



VARIABILIDADE GENÉTICA DE EQUINOS DA AMAZONIA BRASILEIRA

Caracterização de recursos genéticos animais

Fotografias e ilustrações cedidas pelos autores

INTRODUÇÃO

Os recursos genéticos animais existem na forma de várias raças e populações de animais domésticos que evoluíram e se adaptaram ao longo dos séculos às mais diferentes condições ambientais existentes no mundo. A pressão de seleção imposta pelo clima, tipo de solo, altitude, oferta alimentar, doenças endêmicas, parasitismo, manejo tradicional e demanda de mercado resultou em centenas de raças, linhagens e tipos, que possuem composição genética própria e adaptada a nichos ecológicos específicos (Abreu, 1998).

Através da história o cavalo tem deixado sua marca de um animal selvagem, um verdadeiro símbolo de liberdade e utilizado pelo homem primitivo como fonte de alimento. Após a sua domesticação passou a ser figura central nas atividades relacionadas às artes, escultura, poesia, guerra, transporte, lazer e esporte. Portanto, esses animais têm importância tanto sócio-cultural como econômica, além de se prestarem ao desenvolvimento de trabalho, nas mais diversas formas (Torres & Jardim, 1992).

No Brasil, os primeiros equinos chegaram com as capitânicas hereditárias que, em geral, constituem os estados de hoje, não existindo até aquele momento nenhuma espécie de equídeos no continente brasileiro. Os mandatários das capitânicas de São Vicente, Bahia e Pernambuco teriam importado esses animais da Ilha da Madeira e das Canárias, no ano de 1534 (Teixeira, 1995b).

Segundo o levantamento agropecuário realizado pelo IBGE, no ano 2000, o Brasil tem uma população de 5.831.817 de equinos distribuídos em raças de cavalos nativos e naturalizados.

Dentre as diversas raças de cavalos originadas no Brasil pode-se destacar as Marajoara e Puruca na ilha de Marajó, no Pará e a Mangalarga.

O Marajoara é originário de cavalos da Península Ibérica, principalmente do Puro Sangue Lusitano, que foram introduzidos no século XVII, inicialmente, em Belém, no estado do Pará, porém, em virtude da alta prolificidade e do pequeno espaço disponível na cidade em fase de formação, foram trasladados para a ilha Grande Joanes, hoje ilha de Marajó (Teixeira, 1995b).

Dada a importância regional desses animais, em 1979, foi fundada a associação nacional de criadores da raça Marajoara, sob a denominação de Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Marajoara (A.B.C.C.R.M.), tendo como uma das finalidades básicas, promover o desenvolvimento, o melhoramento e a divulgação da mesma.

O padrão da raça é provisório e



Figura 1. Animais da raça Marajoara do BAGAM - Embrapa Amazônia Oriental

Maria Rosa Costa

Eng. Agro., M.Sc. em Genética
Embrapa Amazônia Oriental
CP - 48
66.095-100 - Belém - PA - Brasil
CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
mariabrosab@hotmail.com

José Ribamar Felipe Marques

Zootecnista., Dr. em Genética
Embrapa Amazônia Oriental
CP - 48
66.095-100 - Belém - PA - Brasil

Jose Luis Vega-Pla

Doutor em Veterinária
Laboratório de Genética Molecular
Servicio de Cria Caballar y Remonta-ES

Juan Vicente Delgado Bermejo

Doutor em Veterinária
Universidade de Córdoba - Departamento de Genética - ES.

Maria Iracilda da Cunha Sampaio

Méd. Veterinária - Dra. em Genética
Campus de Bragança - UFPA - Belém - PA - Brasil

Pedro Pablo Rodríguez Gallardo

Doutor em Veterinária
Laboratório de Genética Molecular
Servicio de Cria Caballar y Remonta - ES

relata que o animal deve apresentar um porte médio, bem proporcionado e musculatura definida. Demonstrando um temperamento enérgico, vivo e ativo, embora suas características atuais demonstrem que esteja em processo de descaracterização, principalmente pelos cruzamentos indiscriminados que ocorrem com raças como: Mangalarga, Quarto de Milha, Árabe, dentre outras, alterando o padrão do cavalo Marajoara. Atualmente, dada à falta de ordenamento nas cobrições, há poucos animais bem padronizados. O efetivo atual está em torno de 150.000 cabeças, a grande maioria mestiçada com outras raças, principalmente a Mangalarga Paulista, o Puro sangue Inglês e Árabe (Marques et al., 2001).

Por sua vez, o mini-cavalo Puruca é o resultado de cruzamentos do cavalo Marajoara com pôneis da raça “Shetland”, oriundos da França. Desse cruzamentos foram selecionados animais, cuja principal característica era a altura padrão de 1,18 m (Teixeira, 1995 b).

Segundo a associação de criadores da raça o Puruca é uma subespécie distinta, possuindo inúmeras características morfológicas que o diferenciam de outras raças. Apresenta temperamento enérgico, vivo, ativo e dócil, com o andamento na forma de trote. As suas principais características e funções são de: animal de serviço, atrativo nas fazendas, com grande resistência aos locais pantanosos, adaptação ao clima da região e velocidade a galopes curtos.

O cavalo Mangalarga é tipicamente brasileiro e surgiu há cerca de 200 anos na Comarca do Rio das Mortes, no Sul de Minas Gerais, através do cruzamento de cavalos da raça Alter trazidos da Coudelaria de Alter do Chão, em Portugal, com outros cavalos selecionados pelos criadores daquela região mineira. Tem como função principal a marcha, que é distinta das outras encontradas nos demais marchadores do mundo. É de temperamento ativo e dócil e sua rusticidade é observada, também, na facilidade de adaptação a quaisquer terrenos e climas como o tropical, o tempera-



Figura 2. Mini-cavalos da raça Puruca – Faz. Paraíso – Retiro Grande – Marajó

do ou frio (www.cavalgar.com.br).

Todos estes animais são imprescindíveis para o desenvolvimento da pecuária de algumas regiões do país, contudo, as populações de Marajoara e Puruca vêm sofrendo redução do seu efetivo populacional, o que justifica a caracterização desse germoplasma.

O primeiro passo a ser dado para a caracterização genética dessas populações é verificar as diferenças e/ou a unicidade das mesmas, através de estimativas da variabilidade da população, da diversidade da espécie e de distância genética entre cada uma delas. Para esse tipo de estudo os marcadores microssatélites têm sido bastante utilizados, principalmente em estudos intensivos de mapeamento nas espécies domésticas de animais (Hetzl, 1993; Barker, 1994). Os microssa-

télites 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)

MATERIAL E MÉTODOS

Área experimental / locais de amostragem

As amostras de cavalos das raças Marajoara (Figura 1) e Puruca (Figura 2) foram obtidas de animais pertencentes ao Núcleo de Conservação de Germoplasma Animal da Amazônia Oriental – BAGAM, da Embrapa Amazônia Oriental – PA, Brasil e em fazendas localizadas na Ilha de Marajó-PA, nos municípios de Salvaterra e Soure. Primeiramente, foram selecionadas, ao acaso, as tropas, em diferentes fazendas de criadores que possuíam animais registrados. A amostragem foi efetuada entre animais menos aparentados possível, onde foram coletadas as amostras de sangue. Foram amostrados 54 indivíduos da raça Marajoara e 47 da raça Puruca. Para a raça Mangalarga utilizou-se 30 amostras de DNA pertencentes ao Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF, Brasil. Os estudos comparativos foram realizados no Laboratório de Genética Molecular, pertencen-

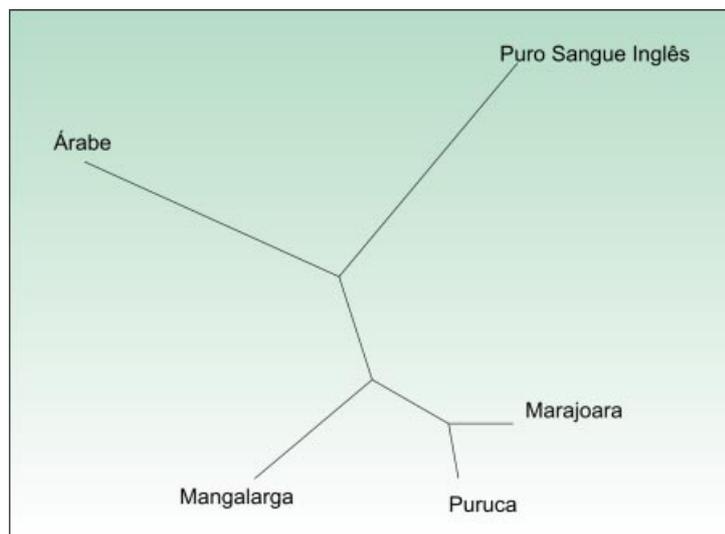


Figura 3. Dendrograma gerado pelo método de UPGMA. Distância genética de Nei et al. (1972).

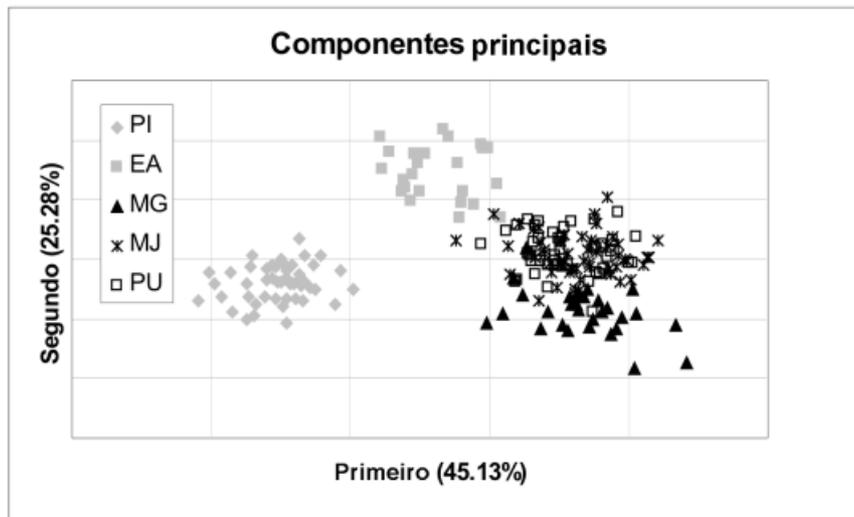


Figura 4. Gráfico da análise dos componentes principais das populações estudadas. (PI: Puro Sangue Inglês, EA: Árabe, MG: Mangalarga, MJ: Marajoara, PU: Puruca)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que 18 dos 25 marcadores apresentaram uma heteroziguidade média observada elevada com valores superiores a 0,7. Para a heteroziguidade média esperada a maioria dos *loci* (70%) apresentou valor superior a 0,7, indicando uma elevada diversidade genética dos marcadores analisados. Os valores obtidos de heteroziguidade média observada por *locus* revelaram elevado grau de polimorfismo, apresentando valores superiores a 0,7, na maioria dos *loci* analisados. O Fis médio para todos os *loci* foi de 4,88 %, indicando uma ligeira deficiência de indivíduos heterozigotos dentro das subpopulações analisadas. O valor médio de Fit para todos os *loci* foi de 3,34%, o que indica baixa fixação dos indivíduos em relação à população.

O *Fst* apresentou índices baixos em todos os locus isto indica que uma pequena parte da variabilidade genética total é explicada pela diferença entre raças e a maior parte pela diferença entre indivíduos. Isto pode denotar uma base genética estreita nos grupos estudados. Sereno (2002), analisando a diversidade genética em equinos brasileiros, da raça Pantaneiro, encontrou valor médio para o *Fst* de 8%, ressaltando que 92 % da variação genética total deve-se as diferenças entre os indivíduos.

O número de alelos por população variou de sete (Mangalarga) a oito (Marajoara e Puruca).

A Figura 3 mostra a árvore de distância genética gerada pelo método UPGMA de acordo com Nei et al (1972). Observa-se claramente uma maior proximidade genética entre as raças Marajoara e Puruca, mostrando pouca diferença dos genomas, onde os cruzamentos absorventes na raça Puruca fizeram com que, hoje, possa considerar-se 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. Tal fato vem ocorrendo desde a formação desta última, ressaltando-se que o fluxo genético entre as mesmas é contínuo, tendo, principalm-

cente ao Serviço de Cría Cabalar e Remonta do Ministério da Defesa Espanhol, em Córdoba, Espanha.

A extração de DNA foi realizada no laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental (LABGEN), Belém-PA-Brasil. Analisou-se, inicialmente, 12 microssatélites (VHL20, AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10 e LEX 33 (Van Haeringen *et al.* (1994); Binns *et al.* (1995); Breen *et al.* (1997); Lear *et al.* (1999); Guerin *et al.* (1994); Ellegren *et al.* (1992); Marklund *et al.* (1994). E, adicionalment, foram analisados mais 13 microssatélites (TKY-344, 343, 321, 287, 312, 301, 337, 297, 333, 341, 325, 294, 394) (Tozaki *et al.*2001)

A amplificação dos microssatélites foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Se preparou uma mescla de reação com H₂O MiliQ 1,3 µl ; Tampão (10x) 2,5 µl; Cl₂Mg (50 mM) 1 µl ; dNTP,s (25 mM) 0,2 µl; *Taq* Polimerase (5Unidades/µl); mescla de primers 5 e 8 e DNA genômico 5 µl. O volume foi suficiente para que as amostras amplificadas se distribuísem nos poços em um volume de 10 µl para cada. Acrescentou-se azeite mineral e se realizou a amplificação em um termociclador, sendo 30 ciclos de 95 °C a 45 sec, 56-60 °C a 45 sec, 75 °C a 1 min e no final 10 min a 72 °C.

Com o objetivo de reduzir o número de reações e os custos dos experimentos realizou-se duas reações multiplex.

Para a separação dos diversos fragmentos obtidos através da PCR, submeteu-se estes produtos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 6%, em um sequenciador automático ABI 377XL. As amostras foram previamente mescladas com um marcador de tamanhos de fragmentos e com formamida. Desnaturalizou-se a mescla submetendo-a a uma temperatura de 95 °C, durante 2 minutos, carregando-se em cada poço do gel 1,5 µl.

Utilizou-se o programa Genescan Analysis V.3.2.1 para a análise dos dados obtidos no sequenciador automático e, também, o Genotyper v. 2.5 para analisar os dados produzidos e exportá-los para uma base de dados.

A distribuição da variabilidade genética dentro e entre raças foi estudada analisando os estatísticos F de Wrigth (1969), empregando o método de Weir & Cockerman (1984) com o programa 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 1999) e construiu-se uma árvore de topologia genética, segundo o método UPGMA. Realizou-se uma análise fatorial de correspondência (Lebart *et al.* 1987) para detectar possíveis mesclas entre indivíduos de diferentes populações Esta análise é feita com o módulo "AFC Populations", do GENETIX v 4.04.

te o Marajoara como raça absorvente. Por outro lado, observa-se que estas duas raças estão ao 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, o que as coloca em risco de extinção e/ou descaracterização. Somam-se a isto os fatos de serem raças com base em rebanhos fundadores com pouca diversidade e o pouco tempo de formação, haja vista que o início de tudo ocorreu há menos de cem anos. Com a informação proporcionada pelos microssatélites 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 Amazonia possam desaparecer.

Através da Figura 4, pela análise dos componentes principais das populações estudadas, confirmam-se os resultados já discutidos, observando-se um claro agrupamento das raças Marajoara e Puruca, com a Mangalarga, apresentando certa diferenciação, mostrando maior fixação do seu genoma, fato que está muito mais evidente nas outras duas raças, Árabe e PSI, que se apresentam totalmente diferenciadas das raças brasileiras.

CONCLUSÕES

Os microssatélites utilizados foram polimórficos e eficientes para a caracterização genética de raças brasileiras do cavalo Marajoara e do mini-cavalo Puruca.

As raças Marajoara e Puruca necessitam de isolamento reprodutivo para maior fixação dos seus genomas.

A raça Puruca pode ser utilizada como reserva biológica da raça Marajoara.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, U.G.P de; MARIANTE, A.da S.; SANTOS, S. A. Conservação Genética de Raças Naturalizadas do Pantanal. *Biociência* 5: 1-6. 1998.

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...Guelf*, 1994.

BELKHIR, K. (1999) Logiciel sous Windows™ pour la génétique des populations, Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UPR 9060,

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.

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.

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

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.

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

LANGELA O. (1999). Populations 1.2.28 CNRS UPR9034 <http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo/populations/index.php>

LEBART, L., MORINEAU, A., WARWICK, K. (1984) Multivariate descriptive statistical analysis. John Wiley and Sons, New York, USA.

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

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

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.

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.

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

SERENO, F. T. P DE S. **Caracterización genética del caballo panta-neiro**. Córdoba, UCO – Es. 2002. (Tese de Doutoramento, UCO – Faculdade de Veterinária, 2002).

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, 654P.1992.

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 HAERINGEN, H., BOWLING, A.T., STOTT, M.L., LENSTRA, J.A., ZWAAGSTRA, K.A. A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Animal Genetics*, v.25, p.207, 1994.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. (1984) Estimating F-statistics for analysis of population structure, **Evolution**, v, 36, p, 1358-1370,

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

www.cavalgar.com.br

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Laboratório de Genética Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF, Brasil, pela concessão de amostras de DNA de cavalo Mangalarga e ao Laboratório de Genética Molecular, pertencente ao Serviço de Cría Cabalar e Remonta do Ministério da Defesa Espanhol, em Córdoba - Espanha, pela realização dos estudos comparativos.

Agradecimentos ao CNPq pela concessão de bolsa de estudo à primeira autora.

