agronomia e medicina veterinária. Universidade de Brasília. 2006.

SLATKIN, M. A. Measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.

SLIGHTTON, J. L.; BLECHL, A. E.; SMITHIES, O. Human fetal G and A globin genes: complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. **Cell**. 21, p. 627-638. 1980.

SMITH, C. Genetic aspects of conservation in farm livestock. *Livestock Production Sciences*. 11, p. 37-48. 1984.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, H. H. **Numerical taxonomy**: the principle and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman and Company. 1973. 573p.

SOUZA, M. R.; FERNANDES, M. C.; BOULHOSA, M. S. **Marajó – um pólo ecoturístico da Amazônia**. Associação dos Municípios do Arquipélago de Marajó; elaboração e execução do projeto M&M – Consultoria e Assessoria em Turismo. Belém-PA. p. 76.1998.

SUSOL, E; EYRE, S; JOHN, S. High-throughput genotypin of microsatellite markers. p 49-66. In: HAJEER, A; WORTHING, J.; JOHN, S. SNP and microsatellite genotyping markers for genetic analysis. USA: Eaton Publishing, 2000. 152P.

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

STALLINGS, R. L.; FORD, A. F.; NELSON, D.; TORNEY, D. C.; HILDEBRAND, C. E.; MOYZIS, R. K. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. **Genomics**. 10, p. 807-815.1991.

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G. A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, v. 322, p. 652-656. 1986.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acid Research**. 17, p. 6463-6471. 1989

TEIXEIRA, J. C. Condicionamentos históricos e ecológicos do Cavalo marajoara. **O Cavalo marajoara**, n. 12, p. 13, 1995b.

TORRES, A. P; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros eqüinos**. 3 ed. São Paulo: Nobel, 654 p.1992.

TORRES, A. D. P.; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros eqüinos**. São Paulo: Ed. Nobel. 1977. 654p.

TOZAKI, T.; KAKOI, H.; MASHIMA, S.; HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; MIURA, N.; CHOI-MIURA, N. H.; TOMITA, M. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite *loci*. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 63, p.1191-1197, 2001.

VAN HINTUN, T. J. L. **Drowning in the genepool**: Managing genetic diversity in genebank collections. Swedish University of Agricultural Sciences. Svalöv. 1994.

VIVES, J. V. **Historia social y economica de España y América**. Barcelona: Vicens-Vives, Barcelona. 1977. 584p.

WANG, W.; FUKUDA, M.; KISHIDA, T.; TAMAKI, Y. Quintuplex PCR-amplification of microsatellites. **Japanese Journal Legal Medicine**, v. 50, p. 231-236, 1996.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396, 1989.

WEBER, J. L. Informativeness of human DNA (dC-dA)_n.(dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**. v. 7,p. 524-530.1990

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

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. The theory of gene frequencies. Chicago: University of Chicago. v. 2 1969.

WINTER, A. K.; FREDHOLM, M.; THOMSEN, P. D. Variable (dG-dT)_n.(dC-dA)_n sequences in the porcine genome. **Genomics**. v. 12, p. 281-288.1992

ANEXOS

Trabalhos publicados relativos à tese:

COSTA, M. R; MARQUES, J. R. F; VEJA-PLA, J. L; BERMEJO, J. V. D; SAMPAIO, M. I. da C.; RODRÍGUES-GALLARDO, P. P. Variabilidade genética de eqüinos da Amazônia Brasileira. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. V. 35, p. 48-51. 2005.

COSTA, M. R; MARQUES, J. R. F; VEJA-PLA, J. L; SAMPAIO, M. I. da C; LEON, J. M; DELGADO, J. V. Conservação e Caracterização genética de eqüinos da raça marajoara na ilha de Marajó-Pará-Brasil. **VI Simpósio Iberoamericano sobre Conservación y Utilización de Recursos Zoogenéticos** CYTED-Chiapas. 2005.

COSTA, M. R; VEGA-PLA, J. L; RODRÍGUES-GALLARDO, P. P; SAMPAIO, M. I. da C.; MARQUES, J. R. F; DELGADO, J. V. Genetic Variability of Brazilian Horses. **Revista de Sanidad de las Fuerzas Armadas de España**. V. 61, p. 221-222. 2005

VEGA-PLA, J. L; CALDERÓN, J; RODRÍGUES-GALLARDO, P. P; ALCAIDE, B; SERENO, F. T. P. S; COSTA, M. R; PÉREZ-PINEDA, E; MARTÍNEZ, A. M; BELGADO, J. V; RICO, C. The Retuertas Horse: The “missing link” in the iberoamericanas horse breeds origin. **Conservation genetics of endangered horse breeds**. p.167-176.188p.2005.

Tabela 11.- Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo método D_A (Nei 83) em cima da diagonal e segundo o método estandar D_s (Nei 72) embaixo da mesma.

	ARA	EA	ESP	LUS	ING	PIBR	AST	LOS	POT	MAL	MEN	MG	MJ	PU	PA
ARA		0,07	0,19	0,18	0,22	0,21	0,22	0,23	0,23	0,28	0,24	0,24	0,18	0,17	0,35
EA	0,11		0,17	0,16	0,21	0,20	0,23	0,22	0,24	0,27	0,24	0,23	0,18	0,18	0,35
ESP	0,36	0,36		0,06	0,20	0,19	0,17	0,15	0,15	0,19	0,16	0,17	0,13	0,13	0,28
LUS	0,33	0,33	0,36		0,20	0,19	0,16	0,14	0,14	0,18	0,15	0,16	0,12	0,13	0,26
ING	0,46	0,46	0,33	0,36		0,02	0,27	0,27	0,26	0,27	0,27	0,22	0,20	0,21	0,34
PIBR	0,41	0,41	0,46	0,33	0,36		0,25	0,26	0,25	0,27	0,25	0,22	0,20	0,20	0,32
AST	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,14	0,17	0,22	0,21	0,17	0,17	0,16	0,30
LOS	0,37	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,11	0,22	0,16	0,15	0,13	0,12	0,25
POT	0,43	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,20	0,17	0,15	0,12	0,12	0,25
MAL	0,46	0,46	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,18	0,20	0,19	0,19	0,33
MEN	0,42	0,42	0,46	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,18	0,16	0,15	0,31
MG	0,43	0,43	0,42	0,46	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,11	0,13	0,23
MJ	0,31	0,31	0,43	0,42	0,46	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,30		0,05	0,23
PU	0,29	0,29	0,31	0,43	0,42	0,46	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,36		0,24
PA	0,62	0,62	0,29	0,31	0,43	0,42	0,46	0,43	0,37	0,37	0,41	0,46	0,33	0,45	

Nota: Destacam-se as menores distâncias.

Tabela 12-. Matriz de distâncias genéticas entre populações obtidas segundo método de Reynolds et al (1983) em cima da diagonal e de Shriver et al (1995) Dsw embaixo da mesma.

	ARA	EA	ESP	LUSI	ING	PIBR	AST	LOS	POT	MAL	MEN	MG	MJ	PU	PA
ARA		0,03	0,11	0,10	0,14	0,13	0,12	0,12	0,12	0,14	0,13	0,12	0,09	0,09	0,16
EA	0,30		0,09	0,08	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11	0,12	0,12	0,12	0,08	0,08	0,15
ESP	0,63	0,62		0,02	0,10	0,09	0,08	0,07	0,07	0,08	0,07	0,08	0,05	0,05	0,12
LUS	0,54	0,42	0,18		0,10	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,05	0,05	0,11
ING	0,83	0,79	0,64	0,57		0,00	0,13	0,12	0,10	0,13	0,13	0,10	0,08	0,09	0,13
PIBR	0,74	0,78	0,58	0,55	0,08		0,12	0,11	0,10	0,12	0,11	0,10	0,08	0,08	0,13
AST	0,61	0,78	0,57	0,50	1,12	1,04		0,06	0,07	0,10	0,09	0,06	0,06	0,06	0,12
LOS	0,60	0,70	0,48	0,43	0,94	0,86	0,37		0,04	0,10	0,08	0,06	0,05	0,05	0,09
POT	0,61	0,73	0,53	0,56	0,84	0,84	0,45	0,39		0,08	0,08	0,05	0,04	0,05	0,09
MAL	0,70	0,68	0,47	0,43	0,76	0,70	0,70	0,52	0,62		0,07	0,08	0,06	0,07	0,13
MEN	0,53	0,65	0,42	0,38	0,84	0,70	0,46	0,38	0,50	0,38		0,07	0,06	0,06	0,12
MG	0,61	0,76	0,47	0,45	0,88	0,80	0,42	0,35	0,46	0,56	0,40		0,04	0,05	0,08
MJ	0,53	0,56	0,34	0,29	0,59	0,55	0,49	0,34	0,33	0,40	0,37	0,29		0,01	0,08
PU	0,51	0,57	0,32	0,28	0,66	0,58	0,44	0,25	0,40	0,32	0,25	0,30	0,15		0,09
PA	0,92	1,01	0,84	0,78	1,01	0,89	0,73	0,63	0,63	0,74	0,64	0,54	0,51	0,63	