

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM QUATRO RAÇAS BRASILEIRAS
DE CAVALOS (*EQUUS CABALLUS* - EQUIDAE) UTILIZANDO MARCADORES
MICROSSATÉLITES**

ELISE HOFHEINZ GIACOMONI

Tese de doutorado submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da
UFRGS como requisito parcial para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Porto Alegre - RS

Novembro de 2007

Apoio Financeiro

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Genética, Laboratório de Citogenética e Evolução, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) contando com o auxílio financeiro de:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

Aos meus pais

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos àqueles que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando:

Aos meus pais, James e Maria Eunice, e aos meus irmãos, Cláudia, Márcio e Bruno, pelo apoio, incentivo, cuidados e amor.

Ao Prof. Thales Renato de Freitas, pela orientação, pela amizade e pelos conhecimentos transmitidos durante os últimos 12 anos, enquanto estive vinculada ao Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética desta Universidade.

Ao Alemo pelo convívio, por ajudar a segurar a “barra” e pelas traduções de inglês de última hora.

Aos muitos colegas do laboratório de Citogenética e Evolução que fiz durante esses anos, pela amizade, parceria nos estudos, trabalhos e festas. Obrigada pela amizade, pelo amor, pela bagunça, por dividir o amor à biologia aos animais. Nunca vou esquecer a nossa “salinha” e o laboratório.

Ao Luciano da Silva (Lulu) por todo o suporte oferecido no Laboratório de Citogenética e Evolução de Vertebrados e pela amizade.

Ao Elmo Cardoso, à Ellen Mezzeck e à Lúcia Oliveira pela amizade e pelo auxílio em toda a parte administrativa e burocrática tanto no meu trabalho como na minha vida acadêmica.

Ao Luciano Krug pelas conversas, conselhos e amizade.

Ao Prof. Brasília da Silva pela amizade e ajuda nas análises estatísticas.

À Gabriela Paula Fernández-Stolz (Gabrielita) pela amizade, companheirismo e colaboração no doutorado.

À amiga e Angel Daniela Raymundo pelas correções do inglês.

À amiga, Angel e Profa. Renatinha pelos estudos lá na época do mestrado.

Ao casal Fornel, Rodrigo e Tatiane, pela colaboração no *design* das figuras dos artigos.

Ao amigo carioca Léo. Meu amigo, irmão, tão longe mas sempre tão perto. Valeu por sempre me ouvir e pelos estudos na época do mestrado.

A todos os funcionários das fazendas, haras, estâncias e cabanhas que ajudaram e colaboraram nas coletas de sangue.

À Fazenda Ipiranga/Pousada Piuval, Poconé - MT, na pessoa de João Losano Eubank de Campos, pela ajuda durante o período de coleta das amostras e pela disposição e incentivo a esta pesquisa.

Aos meus pais e irmãos pela ajuda na coleta de sangue dos cavalos Pantaneiros.

À Estância Olhos D'água, Alegrete - RS, na pessoa de Antonino Dorneles, pela acolhida e ajuda durante toda fase de coleta de sangue de cavalos crioulos.

À Claudia Dorneles pela ajuda e parceria na coleta de sangue dos cavalos Crioulos em Alegrete.

Ao Centro de Treinamento Mão na Rédea, Viamão - RS, por ter cedido seus animais para coleta de sangue de cavalos crioulos.

À Cabanha Caapuã, Viamão - RS, na pessoa de Juliano da Silveira, por ter disponibilizado a coleta de sangue de seus animais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Juliano Coelho da Silveira por ter ajudado e incentivado nas coletas de sangue dos cavalos Crioulos no município de Viamão.

A Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros pela colaboração durante minha estada em Poconé.

A Fazenda Promissão, através de seus proprietários Paulo e Vitor Moura por colaborar com meu trabalho.

Ao Dr. Jorge Gerdau Johanpeter por colocar a minha disposição o Haras Joter e seus cavalos para o desenvolvimento da minha pesquisa.

A Sociedade Hípica Portoalegrense, através de seus funcionários, sócios e atletas, pelo incentivo à minha pesquisa.

Ao instrutor Alaor, da Sociedade Hípica Portoalegrense, pelas primeiras aulas de hipismo.

Ao Núcleo Riograndense de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga, a Fazenda Alvorada, ao Haras do Cedro, ao Haras do Otnacer, ao Haras Santo Antônio por meio de seus proprietários, que permitiram que eu coletasse amostra de sangue de seus animais. A todos, muito obrigada.

Dr. Antônio Caetano Pinto e ao Dr. Roberto Buzato também agradeço a permissão da coleta de amostra de sangue de cavalos Mangalarga.

Ao Daniel Baldissera e Cristóvão Dellagerisi pela ajuda na coleta da égua Wind da Lagoa.

Ao Syllas Alcoba Júnior, pela amizade, pelas instruções, pelo incentivo e pelo grande amor aos cavalos.

Ao *El Quinto*, pelos tombos, pelo braço e costela quebrada. Como diria seu Alaor “só cai quem monta”.

À Dacsi por estar sempre perto de mim. Literalmente minha sombra. Meu amor. Minha filha.

Aos 471 cavalos que “doaram seu sangue” por esse projeto.

**“Carregando um príncipe ou
um camponês,
um cavalo é sempre o mesmo”.**

Provérbio grego

SUMÁRIO

i. RESUMO	10
ii. ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Evolução dos eqüinos.....	13
1.2 Classificação da Ordem Perissodactyla.....	14
1.3 Cavalos Selvagens.....	15
1.4 Domesticação dos Eqüinos.....	16
1.5 Cavalos Domésticos.....	17
1.6 Raças Brasileiras e Conservação.....	17
1.6.1. Cavalos Crioulos.....	19
1.6.2. Cavalos Pantaneiros	22
1.6.3. Cavalos Mangalarga	25
1.6.4. Cavalos Brasileiro de Hipismo.....	28
1.7 Genética de Eqüinos.....	31
1.8 Microssatélites.....	32
1.8.1 Estudos com Microssatélites em Eqüinos.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
3. CAPÍTULO I	38
Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers.....	
Abstract	40
Introduction	41
Materials and Methods	42
Results	44
Discussion	46
References	49

4. CAPÍTULO II	60
Microsatellites in Brazilian horse breeds: usefulness for variability genetic	
Summary.....	62
Introduction	63
Materials and Methods	65
Results	67
Discussion	70
References	73
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

RESUMO

O Brasil possui cerca de uma dezena de raças de cavalos sendo essas classificadas em locais ou comerciais. As raças que aqui se naturalizaram são descendentes dos animais trazidos pelos portugueses e espanhóis na época da colonização. Cerca de 500 anos após sofrer seleção natural e artificial esses cavalos adquiriram características próprias capazes de se adaptar a ambientes adversos, escassez de alimento, doenças, influência do homem e cruzamento indiscriminado com raças exóticas. Assim, surgiram raças típicas brasileiras dotadas de peculiaridades importantes para as regiões em que vivem. Com isso, o objetivo principal deste trabalho foi o de estimar a variabilidade genética em quatro raças brasileiras de cavalos (Brasileiro de Hipismo, Crioulo, Mangalarga e Pantaneiro) por meio do marcador de DNA microssatélites. Foram utilizados 10 *loci* de microssatélites que amplificaram para as quatro raças. Em um primeiro estudo, foi estimada a variabilidade genética em 227 animais de três fazendas da região do Pantanal. Um total de 91 alelos foi encontrado. A probabilidade de exclusão de paternidade (PE) para as três amostras conjunta ficou em torno de 99,3%. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi alto, considerado altamente informativo. Os valores de Fis revelaram alto índice de homozigose nas três populações. Pôde-se verificar, por meio de baixos valores de Fst, baixa estruturação para as amostras estudadas sugerindo pouca diferenciação entre as mesmas. Foram utilizados três métodos para detectar gargalo de garrafa. Os resultados sugerem que os animais das fazendas estudadas não passaram por um processo de declínio populacional recente, mas que provavelmente animais da Fazenda Nova Esperança estariam passando por um processo de estruturação.

Um outro estudo de variabilidade genética incluiu, além da raça Pantaneira, outras três raças brasileiras de cavalos: Crioulo, Brasileiro de Hipismo (BH) e Mangalarga. Os mesmos 10 *loci* de microssatélites também foram utilizados. Todos os *loci* amplificaram nas quatro raças, com a exceção de AHT17 em BH e Mangalarga. A raça que apresentou maior variabilidade alélica foi a Pantaneira (n = 91) seguida pelas raças Crioula (n = 81), BH (n = 57) e Mangalarga (n = 41). O coeficiente de endogamia (Fis) apresentou valores altos para as quatro raças. Por meio da estimativa Fst pôde-se inferir que a raça Mangalarga é a mais divergente entre as raças estudadas. Através do programa Structure, foi observado que Pantaneiro, Crioulo, Brasileiro de Hipismo e Mangalarga estão estruturadas em quatro distintas raças.

ABSTRACT

Brazil has around ten horse breeds, which are classified as local or commercial horses. The breeds established here are descendant from the animals brought by the Portuguese and Spanish colonization. After 500 years of natural and artificial selection, these horses acquired their own adaptive characteristics to adverse environments, lack of food, diseases, human influence, and random breeding with exotic breeds. Thus, the main objective of this work was to estimate the genetic variability of four Brazilian horse breeds (Pantaneiro, Crioulo, Brasileiro de Hipismo and Mangalarga) by microsatellite markers. Ten microsatellite loci have been used and amplified in the 4 breeds. On a first study, the genetic variability was estimated in 227 animals from three farms around the Pantanal region. A total of 91 alleles were found. The paternity exclusion probability (PE) to all 3 samples was around 99.3%. The polymorphic information content (PIC) was high, and considered to be informative. The F_{is} values showed high levels of homozygosity in all three populations. It was verified, through the low values of F_{st} , low structure of the samples studied, suggesting slight differentiation among them. Three methods to detect the bottleneck effect have been used. These results suggest that the animals from the studied farms did not go through a recent population decrease in numbers, however animals from the Fazenda Nova Esperança may be going through a structure process. On a second study, besides the Pantaneiro, genetic variability was also estimated in others three Brazilian horse breeds: Crioulo, Brasileiro de Hipismo (BH) and Mangalarga. The same 10 microsatellite loci were used. All loci amplified in the four breeds, except for the AHT17 in the BH and Mangalarga. The breed that presented higher allelic variability was Pantaneiro, followed by the Crioulo, BH and Mangalarga breeds. The endogamy coefficient (F_{is}) showed high values on the four breeds. Through the F_{st} estimate, it was observed that the Mangalarga breed is more differentiated among the studied breeds. Through the Structure software, it was observed that Pantaneiro, Crioulo, Brasileiro de Hipismo and Mangalarga are structured in four distinct breeds.

1. INTRODUÇÃO

Na história da humanidade, nenhum outro animal doméstico ocupou um lugar tão importante nos processos de desenvolvimento social e político como os cavalos (Bowling & Ruvinsky, 2000). Isto porque, desde a Antigüidade fazem parte da cultura, da economia e do lazer do homem.

Até o início do século XX, em todos os países, os eqüinos constituíram-se em elemento imprescindível para o transporte, lavoura e a mobilidade dos exércitos (Torres & Jardim, 1992). Havia uma grande preocupação dos governos em incentivar e manter a criação desses animais, já que deles dependia, em boa medida, a produção de gêneros alimentícios, o transporte, a defesa das fronteiras e as viagens por via terrestre. Nem mesmo o aparecimento da máquina a vapor conseguiu diminuir o interesse e a necessidade da utilização dos eqüinos (Torres & Jardim, 1992). Somente durante as duas grandes guerras houve grande redução na população mundial de eqüinos devido à participação deles nas batalhas. Esses períodos, no entanto, foram seguidos de significativos aumentos na população. Segundo esses mesmos autores, foi com o uso dos cavalos durante as guerras que surgiram as primeiras especializações e o início da formação das raças, dotadas de particularidades. A mecanização influenciou na diminuição dos cavalos para transporte, permitindo o seu maior uso para o lazer e o esporte, mudando em muitas raças, a ênfase das suas criações.

Além de facilitar a locomoção e deslocamento das pessoas, o cavalo é um meio de transporte barato e acessível, principalmente ao homem do campo. Em países com grandes extensões de terra, os cavalos são muito utilizados para a locomoção. Nas muitas propriedades rurais em que seus proprietários não possuem condições de ter veículos automotores, os cavalos servem de meio de transporte, além de serem muito úteis em outras atividades no campo, como por exemplo, no trabalho com gado (Torres & Jardim, 1992).

Hoje em dia, o cavalo domesticado é, também, muito importante economicamente e utilizado para o esporte, para a recreação e entretenimento (Guérin et al. 1999), participando de apresentações (feiras) e competições como rodeios e olimpíadas.

1.1 Evolução dos Equinos

O ancestral do cavalo atual surgiu no continente americano (Groves & Ryder, 2000), espalhando-se para outras partes do mundo através de pontes de terras, algumas das quais já desapareceram como a que existia na área do Mar de Bering (Jones, 1987; Groves & Ryder, 2000). Sabe-se, entretanto, que no descobrimento da América já não ocorriam espécies vivas no continente. A ocorrência, porém, de equinos desde a Patagônia até a América do Norte é incontestável, pois foram encontrados muitos fósseis representativos de todas as formas de sua evolução, desde um pequeno mamífero ungulado de cinco dedos, com dentes não diferenciados, habitante da floresta do Terciário inferior, até chegar a formas muito próximas do cavalo atual, do Quaternário (Torres & Jardim, 1992).

Registros dos primeiros vestígios dos cavalos primitivos encontram-se desde o período Eoceno da Época Terciária (Romaszkan & Junqueira, 1992; Groves & Ryder, 2000). Esse cavalo primitivo é conhecido formalmente como *Hyracotherium cuniculum*. O *Hyracotheriu*, classificado no gênero *Cymbalophus*, não tinha mais de 30 cm de altura, aproximando-se ao tamanho de uma raposa; não possuía cascos; e tinha apenas quatro dedos, pois o quinto era parcialmente atrofiado. No decorrer de milhões de anos, diversas espécies de *Hyracotherium* evoluíram. Dessas, algumas desapareceram, outras apresentaram modificações que as tornaram mais bem sucedidas (Jones, 1987). Depois dos *Cymbalophus*, originaram-se: *Orohippus* (início do Eoceno, 50 - 47 milhões de anos (m.a.)), *Epihippus* (Eoceno médio e fim do Eoceno, 47 - 40 m.a.), *Mesohippus* (fim do Eoceno e início do Oligoceno, 40 - 30 m.a.) e *Miohippus* (fim do Eoceno e Oligoceno, 37 - 25 m.a.) (Groves & Ryder, 2000). O *Miohippus* tinha o tamanho de um carneiro. A porção facial do crânio passou a ser levemente mais longa do que a parte cranial, tornando o cérebro mais complexo, contribuindo para o aparecimento de um animal mais

esperto. Ele foi se tornando mais alto, além de ter os outros dedos dos pés atrofiados. Algumas espécies de *Miohippus* se adaptaram mais a pastos abertos do que a *habitats* florestais. Isso fez com que a dependência do artelho médio aumentasse porque esse tipo de pastagem levou ao desenvolvimento de dentes dotados de coroas mais longas e com sulcos de esmalte com “cimento”. O comprimento longitudinal do crânio também aumentou para facilitar o pastejo (Jones, 1987).

Há cerca de 15 milhões de anos, a linha *Equinae* se dividiu em três tribos: *Protohippini*, *Hipparionini* e *Equini*. Os *Protohippinis* são considerados, atualmente, como ancestrais das duas últimas tribos. Os *Hipparioninis* eram cavalos selvagens e tinham sua altura comparável à de um pônei (Romaszkan & Junqueira, 1992). Durante o período Mioceno, a linha *Equinae* continuou via *Kalobahippus*, *Archaeohippus* e *Parahippus*, os quais apresentaram desenvolvimento do crânio e dos dentes (Groves & Ryder, 2000).

Assim como seus ancestrais, o gênero *Equus* parece ter originado na América do Norte. Esses animais migraram para o sul, tornando-se o mais antigo cavalo sul-americano. Espalharam-se, também, pela Ásia e Europa, e de lá para o sul em direção à África.

Há cerca de 8 mil anos, os cavalos existentes na América foram extintos e os tipos adaptados da Europa, Ásia e África tornaram-se os ancestrais exclusivos do cavalo moderno (Silver, 2000).

1.2 Classificação da Ordem Perissodactyla

Segundo Groves & Ryder (2000), a ordem Perissodactyla está dividida em três grandes grupos vivos (os cavalos, os tapires e os rinocerontes) e dois grupos – os brontoterós e os ancilopodos – extintos após os períodos Oligoceno e Pleistoceno, respectivamente.

Os grupos pertencentes à ordem Perissodactyla estão divididos em três subordens: Titanotheriomorpha, Hipomorpha e Moropomorpha. A subordem Titanotheriomorpha era composta pelos brontoterós. A subordem Hipomorpha é subdividida nas superfamílias Pachynolophoidea e Equioidea. Esta última se divide nas famílias Palaeotheriidae e Equidae, representada pelos eqüinos, asnos e zebras. Já a subordem Moropomorpha é composta pelos tapires (antas) (família Tapiridae) e pelos rinocerontes (Rhinocerotidae).

O gênero *Equus*, no qual estão incluídos os cavalos, está subdividido em seis subgêneros e oito espécies (Nowak, 1999): subgênero *Asinus* – *Equus asinus* (asnos); subgênero *Hemionus* – *E. hemionus* e *E. kiang*; subgênero *Equus* – *E. caballus* (cavalos); subgênero *Dolichohippus* – *E. grevyi*; subgênero *Hippotigris* – *E. zebra* (zebras) e subgênero *Quagga* – *E. burchelli* e *E. quagga*.

1.3 Cavalos Selvagens

Os representantes selvagens dos eqüinos, existentes na atualidade, são da espécie *Equus caballus przewalskii*, também conhecidos como Cavalo de Przewalskii ou cavalo selvagem da Mongólia. Esse nome foi dado em homenagem ao naturalista polonês e explorador da Ásia, Coronel N. M. Przewalskii (Bowling & Ruvinsky, 2000). O naturalista Przewalskii foi o primeiro a encontrar cavalos selvagens no noroeste da China, perto da Mongólia em 1879.

O Cavalo de Przewalskii é menor que os cavalos domésticos, porém tem a cabeça maior. Sua altura varia de 1,38 a 1,46m para machos e de 1,33 a 1,39m para fêmeas. Possui crinas pequenas e eretas, cauda longa e olhos pequenos. É extremamente bravo, dotado de grande força e resistência (Silver, 2000). Os espécimes existentes habitam o deserto do Cazaquistão, sul da Sibéria e Mongólia. Atualmente, o número de *Equus caballus przewalskii* está bem reduzido, uma vez que foram caçados nas últimas décadas para serem domesticados. Hoje, encontram-se exemplares dessa espécie em zoológicos e parques na região da Mongólia (Ahrens & Stranzinger, 2005). Os cavalos *Przewalskii* estão classificados como “extintos” pela IUCN (International Union to Conservation of

Nature and Natural Resources), listados como “em perigo de extinção” pela USDI (United States Department of the Interior) e pela CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) (Nowak, 1999).

Os cavalos selvagens têm sua organização social formada em bandos, geralmente, vivendo em grupos de 10 a 20 animais. Entretanto, pode-se encontrar alguns indivíduos vivendo isoladamente. O bando é formado por um garanhão e várias fêmeas, sendo que suas proles permanecem no grupo até completarem dois ou três anos. Os bandos são relativamente estáveis e ocasionalmente recrutam fêmeas jovens de outros grupos (Nowak, 1999).

1.4 Domesticação dos Eqüinos

Não se sabe ao certo onde iniciou a domesticação dos cavalos, mas foi nas guerras – nas invasões da Grécia, do Egito – que os ocidentais ficaram conhecendo o cavalo. Só então, após o adestramento desta espécie, é que os europeus teriam domesticado os cavalos, há cerca de 6 mil anos (Morey, 1995).

Em relação às espécies atuais de eqüinos, três se desenvolveram na Europa, Ásia e África: as espécies de zebras, no leste e no sul da África; diversos asnos, no norte da África e na Ásia menor, enquanto as espécies de *Equus*, na Mongólia e na Rússia (Fontes, 2000).

A capacidade desses animais em correr rapidamente e por longas distâncias despertou no homem o desejo em domesticá-los (Jones, 1987). Com o passar do tempo, os cavalos passaram a ser, além de admirados, perseguidos como caça, capturados, domesticados e treinados para servir de animal de tração e de carga (Romaszkan & Junqueira, 1992).

1.5 Cavalos Domésticos

À medida em que o clima da Terra mudava e as espécies animais e vegetais iam evoluindo, os ancestrais dos cavalos atuais precisavam de patas e pernas aptas para corrida. Com pernas mais longas e com menos dedos, esses animais tinham melhores condições de fugir de predadores das planícies (Torres & Jardim, 1992). Segundo Romaszkan & Junqueira (1992), as diversas raças de eqüinos foram surgindo devido às diferentes condições de vida nas quais se desenvolveram. As influências do clima, do meio ambiente, do modo de vida através de gerações produziram resultados diversos, proporcionando, assim, as diferentes constituições, proporções e temperamentos. Mas a maior diferença entre as raças foi geográfica. Não há dúvida de que foi entre o Oriente e o Ocidente que as condições de existência apresentaram diferenças mais marcantes. Desenvolveram-se, então, de um lado as raças orientais, com animais esbeltos e mais velozes e, de outro, as raças ocidentais, com animais mais pesados, mais lentos e mais calmos (Romaszkan & Junqueira, 1992).

O cavalo doméstico de hoje difere de seus parentes mais próximos pelo seu corpo mais delgado e membros altos, sobretudo pelo desenvolvimento dos ossos da canela (Torres & Jardim, 1992). A cabeça e a cauda são mais longas, possuindo apenas um dedo em cada pata, somente com a última falange revestida de uma unha muito desenvolvida, formando o casco. Essas formas e mudanças não aconteceram e não se desenvolveram por acaso (Fontes, 2000).

1.6 Raças Brasileiras e Conservação

Existem no mundo cerca de 300 raças de eqüinos (IBGE, 2004). As características vão desde animais de “sangue-quente” (sangue oriental no seu pedigree) como os árabes a animais de “sangue-frio”, como os animais que tiveram sua origem de cavalos que viviam nas florestas da Europa Central (Romaszkan & Junqueira, 1992; Torres & Jardim, 1992; Hermsen 1997).

Além das adversidades do meio ambiente, o homem contribuiu muito para a formação de inúmeras raças, bem como para o desaparecimento de muitas delas. Com os cruzamentos direcionados, as raças foram adquirindo características e peculiaridades próprias importantes para as regiões em que vivem (Hermsen, 1997).

O Brasil tem aproximadamente uma dezena de raças equínas, dentre elas: Baixadeiro, Brasileiro de Hipismo, Campeiro, Campolina, Crioulo, Lavradeiro, Mangalarga Marchador, Mangalarga Paulista, Marajoara, Pantaneiro e o cavalo Puruca (Mariante e Cavalcante, 2006).

De acordo com o IBGE (2004) o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de equinos possuindo um rebanho de 5.787.250 animais. A utilização dessas raças vai desde o manejo com o gado, até o trabalho de tração nas pequenas propriedades. Além disso, os equinos são muito utilizados para o esporte, lazer e transporte (Torres & Jardim, 1992; Braga, 2000).

Admite-se que os primeiros cavalos tenham entrado no país através dos colonizadores, principalmente portugueses e espanhóis (Braga, 2000). Tanto os cavalos Crioulos, como Mangalargas e Pantaneiros têm suas origens, também, vinculadas ao descobrimento e a colonização do Brasil e de suas regiões. Cada raça adquiriu suas características, peculiaridades e qualidades de acordo com a região em que foram se desenvolvendo. Cada uma delas conseguiu-se diferenciar das outras pelo tamanho, temperamento, força e resistência. Todas essas características foram desenvolvendo-se com o passar dos anos e de acordo com a forma e o ambiente em que esses animais foram criados. O cavalo BH originou-se de cruzamento entre animais nacionais com animais de raças européias (Dias et al. 2000). O que se sabe ao certo é que esses animais são típicos das diversas regiões brasileiras, fazem parte da nossa história e cultura, sendo necessária a conservação e preservação dessas raças.

1.6.1 Cavalos Crioulos

A raça Crioula é muito popular entre cavalos da América do Sul (Jones, 1987). No Brasil, em particular, no Estado do Rio Grande do Sul, é a mais conhecida. A raça originou-se de animais de sangue andaluz e berbere trazidos durante a colonização das Américas por espanhóis, como Dom Alvar Nuñez Cabeza de Vaca e Pedro de Mendonza.

As mudanças que ocorreram na raça desde essa época permitiram que os cavalos Crioulos desenvolvessem traços capazes de se adaptar aos fatores ambientais seletivos como o terreno, o clima e a nutrição (Jones, 1987; Kelly et al. 2002). Entre eles, se destacam a rusticidade, pois o cavalo Crioulo, mantendo-se em campos pobres, tem apresentado invejável poder de recuperação (Pons, 1993). A alimentação é outra característica que comprova o quanto essa raça é rústica, pois alimentam-se de tudo, sendo considerados como o cavalo do pobre.

O cavalo Crioulo é um animal compacto (**Figura 1**), além de forte, bem disposto e dotado de grande resistência. Resiste a terrenos rochosos, acidentados e encharcados. Tem estatura de 1,40m a 1,50m em média, tanto para machos como para fêmeas. É adaptado ao serviço do campo e às viagens que requerem extraordinária resistência. Entretanto, é no trabalho com o gado que ele se sobressai (Torres & Jardim, 1992). É “educado” num galope especial, curto, porém continuado, que permite fazer muitos quilômetros por dia. Seu andamento natural é o trote e o passo, num caminhar baixo, de acordo com os terrenos planos do sul. São animais extremamente sóbrios, fortes e resistentes, qualidades que se aliam à coragem, à agilidade e à mansidão (Pons, 1993).

Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos (ABCCC) (www.abccc.com.br), o padrão da raça Crioula é:

a) *Cabeça*: curta, ampla na base e fina na ponta; maxilares fortes, bem desenvolvidos, ganachas bem afastadas; crânio amplo e cara curta; fronte larga, bem desenvolvida, com chanfro curto e largo; perfil reto ou ligeiramente convexo; orelhas pequenas móveis bem afastadas na base; olhos expressivos.

b) *Pescoço*: bem unido à cabeça por uma larga e limpa garganta; no bordo superior ligeiramente convexo, com abundantes e grossas crinas, quase reto em sua linha inferior; amplo, forte, músculos com inserção harmônica ao tórax; mediano de comprimento.

c) *Cernelha*: ligeiramente destacada e perfilada; musculosa.

d) *Dorso*: mediano, bem unido à cernelha, com boa cobertura muscular, que lhe permita manter estável o arreamento.

e) *Lombo* (região dos rins): musculoso, unindo suavemente o dorso à garupa, sem ser saliente.

f) *Garupa*: comprimento e largura medianos, musculosa, forte, bem desenvolvida, levemente inclinada.

g) *Cauda*: com inserção dando uma perfeita continuidade à linha superior da garupa. Sabugo curto e grosso, com crinas grossas e abundantes.

h) *Peito*: amplo, largo, profundo e fortemente musculado; encontros bem separados.

i) *Tórax*: com bom desenvolvimento, costelas bem arqueadas, denotando uma boa capacidade respiratória.

j) *Ventre*: cilíndrico, subconvexo, com razoável volume, perfeitamente unido ao tórax e ao flanco.

k) *Canelas*: curtas, com tendões fortes e bem definidos; bem apumadas.

l) *Cascos*: de volume proporcional ao corpo, duros, densos, sólidos, apumados e pretos de preferência.

m) *Peso*: oscilará entre 400 e 450 kg.

n) *Pelagens*: Somente não são aceitas as pelagens pintada e albina total.



Figura 1. Cavalo Crioulo

1.6.3 Cavalos Pantaneiros

A raça Pantaneira (conhecida também como Poconeana, Mimoseana, Baiana ou Curraleira) foi introduzida na região, durante a colonização do Pantanal originando-se a partir do cruzamento de cavalos lusitanos (Andaluz, Barbo e Céltico) com árabes e Crioulo Argentino (Mariante e Cavalcante, 2006) trazidos pelos colonizadores europeus (Santos et al. 2000). Além disso, os índios Guaicurus parecem ter tido papel importante na fixação dos cavalos pantaneiros no Pantanal (Cothran et al. 1998; Santos et al. 2000).

O cavalo Pantaneiro (**Figura 2**) cumpriu importante papel na colonização e permanência do homem à região do pantanal Mato-grossense. Com seus cascos extremamente bem adaptados, os cavalos pantaneiros podem ficar por dias e dias com os pés submersos sem que haja qualquer dano a eles, sem falar na sua capacidade em comer a vegetação que se encontra submersa no período das águas, quando boa parte do Pantanal fica alagada. Esta raça foi, também, economicamente importante para o desenvolvimento da região do Pantanal (Cothran et al. 1998; Miserani et al. 2000), pois contribui para a atividade mais importante do pantanal Mato-grossense: a criação de gado de corte (Fuck et al. 2000).

São animais extremamente rústicos, essenciais no manejo com o gado (Miserani et al. 2002). São de porte pequeno e leve, além de ágeis e velozes; alimentam-se de quase toda a vegetação local e têm bom temperamento. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros (ABCCP) sua altura tem como padrão mínimo 1,40m para machos e 1,35m para fêmeas, sendo considerado de tamanho pequeno (Miserani et al. 2002). A cor padrão é a tordilha, sendo que cerca de 80% dos animais têm pelagem clara (Torres & Jardim, 1992).

Até o final do século XIX, a população de cavalos pantaneiros foi severamente reduzida devido à "Peste das Cadeiras" (*Trypanossimíase*). Depois disso, o endocruzamento indiscriminado e a Anemia Infecciosa Equina (AIE) também contribuíram para a diminuição do número de animais dessa raça. Somente em 1972, com a criação da ABCCP, a raça teve suas características padronizadas (Santos et al. 2000).

A capacidade de adaptação, rusticidade e tolerância a AIE ajudam o cavalo Pantaneiro a resistir às adversidades do ambiente (Fuck et al. 2002). Sendo assim, todas as suas características fazem dessa raça um recurso natural, colocando os cavalos Pantaneiros no Programa de Conservação e Uso de Recursos Genéticos desenvolvidos pela Embrapa junto ao Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen).

O padrão da raça Pantaneira, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros (www.abccp.com.br) é:

- a) *Cabeça*: tamanho médio, perfil subconvexo (quase retilíneo), olhos médios e vivos, orelhas com tamanho proporcional e bem implantadas.
- b) *Pescoço*: musculoso, inserção bem definida, com crina fina, espessa e sedosa
- c) *Cernelha*: altura de 141,67cm para machos e 136,87 cm para fêmeas
- d) *Tronco*: cernelha saliente e bem implantada; peito profundo, amplo mas sem ser saliente, costelas arqueadas, largas e bem definidas.
- e) *Dorso: e lombo*: curtos, retos e bem sustentados, flancos profundos e arredondados.
- f) *Garupa*: Constituição média. Altura da garupa de 141,81cm para machos e 137,87 cm para fêmeas
- g) *Canelas*: secas
- h) *Cascos*: médios e arredondados
- i) *Membros*: espáduas bem pronunciadas e oblíquas. Braços e antebraços médios e musculosos. Joelhos retos, planos e bem suportados.



Figura 2. Cavalo Pantaneiro

1.6.2 Cavalos Mangalarga

A raça nacional Mangalarga tem como formador principal o cavalo Álder de Portugal e Andaluz da Espanha. Com a vinda da Família Real Portuguesa para o Brasil, foram trazidos também os melhores espécimes da Coudelaria Real de Álder do Chão (Lippi & Mortari, 2003), fato que desempenhou papel decisivo na formação da raça Mangalarga, pois os reprodutores trazidos nesta viagem, assim como seus descendentes foram muito utilizados pelos criadores da época para o melhoramento de seus rebanhos.

Com essa denominação, tornou-se famosa uma população eqüina, no sul de Minas Gerais, limítrofe com São Paulo, na primeira década do século XX (Lippi & Mortari, 2003). Posteriormente, membros da família Junqueira, responsáveis por essa criação, mudaram-se para o Estado de São Paulo e com eles levaram suas montarias.

Em 1934 foi fundada a Associação de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga (Lippi & Mortari, 2003), que posteriormente passou a chamar-se Associação Brasileira de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga. Desde então, a ABCCRM vem imprimindo orientações para o melhoramento e seleção do Mangalarga, objetivando-se enquadrá-lo no conceito atual do moderno cavalo de trabalho e esporte, mantendo-se as características peculiares à raça, principalmente no que se refere ao seu andamento característico, ou seja, a marcha trotada.

São animais que medem aproximadamente 1,45m de altura (**Figura 3**). A cor do pelo varia entre tordilho, castanho e alazão. Têm um físico de dorso curto, com lombo forte e pernas compridas. São animais de notável inteligência, possuindo um andar raro denominado marcha que é um movimento de balanço confortável entre o trote e o galope (Silver, 2000).

O padrão da raça Mangalarga, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga (www.abccrm.com.br) é:

a) *Cabeça*: com perfil retilíneo; olhos grandes, bem afastados e não oblíquos; narinas dilatadas; orelhas móveis, de tamanho médio e em proporção harmoniosa com a cabeça, implantadas em ângulo de cerca de 55° com a horizontal que passa pela base das mesmas; boca bem rasgada.

b) *Pescoço*: comprimento da cabeça mais um terço do comprimento da mesma, musculoso, ligado harmoniosamente com a cabeça, fazendo um ângulo aproximado de 90° com a cabeça. Boa implantação ao tronco fazendo um ângulo de 45 (quarenta e cinco) graus.

c) *Tronco*: cernelha bem delineada, linha dorso-lombar retilínea e paralela ao solo; lombo curto, largo com rins bem protegidos; bom arqueamento de costelas, peito amplo e profundo.

d) *Garupa*: de bom comprimento tanto das vértebras sacras como da ponta da anca a ponta da nádega. Deverá ser ampla e musculosa, sem ser dupla.

e) *Altura*: para o registro definitivo a altura mínima exigida é de 1,50m para os machos e 1,45m para as fêmeas, dos 36 (trinta e seis) meses em diante.

f) *Pelagem*: são admitidas todas as pelagens, a exceção da pelagem albina (despigmentada) e a pintada (a semelhança dos cavalos Appaloosa e do Persa).

g) *Andamento*: obrigatoriamente a marcha trotada, com apoio diagonal. Estando o animal em andamento, em terreno plano e em linha reta, o rastro dos posteriores deve alcançar ou cobrir o dos anteriores. O tempo de suspensão da marcha trotada é muito curto, somente o suficiente para que se proceda a troca dos membros, justificando-se dessa maneira, a denominação de marcha trotada. As passadas na marcha trotada deverão ser elegantes, levemente alçadas, longas e enérgicas. A andadura não é admitida em hipótese alguma, assim como também o trote puro e a marcha em tríplice apoio.



Figura 3. Cavalo Mangalarga

1.6.4 Cavalo Brasileiro de Hipismo

A raça Brasileiro de Hipismo (BH) foi criada na década de 70, no Brasil, por um grupo de criadores que se uniram com o objetivo de desenvolver uma raça com aptidões para esportes hípico. Em 1977 a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Brasileiros de Hipismo foi reconhecida pelo Ministério da Agricultura sendo credenciada a realizar o Serviço de Registro Genealógico – SRG da raça. O objetivo principal da Associação é o de promover o desenvolvimento do cavalo BH dentro dos padrões estabelecidos buscando atingir um animal de boa estrutura e conformação, e com grande capacidade para o esporte. O Cavalo Brasileiro de Hipismo (BH) é o resultado do cruzamento entre raças de grande aptidão esportiva. Dentre elas, Puro Sangue Inglês (PSI), Hanoverana, Westfalen, Hosteiner, Sela Francesa, Oldenburger, entre outras em menor proporção (Dias et al. 2000). A raça iniciou com o cruzamento de éguas nacionais com ou sem genealogia conhecida, que apresentassem características funcionais e morfológicas necessárias para o esporte hípico, chamadas éguas base com garanhões importados ou nacionais registrados com alguma aptidão para esportes hípico. Atualmente, o cavalo BH é reconhecido tanto nacional como internacionalmente pelas suas vitórias em importantes eventos hípico tais como as Olimpíadas (Dias et al. 2000). Além disso, a raça BH faz parte da World Breeding for Sport Horses (WBFSH, 1998), entidade que reúne as associações de raças de cavalos utilizados para esportes hípico em todo mundo.

O Brasileiro de Hipismo é um animal energético (**Figura 4**), elástico e corajoso, embora tenha um temperamento dócil. É um cavalo mediolíneo, de estrutura forte, de linhas harmoniosas e de grande facilidade para a reunião de seus membros e andamentos. Sua cabeça é expressiva, com todos os contornos bem destacados. Tem olhos vivos, as narinas grandes e largas e as orelhas de tamanho médio. O tamanho da cabeça é importante na raça, pois favorece o equilíbrio do cavalo.

Segundo a Associação Brasileira de Criadores do Cavalo de Hipismo – ABCCH, através do Stud Book Brasileiro do Cavalo de Hipismo (SBBCH) as características exigidas de um cavalo BH são:

a) *Cabeça*: comprimento médio, descarnada, de perfil fronto-nasal de reto a subconvexo; orelhas de tamanho médio; fronte ampla, reta ou subconvexa nos sentidos transversal e longitudinal; olhos grandes e de grande vivacidade; chanfro reto ou ligeiramente subconvexo, estreito e descarnado; narinas amplas de forma elíptica; mandíbula ampla, musculada com ganachas bem separadas formando um arco de ângulo obtuso, sendo a cabeça harmoniosamente ligada ao pescoço com ângulo máximo de 90°.

b) *Pescoço*: piramidal, de comprimento médio, bem musculado, levemente subconvexo na linha superior e subcôncavo na linha inferior, provido de crinas sedosas, bem destacado do peito e das espáduas e harmoniosamente ligado à cernelha.

c) *Cernelha*: bem destacada, comprida, seca e musculosa, harmoniosamente ligada ao pescoço e ao dorso, sem depressões.

d) *Dorso*: subcôncavo, curto, bem musculado, harmoniosamente ligado à cernelha e ao lombo.

e) *Lombo*: sólido, subconvexo, médio, largo, bem musculado, harmoniosamente ligado ao dorso e à garupa.

f) *Garupa*: arredondada, comprida, larga, oblíqua, bem musculada; ao sentido transversal deve ter forma elíptica; a altura da garupa é igual ou levemente inferior a altura da cernelha.

g) *Cauda*: de base forte, crinas sedosas, com inserção média e perfeita continuidade com a linha superior da garupa; levemente destacada do corpo, quando em movimento.

h) *Canela*: estrutura sólida, curta, espessa, descarnada, de contornos bem definidos e tendões fortes e destacados.

Perímetro da canela ideal para machos: 21,5cm

Perímetro da canela ideal para fêmeas: 20,0cm

i) *Cascos*: sólidos, flexíveis, de boa textura, grandes e proporcionais à corpulência, bem conformados. Lateralmente as paredes devem acompanhar a inclinação das quartelas.

j) *Coxa*: comprida, bem definida, bem musculada, relativamente oblíqua permitindo a formação de um triângulo equilátero entre a anca, a ponta da nádega e a rótula.

K) *Perna*: comprida, bem musculada, bem definida, aproximando-se levemente ao plano médio do corpo, em direção ao curvilhão e com inclinação de 65 a 70° com a horizontal.

l) *Pelagem*: são permitidas todas as pelagens, em todas as suas matizes.

m) *Altura*:

Altura ideal para machos: 1,68m

Altura ideal para fêmeas: 1,65m



Figura 4. Cavalo Brasileiro de Hipismo

1.7 Genética de Eqüinos

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

Diferentes números cromossômicos são encontrados para espécies de *Equus*, como por exemplo, *E. przewalskii*, $2n=66$ e *E. caballus*, $2n=64$ (Bowling & Ruvinsky, 2000). Entretanto, sabe-se que eles são capazes de cruzarem entre si produzindo prole fértil. Sendo assim, estudos com *Equus caballus* podem auxiliar em pesquisas relacionadas com outros *Equidae*, principalmente para estudos de conservação (Binns et al. 2000).

Estudos citogenéticos e de DNA têm fornecido dados importantes e auxiliado na interpretação de estudos morfológicos e paleontológicos dos eqüinos. Análises filogenéticas de dados de seqüências de DNA têm ajudado na compreensão da taxonomia, da evolução do gênero *Equus* e da sistemática. *Equus quagga*, por exemplo, foi o primeiro organismo extinto que teve o seu DNA clonado, a partir de pele desses animais que existem no British Museum em Londres, depois que a técnica de PCR foi desenvolvida (Higuchi et al. 1984). Além disso, estudos genéticos têm mostrado papel relevante em planos de ação para a conservação do táxon (Groves & Ryder, 2000).

Anuniação & Astolfi-Filho (2000) testaram sondas moleculares de minissatélites ricas em CG como teste de paternidade em cavalos da raça Mangalarga-Marchador. Quatro clones, selecionados a partir de um banco genômico, demonstraram um perfil de hibridização semelhante com bandas do tipo DNA “fingerprinting”. Os autores concluíram que todos os clones foram eficientes para a determinação de parentesco em cruzamentos.

A raça de Asnos da Catalunha, população em perigo de extinção, foi caracterizada geneticamente através de microssatélites por Jordana et al. (2001). Onze locus foram amplificados com uma média de 7,7 alelos por locus. A probabilidade de exclusão ficou em torno de 0,99% e a perda de heterozigotos foi atribuída à consangüinidade.

Morais et al. (2005) estudaram a estrutura genética de cavalos da raça Garrano de Portugal. Oito sub-populações foram examinadas através de 33 loci de microssatélites com o objetivo de propor programas de controle de endocruzamento e conservação para a raça.

Um dos principais motivos para a conservação dos eqüinos é o seu valor genético. Ao longo dos anos, as raças de eqüinos foram desenvolvendo características adaptativas ao ambiente, impostas pela seleção natural que permitiram com que esses animais se tornassem resistentes ao clima, solo, temperatura, a oferta de alimentos, doenças e manejo. Além disso, essas raças sofreram efeitos de deriva genética, mutações e seleção artificial, bem como cruzamentos indiscriminados com outras raças domesticadas levando essas raças ao declínio de sua diversidade. Essa diminuição de diversidade genética tem sido expressa tanto dentro de raças e espécies como entre elas.

1.8 Microssatélites

Para avaliar a diversidade genética dentro e entre raças de cavalos, análise da variabilidade alélica em sistemas de grupos sanguíneos e loci de proteínas tem sido usada tradicionalmente (Bowling 1997 & Kelly et al. 2002). A partir das últimas duas décadas microssatélites tem sido também utilizados.

Microssatélites são seqüências de DNA repetitivo presentes no genoma de eucariotos. São também denominados como SSRs (*simple sequence repeats*) ou de STRs (*short tandem repeats*), (Jeffreys & Pena, 1993). São formadas de repetições em tandem de um a seis pares de bases, podendo variar em tamanho (Tautz, 1993). Por essa razão são extremamente utilizados em estudos de variabilidade genética de indivíduos, bem como de populações e de espécies. Essas seqüências genômicas consistem de mono-, di-, tri- ou

tetra-nucleotídeos repetidos em múltiplas cópias (Jeffreys & Pena, 1993). Suas variações podem ser causadas principalmente por um alinhamento incorreto das fitas do DNA (*DNA replication slippage*) durante a fase de replicação (Tautz, 1993; Comings, 1998). Segundo Schlotherer (1998), os microssatélites apresentam-se como loci altamente polimórficos, com alelos co-dominantes, encontrando-se dispersos em genomas eucariotos e podendo ocorrer também em genomas procarióticos sob baixas frequências.

As características apresentadas por estes loci permitem sua utilização em uma ampla variedade de estudos como na identificação de indivíduos ou espécies, na determinação de parentesco (Gerber et al. 2000; Kichler et al. 1999; Nesje et al. 2000), no mapeamento genômico, na variabilidade genética de indivíduos entre espécies e populações, na estrutura genética de populações (Wyttenbach et al. 1999; Dawson et al. 1997), em estudos filogenéticos (Mattapallil & Ali, 1999) e de conservação (Dunner et al. 1998).

Em animais domésticos, o polimorfismo dos microssatélites tem sido usado extensivamente para caracterização de raças, para estudos de evolução e análises de parentesco (Binns et al. 2000), para mapeamento genético (Tozaki et al. 2001) e no auxílio de programas de melhoramento. Existe essa necessidade, uma vez que o excessivo endocruzamento pode aumentar a prevalência de doenças genéticas, declínio na fertilidade e extinção de raças (Behara et al. 1998).

1.8.1 Estudos com Microssatélites em Eqüinos

Os primeiros microssatélites descritos para cavalos foram estabelecidos por Ellegren et al. (1992) e Marklund et al. (1994) que os caracterizaram, isolando conjuntos de CA/GT e demonstraram que eles são altamente polimórficos nessa espécie.

Atualmente, estima-se que já foram seqüenciados mais de 1500 microssatélites para cavalos, entre esses, os citados nos trabalhos de Bailey et al. (2000); Horini & Matiasöovic (2000); Lindgren (2000); Roberts et al. (2000); Tozaki et al. (2000); Wagner & Reissmann

(2000); Mashima et al. (2001); Tozaki et al. (2001), Swinburne et al. (2003), Wagner et al. (2004); Milenkovic et al. (2005).

Cañon et al. (2000) estudaram a estrutura genética de cavalos célticos da Espanha através de 13 *loci* de microssatélites. Como essas populações não têm sido expostas a programas de melhoramento genético, viu-se a necessidade de estudá-las, uma vez que estão potencialmente ameaçadas de extinção. O uso desse marcador de DNA foi positivo no sentido de se verificarem relações e estrutura genética entre populações.

Jordana et al. (2001) analisaram a diversidade genética através de microssatélites em burros da Catalunha (nordeste da Espanha) para auxiliar em programas de preservação da raça, já que esses animais fazem parte de uma população considerada em risco de extinção. Os autores concluíram que a consangüinidade intra-população foi altamente significativa e que o déficit de heterozigotos podia ser explicado devido a um efeito de subdivisão da população e à consangüinidade.

Análises filogenéticas em equídeos (espécies de burros) foram realizadas por Krüger et al. (2005) através de 31 *loci* de microssatélites. Esses *loci* foram utilizados para avaliar a demarcação e a filogenia das espécies, bem como a atribuição de cada indivíduo na origem da sua população. Os resultados observados suportam a idéia da manutenção dos rebanhos separados para *E. Hemionus onager* e *E. hemionus kulam*.

Em eqüinos, até pouco tempo atrás, verificava-se paternidade somente através de grupos sanguíneos (Bowling et al. 1997). Entretanto, com a aplicação dos novos marcadores genéticos, têm-se hoje melhores resultados com maior probabilidade de exclusão de supostos pais. Marklund et al. (1997), por exemplo, testaram a probabilidade de exclusão de paternidade com 14 *loci* de microssatélites em quatro raças de cavalos. Todos os microssatélites apresentaram-se polimórficos. Diferenças na variabilidade dos microssatélites entre raças de cavalos foram detectadas. Concluiu-se que a probabilidade de exclusão de paternidade ficou entre de 0,96 e 0,99.

Bowling et al. (1997) utilizaram 11 *loci* de microssatélites em testes de rotina de parentesco em cavalos Quarto de Milha e 15 *loci* de grupos sanguíneos. O uso de microssatélites mostrou ser mais eficiente na exclusão de paternidade do que a tipagem sanguínea.

Giacomoni (2002) estudou a variabilidade genética em cavalos das raças Crioula e Pantaneira através de quatro *loci* de microssatélites em mais de 100 animais de ambos os sexos. Os quatro *loci* foram polimórficos. Constatou-se maior número de alelos como de genótipos em cavalos Pantaneiros em comparação com os cavalos Crioulos, provavelmente devido ao fato de os primeiros ainda serem criados de forma extensiva.

Além disso, casos de dupla cobertura, quando uma égua é coberta por dois garanhões no mesmo cio, ocasionalmente geram problemas na detecção de parentesco da prole através dos métodos convencionais (Binns et al. 1995). Segundo esses autores, os microssatélites podem ser usados como marcadores genéticos em populações altamente endocruzadas.

O mapeamento genômico, também, é um dos estudos de grande importância para os eqüinos, pois pode auxiliar na identificação de doenças infecciosas, alergias e doenças que afetam os músculos e esqueletos (Shubitowski et al. 2001). Foi por causa de alguns desses problemas, geralmente levantados pelos criadores de cavalos de raça, que em 1995, um grupo de pesquisadores se reuniu durante o 1º *Workshop* Internacional sobre Mapeamento Genômico Eqüino. Naquela oportunidade, o genoma de eqüinos machos de 12 raças foi escolhido para ser mapeado por laboratórios de várias partes do mundo, através de 161 marcadores (144 microssatélites, sete grupos sanguíneos e dez proteínas). Com os resultados obtidos, tem-se agora uma ferramenta muito importante nos estudos de genética de eqüinos.

Galov et al. (2005) publicaram um trabalho sobre a eficácia de marcadores de microssatélite em teste de parentesco em três raças de cavalos da Croácia. Nove *loci* de microssatélites foram utilizados e obtiveram 99,9% de exclusão em Posavina e Croatian

Coldblood e 99,3% em Lipizzaner. Esse tipo de marcador mostrou-se um bom mensurador de medida de exclusão de paternidade.

2. OBJETIVOS

No âmbito da economia agropecuária, a criação de cavalos de raça é um dos negócios mais rentáveis em todo o mundo. Avanços na tecnologia são os responsáveis, em grande parte, pelo crescimento do setor. Ao lado do melhoramento genético, as técnicas moleculares têm auxiliado no controle de proles férteis e sadias, uma vez que o endocruzamento e a consangüinidade com alto índice de ocorrência em animais domésticos provocam, muitas vezes, animais doentes e com malformações.

Dessa forma, trabalhos com genética molecular em eqüinos tornam-se importantes, já que poucos são os estudos desenvolvidos com as raças Crioula, Mangalarga, Pantaneira e BH, neste âmbito, no País. Cabe salientar a importância desse estudo no que diz respeito à análise de manejo e do "status" de conservação genética dessas raças.

Sendo assim, os objetivos deste projeto são:

- determinar e comparar o grau de variabilidade genética dos quatro rebanhos quanto aos 10 loci de microssatélites dentro e entre as raças;
- estimar a eficiência desses marcadores para a identificação individual e de controle de filiação;
- testar a existência de reduções no tamanho efetivo populacional (gargalos de garrafa) para cada um dos rebanhos da raça Pantaneira;
- sugerir alternativas de conservação para a raça Pantaneira.

3 Capítulo I

Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers

Elise Hofheinz Giacomoni, Gabriela P. Fernández-Stolz & Thales R. O. de Freitas

Manuscrito aceito pela revista: *Genetics and Molecular Research*

Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers

Elise Hofheinz Giacomoni et al.

Elise Hofheinz Giacomoni¹, Gabriela P. Fernández-Stolz¹ and Thales R. O. de Freitas^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do

Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências,

Porto Alegre 91501-970 – Brasil

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre 91501-970 – Brasil

Correspondence: Elise Hofheinz Giacomoni

Av. Bento Gonçalves, 9500

Departamento de Genética Prédio 43323

Caixa Postal 15053, CEP: 91501-970 Bairro Agronomia

Porto Alegre, RS – Brasil

E-mail: elise.giacomoni@ufrgs.br

ABSTRACT. The genetic variability for a sample of 227 animals from three populations of Pantaneiro horses was estimated using data from 10 microsatellite loci. The number of alleles and the proportion of heterozygosity indicated high variability. A total of 91 alleles were found, with a significantly high mean number of alleles. The mean polymorphic information content (PIC) was 0.7 and the paternity exclusion probability (PE) was 99.3%. The inbreeding coefficient (F_{IS}) was low for the three populations: Ipiranga ($F_{IS} = 0.147$), Nova Esperança ($F_{IS} = 0.094$) and Promissão ($F_{IS} = 0.108$). Genetic differentiation among all three populations was low ($F_{ST} = 0.008$ to 0.064). Three methods were used to test for a recent bottleneck effect. The graphical method and the Wilcoxon test using the stepwise mutation model (SMM) showed no bottleneck pattern for any of the populations. The test by two-phase mutation model (TPM) showed genetic signatures of bottleneck for Ipiranga and Promissão. When we consider SD value for Nova Esperança, the M -statistic detected a bottleneck pattern, but this result could be explained by a sample size effect. Therefore, there is no immediate cause for concern regarding loss of variation within the breed.

Key words: Genetic variability, Horse, Microsatellites, Pantaneiro horses

INTRODUCTION

Domestic animals are products of selection, improvement and domestication processes (Santos et al. 2003). The selection pressure to which they are submitted has forced races and domestic populations to adapt to specific ecological niches. These breeds have also undergone the effects of genetic drift, mutation and artificial selection (Santos et al. 2003). Therefore, the preservation and conservation of these breeds is of significant value for nature and for humans. Over the years, concerns regarding many native breeds have increased, because many of them are disappearing due to mixing and replacement. The domesticated breeds are part of biodiversity, belong to peculiar ecosystems and are tolerant to diseases. Appropriate management, conservation in development programs, and biological and local research are some ways to preserve these local breeds, in order to maintain their genetic characteristics as part of a breeding system.

The Pantaneiro breeds of horses originated from Iberian horses and were brought by Europeans (Santos et al. 2000) to Brazil during its colonial period. The local Amerindians played an important role in the establishment of this breed in the Pantanal (**Figure 1**) (Santos et al. 1992). Since then, the Pantaneiro horses have been exposed to 500 years of natural selection, developing traits that allowed them to adapt to the Pantanal environment, i.e., to live in flooded areas during the seven-month rainy season (Miserani et al. 2002). The breeding system varies from extensive to semi-extensive (Santos et al. 2004).

The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, www.fao.org/dad-is) has cited the Pantaneiro horse as an endangered breed. The crossings with other races and diseases such as trypanosomiasis and equine infectious anemia (EIA) (Cothran et al. 1998) have contributed to a significant reduction in the number of these animals.

Microsatellite DNA has been used for studies of genetic variability and population structure in horse breeds (Jordana et al. 1999; Cañon et al. 2000; Baumung et al. 2004). Also, microsatellites have been recommended for routine paternity tests (Galov et al.

2005). Genetic characterization is the first step in the conservation of breeds, and in the determination of future breeding strategies (Solis et al. 2005).

Few genetic studies of Pantaneiro horses have been published, especially about genetic markers. Therefore, the goal of the present study was to analyze the genetic variability of Pantaneiro horses and to assess whether any bottleneck patterns exist.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

Blood samples were collected from 227 Pantaneiro horses at three ranches: Ipiranga ($n = 126$), Nova Esperança ($n = 14$) and Promissão ($n = 87$), located in the municipal district of Poconé (Mato Grosso state, Brazil). DNA was extracted following Medrano et al. (1990) and stored at -20°C .

Microsatellites

Ten loci of microsatellites were used in this study: VHL150 (van Haeringen et al. 1998); VHL20 (van Haeringen et al. 1994); AHT17, AHT20 (Swinburne et al. 1997); HMS02, HMS06, HMS07 (Guérin et al. 1984); HTG4, HTG06 and HTG08 (Ellegren et al. 1992). The criteria used to select these loci were the high level of heterozygosity, large number of alleles and easy amplification. However, because of problems with amplification, locus AHT20 was not included in the analysis of the results for Fazenda Nova Esperança. PCR was performed in a 15- μl volume containing 50 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl_2 , 1 U of *Taq* DNA polymerase and 200 μM of dNTPs. The DNA was initially denatured at 95°C for 10 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, 55° to 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min. The sizes of DNA fragments were determined using a 25-bp ladder (Invitrogen) as molecular weight marker. PCR products were separated by electrophoresis in 6% gels under denaturing conditions, followed by silver staining according to the procedure of Bassan et al. (1991).

Statistical analysis

Genetic diversity within each of the three populations was measured as the number of alleles per locus (N), observed heterozygosity (H_o) and the heterozygosity expected from Hardy-Weinberg proportions (H_e , Nei 1978). The mean number of alleles per locus was calculated using the AGARST program (Harley 2001). The observed and expected heterozygosity per locus and in each population were estimated using the statistics program ARLEQUIN 3.0 (Excoffier et al. 2005).

Genetic differentiation among and within the populations of Pantaneiros was estimated based on unbiased F -statistics according to Weir and Cockerham (1984), using the FSTAT 2.9.3 program (Goudet, 2001). Significance levels ($p = 0.05$) were corrected for simultaneous comparisons with the sequential Bonferroni test (Rice 1989). The allelic frequencies, polymorphic information content (PIC) for each microsatellite and the average paternity exclusion probabilities (PE) were estimated using the CERVUS 3.0 program (Marshall et al. 1998).

In order to detect genetic signatures of bottlenecks, three methods based on changes in allele frequencies were used. The first is a graphical method that tests a deficit in rare alleles in a sample of loci (Luikart et al. 1998a, 1998b), based on the shape of the allele frequency distribution curve. An L-shaped distribution is expected under mutation-drift distribution. Bottlenecks cause a characteristic change in the distribution of allele frequencies: loss of low-frequency alleles and increase in relative abundance of intermediate and high-frequency alleles. The alleles were grouped into ten frequency classes (0-0.10, 0.11-0.2 and so on until 0.91-1.0). The second method tests for excess of heterozygosity compared to the values expected from the observed number of alleles at each locus and population, assuming mutation-drift equilibrium. Significant departures from this equilibrium were identified using the Wilcoxon signed-ranks test as implemented by the program Bottleneck (Cornuet and Luikart 1996). The computations were based on both stepwise mutation (SMM) and two-phase mutation (TPM) models (Di Rienzo et al. 1994). The third method, the mean of the ratio of number of alleles to range of allele sizes (M), was described by Garza and Williamson (2001). For bottleneck populations, the allele number is expected to be reduced more quickly than the range of allele size, leading to

reduced values of M . The M values were calculated using the AGARst program (Harley 2001). The critical value used was that proposed by Garza and Williamson (2001), where values of M less than 0.68 characterize a bottleneck population.

A Bayesian MCMC approach was used in order to examine the distinctiveness of populations and the clustering of individual genotypes using the program STRUCTURE (Pritchard et al. 2000).

RESULTS

Genetic Variability

The number of alleles per locus, the length of fragments, observed and expected heterozygosity, polymorphic information content (PIC) value and probability of exclusion (PE) are shown in **Table 1**. A total of 91 alleles were obtained from the ten polymorphic loci analyzed, with the mean number of alleles per locus of 9.1. The number of alleles per marker ranged from 6 for AHT20 and HMS6 to 13 for VHL20, AHT17 and HTG06, the across-loci H_o value ranged from 0.403 for AHT20 to 0.888 for AHT17, and the H_e ranged from 0.519 for AHT20 to 0.880 for VHL20.

The PIC values found in ten loci ranged from 0.476 in AHT20 to 0.866 in VHL20, with all loci being highly informative (Botstein et al. 1980) and the mean PIC value = 0.706 (**Table 1**).

The probability of paternity exclusion (PE) by locus ranged from 0.146 for AHT20 to 0.604 VHL20, and for the complete microsatellite dataset the probability of paternity exclusion was 0.993 (**Table 1**).

The population that showed the highest allelic variability was Ipiranga with 82 alleles (an average of 8.2 alleles per locus). Horses at the Nova Esperança Ranch showed the smallest number of alleles, with an average of 4.9 alleles per locus. The loci with the highest number of alleles in the Ipiranga herd were VHL20 and AHT017 with 13 alleles. In

the Nova Esperança herd, the locus with the highest number of alleles was VHL020 (8), and in the Promissão herd it was HTG06 with 12 alleles (**Table 2**).

A total of 11 exclusive alleles were observed at Ipiranga, only 1 exclusive allele at Nova Esperança, and 8 at Promissão. The allelic richness (A), calculated as the mean number of alleles per locus per population, was lowest for the Nova Esperança herd (**Table 2**).

The expected values (He) for each locus ranged from 0.403 for VHL150 at Nova Esperança to 0.891 for VHL20 at Promissão. The observed values (Ho) ranged from 0.352 for AHT020 at Ipiranga to 0.928 for AHT17 at Promissão. Values of Ho for each population for all the loci examined were $0.352 \leq Ho \leq 0.873$ for Ipiranga, $0.375 \leq Ho \leq 0.857$ for Nova Esperança and $0.368 \leq Ho \leq 0.928$ for Promissão (**Table 2**).

Six loci at Ipiranga and seven at Promissão showed significant deviations from the genotype proportion expected according to the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) after the Bonferroni correction for multiple tests ($p < 0.005$; **Table 2**). Only one locus (HMS06) for Nova Esperança showed significant deviations according to the Hardy-Weinberg equilibrium. AHT20 was not assessed.

The inbreeding coefficients (F_{IS}) estimated according to Weir and Cockerham (1984) are shown in **Table 2**. The results showed a higher value for Ipiranga ($F_{IS} = 0.147$; $p = 0.0017$) than for Promissão ($F_{IS} = 0.108$; $p = 0.0617$) and Nova Esperança ($F_{IS} = 0.094$; $p = 0.0017$); however, values for Ipiranga and Promissão were significantly different from zero, even after α -levels were corrected for multiple tests ($\alpha = 0.0016$).

Genetic Differentiation and Bottleneck Effects

Low genetic differentiation among populations was found, with pairwise F_{ST} coefficients ranging from 0.008 between Nova Esperança and Promissão to 0.064 between Ipiranga and Nova Esperança (**Table 3**). Using a Bayesian MCMC approach and considering a range of one to three potential populations (**Figure 2**), the probability value obtained for three populations ($K = 3$, mean value of \ln likelihood = -5257.9 ± 33.4) was

higher than for two ($K = 2$, mean value of \ln likelihood = $- 5409.0 \pm 16.9$) and one population ($K = 1$, mean value of \ln likelihood = $- 5623.6 \pm 6.3$).

Because the BOTTLENECK computer program detects bottlenecks within the last 12 to 15 generations and considering that the minimum generation interval in horses is eight years (Ollivier, 1999), 12 to 15 generations would represent the last 96 to 120 years. The distribution of allele frequencies for the three populations showed no differences from the expected L-shaped patterns observed in stable populations (**Figure 3**). The test for excess heterozygosity produced non-significant p -values based on the SMM mutation model. However, the test based on the TPM model produced significant p -values for Ipiranga and Promissão. Genetic signatures of bottlenecks from Garza and Williamson's M were only marginally observed for Nova Esperança, with an M value higher than the critical value (0.68) but with a high SD value ($M_{\text{Pop2}} = 0.71 \pm 0.21$) (**Table 4**).

DISCUSSION

Few genetic studies have been performed on Pantaneiro horses. Cothran et al. (1998) used seven blood-group loci and ten biochemical genetic loci in Pantaneiro horses to compare them to other domestic horse breeds. Analysis of genetic relationships showed that there is no immediate concern regarding loss of variation within the Pantaneiro. Fuck (2002) used 13 RAPD loci to characterize this breed, and the results showed differences within populations. A morphological study by Miserani (2001) with animals from the Brazilian states Mato Grosso and Mato Grosso do Sul showed little morphological variation, i.e., phenotypic uniformity.

Although Pantaneiro horses live exclusively in the central-western region of Brazil, levels of microsatellite variability were high compared with other equine breeds. We detected 91 alleles for 10 polymorphic loci, thus a mean of 9.1 per locus. The mean numbers of alleles per locus reported for other breeds are: 7.06 (range 3-77) for Lipizzaner horses (Achmann et al. 2004), 10.58 (range 6-14) for Mediterranean horse breeds (Marletta

et al. 2006), 10.41 (range 7-13) for Portuguese horse breeds (Luís et al. 2007) and 6.0 (range 5-12) for Spanish Trotter horses (Azor et al. 2007).

When the herd from each ranch was analyzed separately, differences were observed with respect to allelic richness. Ipiranga (8.2) and Promissão (7.8) showed higher mean numbers of alleles than Nova Esperança (4.9), which showed low allelic diversity, probably because of the small number of samples taken there.

Individual *PIC* values were highly correlated with the effective number of alleles detected for each corresponding locus. AHT20 showed low variability and *PIC* values, and VHL20 and AHT17 showed high variability and the highest values of *PIC*.

Using 10 microsatellite loci, we found a global *PE* value of 99.3% for the three populations. All loci contributed to the *PE* value. This result is similar to those reported by Galov et al. (2005) in Lipizzaners (99.5%) and by Luis et al. (2002) in Lusitano and Garrano horses (99.6% and 99.5%, respectively). The high *PE* value indicates that the microsatellites for horses are appropriate for a routine parentage test for Pantaneiro horse populations.

The data obtained indicate that the three herds of Pantaneiro horses show high levels of heterozygosity (0.628, Table 1). Published reports of polymorphisms with microsatellites in other equine breeds range from 0.610 for the Zanskari horse breed (Behl et al. 2006), 0.663 in Lipizzaners (Achmann et al. 2004), 0.647 for Spanish Trotters (Azor et al. 2007), 0.745 for Garranos and 0.677 for Lusitanos (Luis et al. 2002).

Considering that the Pantaneiro breed is found only in the Pantanal region and these animals are adapted to this region, the population coefficients showed low values of F_{IS} and F_{ST} , which indicate a low rate of inbreeding and high gene flow among the farms. These results suggest that local breeding management is responsible for this variation.

To test for a recent bottleneck effect, three methods were used. The graphical method and the Wilcoxon test using the stepwise mutation model (SMM) showed no

bottleneck pattern for any of the three populations. However, for the Wilcoxon signed-ranks test by two-phase mutation model (TPM), Ipiranga and Promissão showed genetic signatures of bottleneck. Also, when we consider SD value for Nova Esperança, the *M* statistic detected a bottleneck pattern. These could suggest a possible recent effect, but may be explained by the small size of the sample from this population.

In addition to the present high genetic variability, which allows us to be more optimistic regarding the breed's vulnerability to extinction, there are several other reasons to conserve it. First, it is economically important, being the means of transportation and locomotion for many native people in the Pantanal. Second, the Pantaneiro horse has a distinct historic and cultural value for the people of Pantanal. Third, the scientific value of the breed is high because it carries genetic information since the colonization period and has acquired specific characteristics that if lost could not be regained.

Our results indicate no grounds for immediate concern with respect to loss of variation within breed. This study contributes to the practical understanding of the genetic variability of the Pantaneiro horse.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros (ABCCP), Sr. João Losada of the Fazenda Ipiranga, Srs. Paulo and Vítor Moura of the Fazenda Promissão and Sr. Hilton Figueiredo Aguiar of the Fazenda Nova Esperança. We would also like to thank Rodrigo Fornel for the map of the Pantanal. This study was financed by CNPq.

REFERENCES

Achmann R, Curik I, Dovc P, Kavar T, Bodo I, Habe F, Marti E, Sölkner J and Brem G (2004). Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics* 35:285-292.

Azor P, Valera M, Gómez M, Goyache F and Molina A (2007). Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 30:37-42.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G and Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 80:81-84.

Baumung R, Simianer H and Hoffmann I (2004). Genetic diversity studies in farm animals - a survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* 121:361-373.

Behl R, Behl J, Gupta N, Gupta S, Ahlawat S, Ragnekar M and Ahmed Z (2006). Genetic characterization of Zanskari breed of horse. *Journal of Genetics* 85:199-203.

Botstein D, White R, Skolnick M and Davis R (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.

Cañon J, Checa M, Carleos C, Vega-Pla J, Vallejo M and Dunner S. (2000). The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 31:39-48.

Cornuet JM and Luikart G (1996). Description and power analysis of two for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

Cothran E, Santos S, Mazza M, Lear T and Sereno R (1998). Genetics of the Pantaneiro horse of the Pantanal region of Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 21:343-349.

Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes MA, Slatkin M and Freimer NB (1994). Mutational processes of simple sequence repeat loci in human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:3166-3170.

Ellegren H, Johansson M, Sandberg K and Andersson L (1992). Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics* 23:133-142.

Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005). Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Fuck B (2002). Caracterização genética do cavalo pantaneiro: uma contribuição para a conservação da raça. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

Galov A, Byrne K, Duras-Gomereie, Gomereie T, Nushol Z, Vincek D, Kocijan I, Tadie Z, Benkovic V, Basie I and Funk S (2005). Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Production Science* 93:277-282.

Garza JC and Williamson EG (2001). Detecting of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10:305-318.

Goudet J 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995)

Guérin G, Bertaud M and Amigues Y (1994). Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Animal Genetics* 25:62.

Harley EH (2001). AGARst. A program for calculating allele frequencies, Gst and Rst from microsatellite data. Version 2.0. University of Cape Town, Cape Town.

Jordana J, Folch P and Sanchez A (1999). Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalanian donkeys. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:791-798.

Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM and Sherwin WB (1998a). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89:238-247.

Luikart G, Sherwin WB, Stelle BM and Allendorf FW (1998b). Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* 7:963-974.

Luís C, Cothran E and Oom M. (2002). Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage testing. *Genetics and Molecular Biology* 25:131-134.

Luís C, Juras R, Oom M and Cothran E (2007). Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds on protein and microsatellite loci variation. *Animal Genetics* 38:20-27.

Marletta D, Tupac-Yupanqui I, Bordonaro S, Garcia D, Guastella AM, Criscione A, Cañón J and Dunner S (2006). Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 123:315-325.

Marshall T, Slate J, Kruuk L and Pemberton J (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7:639-340.

Medrano J, Aesen E and Sharrow L (1990). DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8:43.

Miserani M, McManus C, Santos A, Silva J, Mariante A and Abreu U (2002). Evaluation of the factors which influence linear measurements of the Pantaneiro Horse. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31:335-341.

Morais J, Oom M, Malta-Vacas J and Luís C (2005). Genetic structure of an endangered Portuguese semiferal pony breed, the Garrano. *Biochemical Genetics* 43:347-364.

Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.

Ollivier L (1999). Situation and justification of the conservation of animal genetics resources in Europe. *Naturzale* 14:17-27.

Pritchard JK, Stephens M and Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.

Raymond M and Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact test ecumenism. *Journal of Heredity* 86:248-249.

Rice WW (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.

Santos S, McManus C, Mariante A, Sereno J, Silva J, Egito A, Abreu U, Comastri Filho J and Lara M (2003). Estratégias de conservação *in situ* do cavalo pantaneiro. Documentos Embrapa 29ps.

Santos S, Mariante A, Abreu U and McManus C (2000). Conservation and Management of the Pantaneiro Horse in the Pantanal. In: V Conferência Mundial sobre Conservação de Recursos Genéticos de Animais Domésticos (RBI). Brasília. Anais.

Santos S, Sereno J, Mazza M, Mazza C (1992). Origin of the Pantaneiro Horse in Brazil. *Archivos de Zootecnia* 41:371-381.

Santos SA, Mazza MCM, Sereno JRB, Mazza CSA, Pedreira ACMS, Mariante AAS, Silva JA and Marques MC de A (2004). Production system of Pantaneiro Horses in the Pantanal. *Archivos de Zootecnia* 53:333-336.

Swinburne J, Marti E, Breen M and Binns M (1997). Characterization of twelve new horse microsatellite loci: AHT12-AHT23. *Animal Genetics* 28:453.

Torres A and Jardim W (1992). Criação do Cavalo e de outros Equinos. São Paulo. Editora Nobel. 654p.

van Haeringen H, Bowling AT, Stott ML, Lenstra JA and Zwaagstra KA (1994). A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Animal Genetics* 23:207.

van Haeringen WA, Van De Goor LHP, Van Den Hout N, Lenstra JA and van Haeringen H (1998). A polymorphic horse microsatellite locus: VHL150. *Animal Genetics* 29:460-477.

Weir B and Cockerham C (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Table 1. Genetic variability at ten microsatellite loci for the Pantaneiro horse. Number of animals tested (*n*), number of alleles per locus (*N*), size range (bp, base pairs), observed heterozygosity (*Ho*), expected heterozygosity (*He*), polymorphism information content (*PIC*), probability of paternity exclusion (*PE*).

Locus	<i>n</i>	<i>N</i>	Size range	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>PIC</i>	<i>PE</i>
VHL150	223	7	92 – 104	0.619	0.623	0.575	0.215
VHL20	180	13	85 – 109	0.733	0.880	0.866	0.604
AHT17	152	13	111 – 135	0.888	0.869	0.853	0.581
AHT20	77	6	125 – 135	0.403	0.519	0.476	0.146
HMS02	152	7	220 – 236	0.724	0.708	0.670	0.304
HMS06	197	6	163 – 173	0.462	0.706	0.656	0.287
HMS07	159	7	172 – 184	0.440	0.711	0.664	0.304
HTG04	207	9	125 – 141	0.715	0.833	0.811	0.496
HTG06	188	13	82 – 106	0.676	0.709	0.666	0.310
HTG08	139	10	178 - 196	0.626	0.845	0.823	0.519
Mean		9.10		0.628	0.740	0.706	0.993**

p < 0.05

***PE* total

Table 2. Microsatellite genetic variation in three populations of Pantaneiro horses. Number of alleles per locus (N), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), inbreeding coefficient values (F_{IS}) and gene diversity (Nei, 1987) per population. n , sample size; NA, not available.

Population	Locus	N	H_o	H_e	F_{IS}	Gene diversity
Ipiranga ($n=126$)						
	VHL150	5	0.645	0.641	-0.006	0.641
	VHL20	13	0.761	0.861	0.116	0.861
	AHT017	13	0.873	0.869	-0.007	0.868
	AHT20	4	0.352	0.462	0.215	0.450
	HMS02	7	0.810	0.783*	-0.042	0.778
	HMS06	6	0.527	0.733*	0.279	0.732
	HMS07	6	0.431	0.730*	0.410	0.732
	HTG04	9	0.618	0.819*	0.242	0.816
	HTG06	10	0.627	0.647*	0.027	0.645
	HTG08	9	0.629	0.845*	0.249	0.839
	Mean	8.2	0.627	0.739	0.147	
Nova Esperança ($n=14$)						
	VHL150	4	0.461	0.403	-0.152	0.401
	VHL20	8	0.615	0.886	0.302	0.881
	AHT017	6	0.857	0.835	-0.029	0.883
	AHT20	NA	NA	NA	NA	NA
	HMS02	3	0.600	0.484	-0.256	0.478
	HMS06	5	0.461	0.673*	0.269	0.631
	HMS07	3	0.375	0.441	-0.105	0.339
	HTG04	4	0.428	0.521	0.183	0.525
	HTG06	5	0.538	0.710	0.211	0.683
	HTG08	6	0.600	0.673	0.115	0.678
	Mean	4.9	0.493	0.562	0.094	
Promissão ($n=87$)						
	VHL150	7	0.604	0.605*	0.002	0.606
	VHL20	11	0.706	0.891*	0.209	0.893
	AHT017	11	0.928	0.851	-0.091	0.851
	AHT20	6	0.777	0.836	0.074	0.840
	HMS02	5	0.647	0.621	-0.041	0.622
	HMS06	4	0.368	0.674*	0.455	0.676
	HMS07	6	0.464	0.695*	0.333	0.696
	HTG04	9	0.920	0.848*	-0.085	0.848
	HTG06	12	0.767	0.773*	0.003	0.770
	HTG08	7	0.625	0.837*	0.249	0.832
	Mean	7.8	0.680	0.763	0.108	

$p < 0.05$ after Bonferroni correction for multiple tests.

Table 3. Population differentiation among Pantaneiro horse populations based on 10 microsatellite loci. The F_{st} values are shown below the diagonal, while the number of effective migrants per generation (Nm) are shown above the diagonal.

	Ipiranga	Nova Esperança	Promissão
Ipiranga		1.436	1.509
Nova Esperança	0.064		1.140
Promissão	0.019	0.008*	

* $p < 0.016$

Table 4. Results of the bottleneck detection tests for three Pantaneiro horse populations. The Wilcoxon test was applied to the stepwise mutation model (SMM) and to the two-phase mutation model (TPM). M is Garza and Williamson's parameter (mean \pm SD, across all loci).

	Wilcoxon test		M values
	S.M.M.	T.P.M.	
Ipiranga	0.75	0.05*	0.94 \pm 0.08
Nova Esperança	0.99	0.97	0.71 \pm 0.21
Promissão	0.42	0.04*	0.96 \pm 0.12

* $p < 0.05$ significance



Figure 1. The entire distribution area of Pantaneiro horses in the Pantanal (dark area) in Brazil.

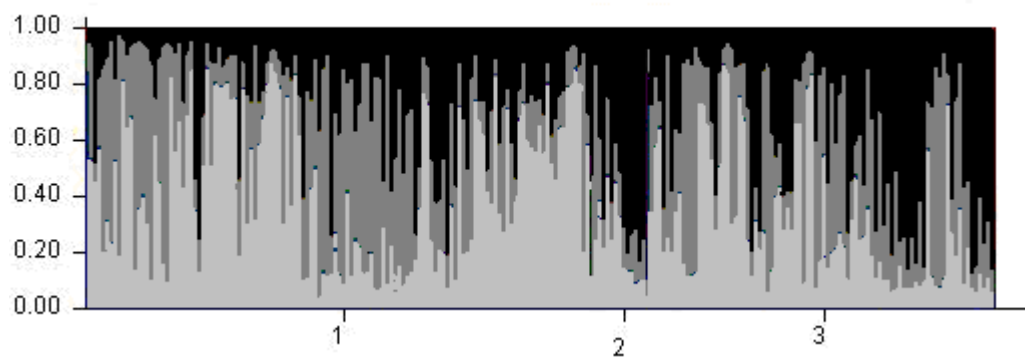


Figure 2. Plot of estimates of Q for the more probable scenario $K = 3$ (mean value of \ln likelihood = $- 5257.9 \pm 33.4$) than $K = 2$ ($- 5409.0 \pm 16.9$) or $K = 1$ ($- 5623.6 \pm 6.3$). Each individual is represented by a single vertical line broken into K colored segments, with lengths proportional to each of the K inferred clusters.

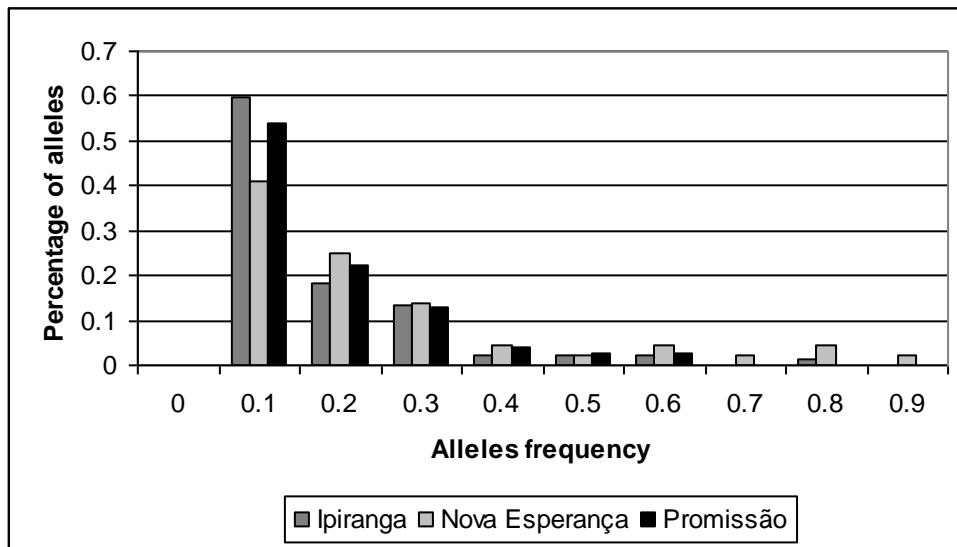


Figure 3. Allele frequency distribution in the three populations of Pantaneiro horses sampled. The bars represent the proportion of all alleles detected in each allele frequency class calculated for Ipiranga ($n = 126$), Nova Esperança ($n = 14$) and Promissão ($n = 87$). No deviations from the L-shaped pattern were observed, indicating a lack of a bottleneck in these populations.

4. Capítulo II

Microssatélites em raças brasileiras de eqüinos: benefícios da avaliação da variabilidade genética

Elise Hofheinz Giacomoni¹, Gabriela P. Fernández-Stolz¹
& Thales R. O. de Freitas²

Manuscrito a ser submetida à revista *Animal Genetics*

Situação atual: *em preparação*

Microsatellites in Brazilian horse breeds: usefulness in assessing genetic variability

Elise Hofheinz Giacomoni¹, Gabriela P. Fernández-Stolz¹
& Thales R. O. de Freitas^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

Porto Alegre 91501-970 – Brazil;

²Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre 91501-970 – Brazil

Correspondence:

Elise Hofheinz Giacomoni

Av. Bento Gonçalves, 9500

Departamento de Genética Prédio 43323 Bairro Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre Caixa Postal 15053, CEP: 91501-970

Brazil

E-mail: elise.giacomoni@ufrgs.br

Keywords: Brazilian horse breeds, microsatellites, genetic variability

Manuscrito a ser submetida à revista *Animal Genetics*

Situação atual: *em preparação*

Summary

Genetic diversity at ten microsatellite loci was compared in four Brazilian horse breeds: Pantaneiro, Crioulo, Brasileiro de Hipismo and Mangalarga. All the microsatellite markers amplified and were polymorphic. The observed heterozygosity (H_o) ranged between 0.383 and 0.793, and the expected heterozygosity (H_e) ranged between 0.479 and 0.892. The average number of alleles detected was 9.1. The cumulative exclusion probability (PE) was 0.993, suggesting that the loci would be suitable for parentage testing in Brazilian horses. The values of F_{IS} for the four breeds suggested low heterozygosity; therefore, there is no inbreeding in the breeds. Our results suggested the existence of genetic differentiation among the four breeds using the F -statistics and the Bayesian MCMC approach. This differentiation was not strongly supported by principal component analysis (PCA), which indicated that the Pantaneiro and BH are more closely related, followed by the Crioulo and Mangalarga.

Introduction

Microsatellites have been widely applied to population-structure analysis, genetic variability and gene-flow estimates, and patterns of dispersion. Moreover, loci of microsatellites have been applied in parentage and relatedness studies in horses (Bowling et al. 1997; Marklund et al. 1994).

Several horse breeds around the world have been analysed by microsatellites, including the Przewalski horse (Breen et al. 1997), Spanish Celtic breeds (Cañon et al. 2000), Norwegian breeds (Bjornstad et al. 2000), European native horse breeds (Solis et al. 2005), Polish Heavy horse (Iwanczyk et al. 2006) and Brazilian Pantaneiro (Giacomoni et al. 2007).

In Brazil there are about ten horse breeds, grouped as commercial and local breeds (Mariante and Cavalcante, 2006). Among the local horse breeds, the Crioulo and Pantaneiro are prominent. The commercial breeds include the Mangalarga and Brasileiro de Hipismo (BH). The Crioulo and Pantaneiro breeds originated from horses from the Iberian Peninsula, brought by the Portuguese during the colonization period. Over time, many animals strayed from their herds and remained in the local areas. The Crioulo is found in southern Brazil and is adapted to the climatic variations that distinguish the region, with extremities of cold and heat (Kelly et al. 2002). The Pantaneiro horses had to adapt to flood conditions in parts of the Pantanal during the summer months (Miserani et al. 2002), and, in the winter, to the completely firm ground characteristic of the dry season.

Horses of the Mangalarga breed originated from animals brought by the settlers (Lippi and Mortari 2003). However the noblemen of the Portuguese royal family imported the best animals, thus playing a role in the conformation of the breed. The Brazilian

Mangalarga Breeders Association later established well-defined guidelines for the improvement and selection of the breed to fit the concept of a working and pleasure horse, maintaining the peculiar characteristics of the breed, mainly in regard to its characteristic trotting gait.

The Brasileiro de Hipismo breed was created in the 1970s with the objective of developing a capable animal for equine sports (Dias et al. 2000). In 1977, the Brazilian Association of Brazilian Hipismo Horse Breeders was recognized by the Ministry of Agriculture as being responsible for the administration of the Service of Genealogical Registration or SRG. The main objective of the Association is to promote the development of the BH horse in the established patterns, striving for animals with good structure and conformation, and with great capacity for sports. The Brasileiro de Hipismo horse is the result of crosses among breeds of great sporting aptitude, including Thoroughbred, Hanoverian, Westfalen, Holsteiner, Selle Français and Oldenburg (Dias et al. 2000) with national mares.

Genetic characterization is the first step in the conservation of breeds, and can assist in conservation strategies (Glowatzki-Mullis et al. 2005; Solis et al. 2005) and management plans (Iwanczyk et al. 2006).

In the present study, microsatellite markers were used to evaluate the genetic diversity of four Brazilian horse breeds, estimating the degree of genetic differentiation and genetic relationships among them.

Materials and Methods

Population samples and DNA extraction

A total of 401 individuals from the Crioulo ($n = 107$), Mangalarga ($n = 21$), Brasileiro de Hipismo ($n = 46$) and Pantaneiro ($n = 227$) breeds were analyzed. Genomic DNA was extracted from total blood (5 – 10 ml, collected from the jugular vein) following Medrano et al. (1990), and was stored at -20°C .

Microsatellites and PCR amplification

Ten microsatellite loci were genotyped in the four horse breeds (**Table 1**). The markers were VHL150 (van Haeringen et al. 1998); VHL20 (van Haeringen et al. 1994); AHT17, AHT20 (Swinburne et al. 1997); HMS02, HMS06, HMS07 (Guérin et al. 1994); HTG4, HTG06 (Ellegren et al. 1992) and HTG08 (Marklund et al. 1994). Six loci were chosen according to the International Society for Animal Genetics (ISAG). The criteria for selecting microsatellites were the high level of heterozygosity, large number of alleles and easy amplification. PCR amplification was performed in a total volume of 15 μl containing 50 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl_2 , 1 U of *Taq* DNA Polymerase and 200 μM of dNTPs. The DNA was initially denatured at 95°C for 10 min, followed by 30 cycles at 94°C for 1 min, annealing at 55° to 60°C for 30 s and extension at 72°C for 1 min. The sizes of DNA fragments were determined from the 25pb (Invitrogen) molecular weight marker.

PCR products were separated by electrophoresis in 6% acrylamide gels under denaturing conditions, followed by silver staining according to the procedure of Bassam et al. (1991).

Statistical analysis

Genetic diversity within each population was measured as well as the number of alleles per locus (N), observed heterozygosity (H_o) and the heterozygosity expected from Hardy-Weinberg proportions (H_e , Nei 1978). The ARLEQUIN 3.0 statistics program (Excoffier et al. 2005) was used to estimate the observed and expected heterozygosity per locus and population.

The allelic frequencies, polymorphic information content (PIC) for each microsatellite and the mean exclusion probabilities (PE) were estimated using the CERVUS 3.0 program (Marshall et al. 1998). The mean number of alleles per locus was calculated using the AGARST program (Harley 2001).

Genetic differentiation among the four breeds was estimated based on unbiased F -statistics according to Weir and Cockerham (1984), using the FSTAT 2.9.3 program (Goudet, 2001). Significance levels ($p = 0.05$) were corrected for simultaneous comparisons with the sequential Bonferroni test (Rice, 1989).

A Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) approach was used in order to examine the distinctiveness of breeds and the clustering of individual genotypes, using the program STRUCTURE (Pritchard et al. 2000).

A principal component analysis (PCA) was performed on the breeds, using the PCAGEN program (J. Goudet, unpublished). Breeds were ordered according to the first and second PCA axes. The significance of each principal component was assessed from 5,000 randomisations.

Results

Genetic Variability

Table 2 shows the number of alleles per locus, observed and expected heterozygosity, inbreeding coefficient values (F_{IS}), polymorphic information content (PIC) and probability of paternity exclusion (PE) per breed. The total number of alleles was $N = 91$ for Pantaneiro, $N = 81$ for Crioulo, $N = 57$ for BH and $N = 41$ for Mangalarga, in the ten loci analyzed. The mean number of alleles per locus was 9.1 for Pantaneiro, 8.1 for Crioulo, 5.7 for BH and 4.1 for Mangalarga.

Microsatellites with PIC -values higher than 0.5 are considered highly informative (Botstein et al. 1980). By this criterion, all the loci except AHT20 (Pantaneiro, Crioulo, BH and Mangalarga), VHL150, HMS02, HMS07 and HTG06 (Mangalarga) were highly informative (**Table 2**).

The probability of paternity exclusion (PE) was calculated by locus for each breed. The PE ranged from 12% for AHT20 to 60% for VHL20 for Pantaneiro, and from 8% for AHT20 to 48% for HTG08 for Crioulo. AHT17 was not available for BH and MG. The PE ranged from 12% for AHT20 to 43% for HTG06 in BH horses, and from 4% for VHL150 to 47% for HTG08 in Mangalarga. From the complete microsatellite dataset, the probability of paternity exclusion was 0.993 for Pantaneiro, 0.968 for Crioulo, 0.953 for BH and 0.884 for Mangalarga (**Table 2**).

The breed that showed the highest allelic variability was the Pantaneiro, with 91 alleles (mean 9.1 alleles per locus). The Mangalarga showed the smallest number of alleles, with a mean of 4.1 alleles per locus. The loci that showed the highest number of alleles in the Pantaneiro breed were VHL20, AHT017 and HTG06 with 13 alleles, and in

the Crioulo breed were the same three loci with eleven alleles. In the BH breed the locus with the highest number of alleles was HGT06 with ten alleles, while in the Mangalarga, HTG04 and HGT08 with seven alleles (**Table 2**).

The expected heterozygosity values (H_e) for each locus ranged from 0.291 for VHL150 in Mangalarga to 0.880 for VHL20 in Pantaneiro. Likewise, the observed values (H_o) ranged from 0.076 for AHT020 in BHs to 0.916 for VHL20 in Mangalarga. Values of H_o for each population over all the loci examined were $0.394 \leq H_o \leq 0.897$ for Pantaneiro, $0.256 \leq H_o \leq 0.572$ for Crioulo, $0.076 \leq H_o \leq 0.704$ for BH and $0.263 \leq H_o \leq 0.916$ for Mangalarga.

Nine loci in the Pantaneiro breed and seven in the Crioulo showed significant deviations from the genotype proportion expected according to the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), after the Bonferroni correction for multiple tests ($p < 0,005$; **Table 2**). Only one locus (HMS06) for Mangalarga and four loci (VHL020, AHT020, HMS02 and HTG08) for BH showed significant deviations according to the Hardy-Weinberg equilibrium. AHT17 was not evaluated for these two breeds because of amplification problems.

A total of ten private alleles were observed in the Pantaneiro, four private alleles in the Crioulo and two in the BH breeds. No private alleles were found in the Mangalarga. The allelic richness, calculated as the mean number of alleles per locus per population, showed higher values for the Pantaneiro (9.1) and Crioulo (8.1) than for BH (5.7) and Mangalarga (4.1) (**Table 2**).

The within-population inbreeding estimates (F_{IS}) are shown in **Table 2**. The results indicated a higher value for BH ($F_{IS} = 0.321$, $p < 0.0013$) than for Crioulo ($F_{IS} = 0.291$, $p <$

0.0013), Pantaneiro ($F_{IS} = 0.147$, $p < 0.0013$) and Mangalarga horses ($F_{IS} = 0.060$, $p < 0.1188$).

The estimates of interpopulation differentiation were measured by F_{ST} coefficients. The values for pairwise F_{ST} were low (eight loci were used in this analysis), and ranged from 0.044 (between Pantaneiro and BH) to 0.168 (between Crioulo and Mangalarga) (**Table 3**). The values revealed significant levels of genetic differentiation among the four breeds. The pairwise F_{ST} between Pantaneiro and BH was lower, but still indicated significant population structure.

The highest effective number of migrants per generation ($Nm = 5.679$) was observed between the Crioulo-Pantaneiro pair, which was high in comparison to the values for the Pantaneiro-Mangalarga pair ($Nm = 0.857$) and the Crioulo-BH pair ($Nm = 0.743$) (**Table 3**).

Using the Bayesian MCMC approach and considering a range from one to four potential breeds, the probability value obtained for four breeds ($K = 4$, mean value of \ln likelihood = -8853.7 ± 29.2) was higher than three ($K = 3$, mean value of \ln likelihood = -9086.6 ± 26.3), than two ($K = 2$, mean value of \ln likelihood = -9392.6 ± 21.1) and than one breed ($K = 1$, mean value of \ln likelihood = -9751.9 ± 6.5).

The pattern of genetic differentiation obtained from the PCA analysis was represented by a plot of scores based on allele frequency in the four horse breeds (**Figure 1**). The first principal component axis (PC1) accounted for 7.39% ($p = 0.290$) of the total genetic diversity, and the second (PC2), for 6.70% ($p = 0.290$). The PCA1 axis suggested a differentiation between the Mangalarga and the other breeds; and the PCA2 axis indicated a slight separation between the Crioulo and the other breeds. None of the principal components indicated a difference between the Pantaneiro and the BH.

Discussion

This study presents a genetic analysis of microsatellites in four Brazilian horse breeds with different characteristics and local distributions. An advantage of using these markers was that six of them were included in the list of the International Society for Animal Genetics (ISAG). Thus, our data can be compared to those for other breeds and studies.

The mean number of alleles of the Pantaneiro ($N = 9.1$) and Crioulo ($N = 8.1$) breeds were similar to the other breeds, with high levels of allelic diversity. For other breeds, the mean numbers of alleles per locus reported are: 7.06 for Lipizzaner horses (Achmann et al. 2004), 10.4 for Portuguese horse breeds (Luís et al. 2007) and 6.0 for Spanish Trotter horses (Azor et al. 2007). However, the BH ($N = 5.7$) and the Mangalarga ($N = 4.1$) showed low levels of allelic diversity. Similar observations were reported by Glowatzky-Mullis et al. (2005) and Aberle et al. (2004), where the mean number of alleles per locus was significantly lower in Thoroughbred and Arabian horses. The observed differences in allelic diversity among the breeds may be related to the number of analyzed animals of each breed, because the first two had double and triple the number of investigated animals; and may also be a consequence of management and breeding strategies. This can be observed in local breeds, such as the Pantaneiro, which is bred differently than commercial breeds, such as extensive and semi-extensive breeding.

The expected heterozygosities of the Pantaneiro ($He = 0.738$), Crioulo ($He = 0.669$), BH ($He = 0.634$) and Mangalarga ($He = 0.609$) breeds were similar to those of other breeds, indicating that there are no differences in the level of genetic variability in these breeds. These results can be compared with other breeds, such as the Portuguese

(Luis et al. 2007), Lipizzaners (Achmann et al. 2004) and German draught horses (Aberle et al. 2004). This indicates that the Pantaneiro breed is not in danger of extinction.

According to Morais et al. (2005), individual values of *PIC* were strictly correlated with the effective number of alleles detected by each corresponding locus (**Table 1**). The Pantaneiro breed showed the highest *PIC* value as well as the highest number of alleles. This relationship of the *PIC* value to the number of alleles was also observed in the Crioulo and BH breeds.

The paternity exclusion probability (*PE*) with all loci for Pantaneiros was 0.99, indicating a high power of exclusion. The loci that contributed most to the *PE* value were VHL20 and AHT17. These results indicate that the chosen loci are good measures of paternity exclusion for these breeds. Among the 10 loci chosen for the analyses in this study, six are part of the recommended ISAG panels of markers for parentage verification. The *PE* for the Crioulo was 0.96, for the BH 0.95 and for the Mangalarga 0.88. These values suggest a relationship to allelic variability.

The results of the F_{IS} coefficient analysis indicated that the breeds which showed high F_{IS} values were significant. This suggests that inbreeding is not occurring among the animals.

Applying the Structure program based on the clustering method to infer the population structure using genotype data, it was possible to conclude that the animals studied are indeed structured as four distinct breeds.

F-statistics showed that F_{ST} values between Pantaneiro, Crioulo and BH breeds were low; however, this was nonsignificant. The Mangalarga showed the highest F_{ST} values, indicating high differentiation. This suggests that the Pantaneiro and the BH are most closely related, followed by the Crioulo and finally by the Mangalarga.

Although non significant, the PCAGEN results agreed with the F_{ST} estimate because the Pantaneiro breed is more closely related to BH and Crioulo, followed by Mangalarga. The PCAGEN values reinforce the F_{ST} results, suggesting that the Mangalarga is more distantly related to the other breeds.

Among the Brazilian breeds studied, the Pantaneiro and Crioulo showed higher variability for most of the parameters considered, while the BH and Mangalarga showed the lowest variability for microsatellite markers.

Acknowledgements

The authors are particularly grateful to Fazenda Ipiranga, Estância Olhos d'Água, Centro de Treinamento Mão na Rédea, Cabanha Caapuã, Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Pantaneiros (ABCCP), Fazenda Promissão, Haras Joter, Sociedade Hípica Portoalegrense (SHPA), Núcleo Riograndense de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga, Fazenda Alvorada, Haras do Cedro, Haras do Otnacer, Haras Santo Antônio, Dr. Antônio Caetano Pinto, Dr. Roberto Buzato, Daniel Baldissera and Cristóvão Dellagerisi for kindly providing blood samples. The authors thank Tatiane Noviski Fornel for designing the graph. This study was supported by CNPq, CAPES and FAPERGS.

References

- Aberle K., Hamann H., Drögemüller C. & Distl O. (2004) Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics* 35,270-277.
- Achmann R., Curik I., Dovc P., Kavari T., Bodo I., Habe F., Marti E., Sölkner J. & Brem G. (2004) Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics* 35,285-295.
- Azor P., Valera M., Gomez M., Goyache F. and Molina A. (2007) Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 30,37-42.
- Bassam B.J., Caetano-Anollés G. & Gresshoff P.M. (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem* 80,81-84.
- Baumung R., Simianer H. & Hoffmann I. (2004) Genetic diversity studies in farm animals - a survey. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 121,361-373.
- Bjornstad G., Gunby E. & Roed K. (2000) Genetic structure of Norwegian horse breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 117,307-317.
- Botstein D., White R., Skolnick M. & Davis R. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32,314-331.
- Bowling A.T., Eggleston-Stott M.L., Byrns G., Clark R.S., Dileanis S. & Wictum E. (1997) Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics* 28,247-252.
- Breen M., Lindgren G., Binns M., Norman J., Irvin J., Bell K., Sadberg K., & Ellegren, H. (1997) Genetical and physical assignments of equine microsatellites - first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 8,267-273.
- Cañon J., Checa M., Carleos C., Vega-Pla J., Vallejo M. & Dunner S. (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 31,39-48.
- Dias I., Bergmann J., Rezende, A. & Castro G. (2000) Formation and population structure of the Brasileiro de Hipismo horse breed. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences* 52,647-654.
- Ellegren H., Johansson M., Sandberg K. & Andersson L. (1992) Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics* 23,133-142.

- Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005) Arlequin version 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1,47-50.
- Galov A., Byrne K., Duras-Gomercic M., Gomercic T., Nushol Z., Vincek D., Kocijan I., Tadic Z., Benkovic V., Baic I. and Funk S. (2005) Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Production Science* 93,277-282.
- Giacomoni E, Fernández-Stolz G & Freitas T (2008) Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. *Genetics and Molecular Research* 7(1) 261-270.
- Glowatzki-Mullis, M., Muntwyler, J., Pfister, W., Marti, E., Rieder, S., Poncet, P., Gaillard, C. (2005) Genetic diversity among horse populations with a special focus on the Franches-montagnes breed. *Animal Genetics* 37-33-39.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).
- Guérin G., Bertaud M. & Amigues Y. (1994) Characterization of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Animal Genetics* 25:62.
- Harley E.H. (2001) AGARst. A program for calculating allele frequencies, G_{st} and R_{st} from microsatellite data. Version 2.0. University of Cape Town, Cape Town.
- Iwanczyk E., Juras R., Cholewinski G. & Cothran, E. (2006) Genetic structure and phylogenetic relationships of the Polish Heavy horse. *Journal of Applied Genetics* 47,353-359.
- Kelly L., Postiglioni A., Andrés D., Veja-Plá J., Gagliardi R., Biagetti R. & Franco, J. (2002) Genetic characterization of the Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. *Research in Veterinary Science* 72,69-73.
- Lippi A.S. & Mortari N. (2003) Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Mangalarga (*Equus caballus*). *Genetics and Molecular Biology* 26,431-434.
- Luís C., Juras R., Oom M.M., & Cothran E.G. (2007) Genetic diversity and relationships of Portuguese and other horse breeds on protein and microsatellite loci variation. *Animal Genetics* 38,20-27.
- Mariante A. & Cavalcante N. (2006) Animals of the Discovery – Domestic breeds in the history of Brazil. 2nd ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 274 p.

- Marklund S., Ellegren H., Eriksson S., Sandberg K. & Andersson, L. (1994) Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25,19-23.
- Marshall T., Slate J., Kruuk L. & Pemberton J. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7,639-340.
- Medrano J., Aesen E., Sharrow L. (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8-43.
- Miserani M., McManus C., Santos S., Silva J., Mariante A. & Abreu, U. (2002) Evaluation of the factors which influence linear measurements of the Pantaneiro Horse. *Brazilian Journal of Animal Science* 31 335-341.
- Morais J., Oom M., Malta-Vacas J. & Luís C. (2005) Genetic structure of an endangered Portuguese semiferal pony breed, the Garrano. *Biochemical Genetics* 43,347-364.
- Nei M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155,945-959.
- Rice W.W. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43,223-225.
- Solis A., Jugo B., Mériaux J., Iriondo M., Mazón L., Aguirre A., Vicario A. & Estombo A. (2005) Genetic diversity within and among four South European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: implications for conservation. *Journal of Heredity* 96,670-678.
- Swinburne J., Marti E., Breen M. & Binns M. (1997) Characterization of twelve new horse microsatellite loci: AHT12-AHT23. *Animal Genetics* 28,453.
- van Haeringen H., Bowling A.T., Stott M.L., Lenstrat J.A. & Zwaagstra K.A. (1994) A highly polymorphic horse microsatellite locus: VHL20. *Animal Genetics* 25,207.
- van Haeringen W.A., van de Goor L.H.P., van den Hout N., Lenstra J.A. & van Haeringen H. (1998) A polymorphic horse microsatellite locus: VHL150. *Animal Genetics* 29,464.
- Weir B. & Cockerham C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38,1358-1370.

Table 1. Chromosome numbers, primer sequences, and annealing temperatures of 10 microsatellite loci employed to assess the genetic variability of Brazilian horse breeds.

Locus	Chromosome number	Primer sequence	Annealing temperature
VHL150	27	5'CTCCTATGGGTGTCAGAAAG3' 5'TGTAATCTGTGGGGGAGACT3'	55
VHL20	30	5'CAAGTCTTACTTGAAGACTAG 3' 5'AACTCAGGGAGAATCTTCCTCAG3'	60
AHT17	12	5'CCCCATAACCACAAGTGAGG3' 5'GAAGTGGGAGAGTCGGTAAGG3'	60
AHT20	21	5'GAATTCTCTGGTTGGAAAGGC3' 5'ACTTATGGGACGTGCTGGAC3'	60
HMS02	10	5'AGCGTGGCAACTGCCAAGGAAG3' 5'CTTGCAAGTCGAATGTGTATTAATG3'	56
HMS06	4	5'GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG3' 5'CTCCATCTTGTGAAGTGTAACCTCA3'	56
HMS07	1	5'CAGGAAACTCATGTTGATAACCATC3' 5'TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT3'	56
HTG04	9	5'CTATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC3' 5'CTCCCTCCCTCCCTCTGTTCTC3'	55
HTG06	15	5'CCTGCTTGGAGGCTGTGATAAGAT3' 5'GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT3'	55
HTG08	9	5'CAGGCCGTAGATGACTACCAATGA3' 5'TTTTCAGACTTAATTGGTATCACA3'	55

Table 2. Microsatellite genetic variation in three populations of Pantaneiro, Crioulo, BH and Mangalarga horses. Number of alleles per locus (N), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), inbreeding coefficient values (F_{IS}), polymorphic information content (PIC) and probability of paternity exclusion (PE) per population. n , sample size; NA, not available.

Breeds	Locus	N	H_o	H_e	F_{IS}	PIC	PE
PAN ($n = 227$)							
	VHL150	7	0.618	0.623*	0.007	0.575	0.215
	VHL020	13	0.733	0.880*	0.167	0.866	0.604
	AHT17	13	0.897	0.871	-0.031	0.855	0.584
	AHT020	6	0.394	0.492*	0.180	0.440	0.123
	HMS02	7	0.723	0.710*	-0.022	0.670	0.304
	HMS06	6	0.461	0.707*	0.346	0.656	0.287
	HMS07	7	0.440	0.710*	0.381	0.664	0.304
	HTG04	9	0.714	0.834*	0.142	0.811	0.496
	HTG06	13	0.675	0.710*	0.047	0.666	0.310
	HTG08	10	0.625	0.848*	0.260	0.823	0.519
	Mean	9.1	0.628	0.738	0.147***	0.703	0.993**
CRI ($n = 107$)							
	VHL150	8	0.557	0.646*	0.130	0.610	0.248
	VHL020	11	0.256	0.613*	0.583	0.593	0.236
	AHT17	11	0.500	0.735*	0.323	0.702	0.349
	AHT020	4	0.307	0.410	0.219	0.366	0.080
	HMS02	5	0.512	0.554	0.061	0.510	0.163
	HMS06	7	0.441	0.708*	0.377	0.661	0.296
	HMS07	6	0.457	0.677*	0.316	0.615	0.254
	HTG04	9	0.572	0.797*	0.280	0.760	0.417
	HTG06	11	0.571	0.720	0.197	0.673	0.315
	HTG08	9	0.534	0.830*	0.357	0.801	0.480
	Mean	8.1	0.470	0.669	0.291***	0.629	0.968**
BH ($n = 46$)							
	VHL150	6	0.704	0.658	-0.071	0.612	0.246
	VHL020	7	0.419	0.759*	0.446	0.710	0.356
	AHT17	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	AHT020	3	0.076	0.590*	0.857	0.408	0.125
	HMS02	5	0.370	0.721*	0.482	0.635	0.264
	HMS06	6	0.638	0.635	-0.007	0.592	0.232
	HMS07	7	0.611	0.707	0.138	0.669	0.308
	HTG04	8	0.673	0.742	0.094	0.698	0.337
	HTG06	10	0.648	0.814	0.197	0.768	0.431
	HTG08	5	0.111	0.718*	0.842	0.629	0.261
	Mean	5.7	0.425	0.634	0.321***	0.572	0.953**
MG ($n = 21$)							
	VHL150	3	0.285	0.291	0.020	0.255	0.040
	VHL020	6	0.916	0.811	-0.136	0.745	0.392
	AHT17	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	AHT020	3	0.777	0.565	-0.392	0.489	0.151
	HMS02	4	0.263	0.440	0.348	0.356	0.078
	HMS06	5	0.368	0.623*	0.382	0.530	0.181
	HMS07	3	0.277	0.579	0.528	0.495	0.159
	HTG04	7	0.714	0.638	-0.121	0.590	0.231
	HTG06	3	0.450	0.444	-0.012	0.359	0.094
	HTG08	7	0.812	0.854	0.046	0.801	0.475
	Mean	4.1	0.486	0.609	0.060	0.462	0.884**

* $p < 0.05$ after Bonferroni correction for multiple tests.

**PE total

Table 3. Population differentiations among Pantaneiro, Crioulo, BH and Mangalarga horse populations based on 10 microsatellite loci. The numbers of effective migrants per generation (Nm) are presented above the diagonal, while the F_{ST} valuations are presented below the diagonal.

	PAN	CRI	BH	MG
PAN		5.679	0.918	0.857
CRI	0.047		0.743	0.871
BH	0.044	0.073		1.270
MG	0.113	0.186	0.147	

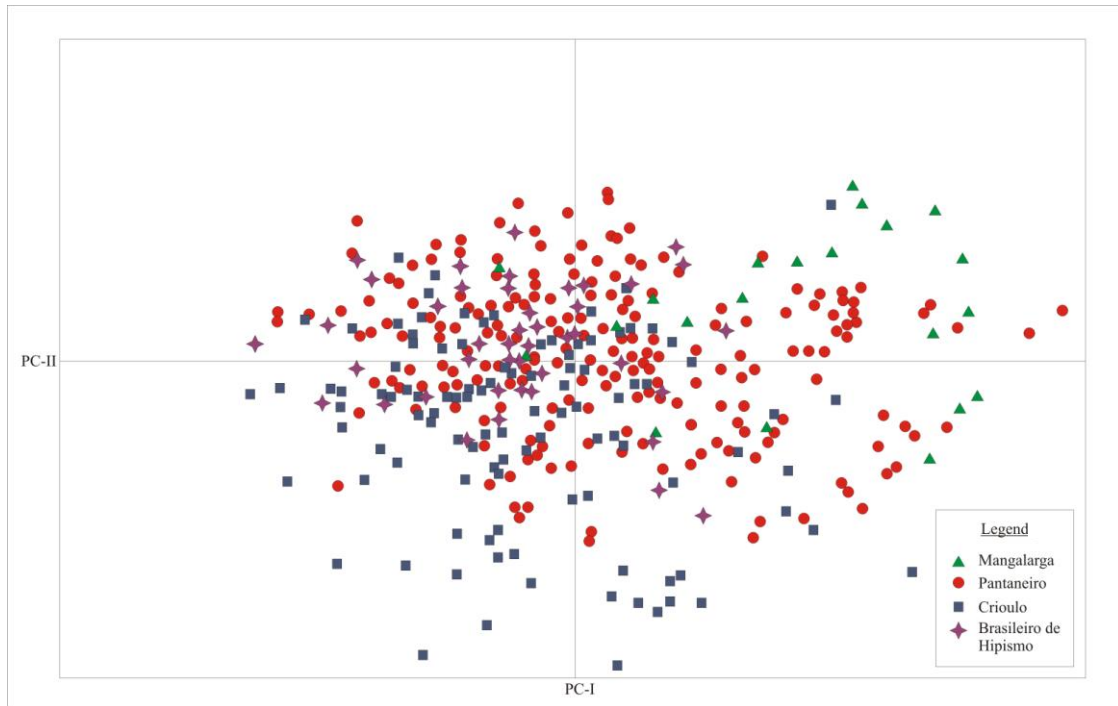


Figure 1. Plot of scores of principal component analysis based on allele frequencies of four Brazilian horse breeds.

5. DISCUSSÃO

Estudos com marcadores moleculares microssatélites em raças brasileiras de cavalos ainda são reduzidos quando comparados com os de raças européias. A ampliação do número desses estudos trará benefícios não só para o ambiente, mas também para o homem, pois fornecerão subsídios para conhecermos e entendermos melhor a história e a biologia desses animais a fim de conservá-los e preservá-los.

Por meio do presente estudo foi comparado o grau de variabilidade genética entre rebanhos da raça Pantaneira e, também entre quatro rebanhos representativos de quatro raças brasileiras de cavalos: Brasileiro de Hipismo (BH), Crioula, Mangalarga e Pantaneira. Dois artigos foram escritos utilizando como marcadores moleculares, dez *loci* de microssatélites. Considerando que os resultados obtidos e suas conclusões foram realizados de maneira independente, da mesma forma as discussões serão realizadas separadamente.

Os cavalos da raça Pantaneira tiveram a sua origem em cavalos ibéricos trazidos pelos colonizadores europeus (Santos et al. 2000). Eles foram importantes para a fixação do homem no Pantanal e contribuem para as atividades econômicas da região, além de fazerem parte do seu ecossistema. Por isso, a sua conservação é fundamental tanto para a natureza como para o homem.

Nos três rebanhos estudados no Capítulo I dez *loci* de microssatélites foram analisados. Todos amplificaram e mostraram-se polimórficos. Os *loci* estudados apresentam relatos na bibliografia, principalmente HMS6, HMS7, HTG4, VHL20, HMS2 e HTG6, *loci* recomendados pela Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG) para verificação de parentesco.

Com relação ao número de alelos, comparativamente a outras raças de cavalos, constatou-se valores inferiores aos encontrados para os *loci* HMS02, HMS07 e HTG4 para raças de jumento (Jordana e et al. 2001 & Aranguren-Méndez et al. 2001) e de cavalos de raças japonesas (Tozaki et al. 2003). O número de alelos para HMS06 não variou muito em

comparação com raças européias, tais como cavalos da raça Lipizzan (Curik et al. 2003 & Achmann et al. 2004). Não foram encontrados valores superiores ao do presente estudo para os *loci* AHT17 e HTG06. Entretanto, os resultados indicaram a correta amplificação dos *loci* sugerindo-os para estudos de variabilidade genética nas raças escolhidas.

A variabilidade genética encontrada nos animais estudados das três fazendas indicou maior frequência no número de alelos em cavalos das Fazendas Ipiranga e Promissão. Isso se deve, provavelmente, ao fato da diferença no tamanho amostral de ambas. A amostra da Fazenda Esperança foi menor em relação à das Fazendas Promissão e Ipiranga, seis e 14 vezes, aproximadamente.

Quanto ao tamanho dos fragmentos, não houve diferenças significativas em relação aos resultados relatados na bibliografia consultada. A maioria dos alelos encontrados, também foi citada por outros autores (Morais et al. 2005; Achmann e et al. 2004; Curik et al. 2003).

A variabilidade genética em Pantaneiros também foi avaliada através das heterozigosidades esperadas e observadas e pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Na análise da heterozigosidade conjunta para as três fazendas, a heterozigosidade esperada foi maior que a observada corroborando os dados da bibliografia. (Achmann et al. 2004; Behl et al. 2006; Azor et al. 2007). Avaliando as amostras das três fazendas, considerando cada *locus* separadamente, foi observado um elevado número de indivíduos homozigotos, sendo a heterozigosidade observada menor que a esperada. Essa situação foi exceção nos *loci* AHT17 e HMS02 nas três fazendas, indicando excesso de heterozigotos. O elevado número de homozigotos pode ser devido a excesso de endocruzamento, acasalamento direcionado e/ou deriva genética.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC), estimados de forma conjunta para os três rebanhos, indicaram que 70,6% dos marcadores foram considerados altamente informativos (Botstein et al., 1980). A exceção foi o *locus* AHT20 (PIC =

0,476). O número de indivíduos analisados, provavelmente, deve ter afetado o valor do PIC desse *locus*, uma vez que foi um dos *loci* com o menor *n*. Além disso, o número de alelos encontrados pode ter influenciado também no valor do PIC.

A determinação de paternidade é uma estimativa de grande importância na seleção animal, principalmente quando se trata de animais domésticos. Por essa razão, a utilização de ferramentas eficazes, tal como a utilizada, para esse tipo de investigação é fundamental para essas avaliações. O marcador molecular de DNA microssatélites é uma ferramenta muito utilizada atualmente nesse tipo de verificação. Ela é rápida e requer somente uma pequena amostra de material biológico, podendo o DNA ser extraído da pele, urina, pêlos, material congelado, sem precisar ser tecido-específico. Além disso, os microssatélites têm se apresentado com alto poder de exclusão de paternidade em vários estudos, principalmente em raças de cavalos (Tozaki et al. 2001; Juras & Cothran, 2004; Galov et al. 2005; Lee & Cho, 2006). Quanto maior o valor de exclusão, maior a chance de se identificar um falso progenitor. A probabilidade de exclusão conjunta de paternidade (PE) considerando as três fazendas foi de 99,3%. Para se obter um número próximo de 100%, a literatura sugere o aumento do número de *loci* e de amostras. Sendo assim, neste trabalho, o marcador microssatélite se mostrou um bom mensurador de exclusão de paternidade para a raça Pantaneira.

Em relação à análise da estrutura genética, o índice de F_{st} indica a proporção da variabilidade genética encontrada entre populações. Os valores obtidos de F_{st} , provenientes da comparação entre as três fazendas foi de 0,008 entre Nova Esperança e Promissão e de 0,06 entre Ipiranga e Nova Esperança. Os resultados apontam para uma baixa estruturação para as amostras estudadas sugerindo pouca diferenciação entre as mesmas.

O índice de F_{is} , que representa o coeficiente de endogamia, foi baixo nas três populações, com exceção de três *loci* da Fazenda Ipiranga (VHL150, AHT17 e HMS02), quatro da Fazenda Nova Esperança (VHL150, AHT17, HMS02 e HMS07) e três da Fazenda Promissão (AHT17, HMS02 e HTG04), os quais apresentaram valores negativos. Valores altos para F_{is} indicam excesso de homozigotos nas populações o que sugere,

provavelmente, o endocruzamento praticado nas populações. Valores negativos indicam excesso de heterozigotos.

Os três testes de gargalo de garrafa aplicados no estudo, trouxeram às análises estatísticas, dados importantes sobre o tamanho populacional. Os resultados sugerem que os animais das fazendas estudadas não passaram por um processo de declínio populacional recente, mas que provavelmente animais da Fazenda Nova Esperança estariam passando por um processo de estruturação. Para a raça Pantaneira é um bom indício para o status da sua conservação, uma vez que a raça consta como em perigo de extinção pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO). Isso mostra que, nem as doenças que abatem centenas de animais por ano, tais como a Anemia Infecciosa Equina e a Tripanossomíase, nem o endocruzamento indiscriminado têm afetado a raça.

No Capítulo II, foram realizadas as mesmas análises estatísticas do Capítulo I quanto à variabilidade genética em quatro raças brasileiras de cavalos: Pantaneiro, Crioulo, Brasileiro de Hipismo e Mangalarga. Além disso, a diferenciação genética foi analisada por meio do cálculo do *Fst*, de Componentes Principais e do Programa Structure. Os dez *loci* de microssatélites estudados no Capítulo I foram aplicados também neste trabalho. Todos os *loci* amplificaram nas quatro raças, com a exceção de AHT17 em BH e Mangalarga.

A raça que apresentou maior variabilidade alélica foi a Pantaneira ($n = 91$) seguida pelas raças Crioula ($n = 81$), BH ($n = 57$) e Mangalarga ($n = 41$). Essas diferenças de variabilidade, provavelmente, foram influenciadas pelo número de amostras de cada raça.

Foi observado elevado número de indivíduos homozigotos, sendo a heterozigosidade observada menor que a esperada, assim como constatado nas populações estudadas no artigo I. Essa situação ocorreu mais nas raças Pantaneira, Crioula e BH do que na raça Mangalarga. A heterozigosidade da raça Mangalarga pode ser explicada pelo baixo número amostral analisado.

A presença de dez alelos exclusivos em Pantaneiros, quatro em Crioulos e dois em BH sugere a influência do tamanho da amostra na determinação desta variável, uma vez

que os Pantaneiros têm um número maior de animais analisados do que as outras raças, cerca de duas vezes mais do que Crioulos, quatro vezes mais do que BH e dez vezes mais que a amostra de Mangalarga. Esta última raça, com 21 animais estudados, não apresentou nenhum alelo exclusivo.

Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) indicaram que os dez *loci* analisados foram mais informativos na raça Pantaneira quando comparados às outras raças. Isso sugere uma estrita relação entre valores de PIC e a variabilidade alélica e que a obtenção de valores maiores de PIC remete a utilização de mais *loci* e um aumento de amostra.

Os resultados obtidos através das análises com os dez *loci* de microssatélites indicaram uma probabilidade de exclusão (PE) de 99,3% em cavalos da raça Pantaneira. Esses dados evidenciam que essa ferramenta molecular (DNA microssatélite) pode informar aos criadores de cavalos a exclusão de possíveis progenitores. Essa indicação é muito importante uma vez que as associações de criadores atualmente estão exigindo teste de paternidade e a movimentação de capital que gira em torno dos negócios com equinos no mundo todo é alta. O valor de PE da raça Pantaneira foi seguido de 96,8% em Crioulos; 95,3% em BH e 88,4% em Mangalarga. Considerando que BH e Mangalarga tiveram menos *loci* analisados, pode-se observar que o número de *loci* e o número de alelos está estreitamente relacionado com valores significativos de PE.

O coeficiente de endogamia (Fis) apresentou valores altos para as quatro raças, com algumas exceções, de *loci* que apresentaram valores negativos. Esses resultados corroboram com o excesso de homozigotos dos *loci*. Além disso, os valores de Fis negativos correspondem com valores de heterozigosidade observada maior que a esperada.

Através do programa Structure, pode-se inferir que Brasileiro de Hipismo, Crioulo, Mangalarga e Pantaneiro não estão estruturadas em quatro distintas raças. Aliado a isso, a estatística F, por meio de altos valores de Fst, sugere que a raça Mangalarga é mais diferenciada das outras raças: Pantaneiro, Crioulo e BH.

Embora não significativos, os resultados do programa PCAGEN corroboram os resultados apresentados pela estimativa de F_{st} , os quais sugerem que a raça Mangalarga está mais distante das outras raças. Essa distância pode ser consequência de leitura genética de genes de raças formadoras dos cavalos Mangalarga.

Além dos resultados e conhecimento obtidos, deve-se salientar a importância deste trabalho, uma vez que, poucos trabalhos têm sido desenvolvidos com *loci* de microssatélites em raças equinas tipicamente brasileiras.

Estudos que evidenciem a necessidade de controlar a variabilidade genética, a consangüinidade, a conservação de raças, o mapeamento genômico de animais domésticos e testes de paternidade são alguns exemplos de trabalhos que devem chamar a atenção dos pesquisadores para avançarmos nossos conhecimentos nessa área a fim de que possamos melhorar a qualidade de nossos rebanhos.

6. CONCLUSÕES

1 - Utilizou-se *loci* de microssatélites específicos para a espécie *Equus caballus* em quatro raças brasileiras de cavalos, comprovando a sua amplificação e seu polimorfismo.

2 - Foi observado um total de 91 alelos numa amostra de 227 animais de cavalos pantaneiros, divididos em três rebanhos representativos a três fazendas do Pantanal: Fazenda Ipiranga, Fazenda Nova Esperança e Fazenda Promissão.

3 – A diversidade alélica encontrada entre os *loci* polimórficos foi registrada em maior número nos *loci* VHL20, AHT17 e HTG06 com 13 alelos seguidos de dez alelos no locus HTG08, nove no locus HTG06, sete nos *loci* VHL150, HMS02 e HMS07 e seis nos *loci* AHT20 e HMS06.

4 – A amostra que apresentou maior diversidade alélica foi representativa à Fazenda Ipiranga com 82 alelos, seguida pela Fazenda Promissão com 78 alelos e pela Fazenda Nova esperança com 44 alelos.

5 - O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi altamente significativa na amostra estudada para cavalos da raça Pantaneira.

6 - A probabilidade de exclusão de paternidade (PE) foi alta para a raça Pantaneira (99,3%). Isto sugere que os *loci* empregados em estudos de paternidade foram satisfatórios.

7 – As heterozigosidades esperadas foram maiores que as observadas em todas as amostras, com exceção de três *loci* em cada: VHL150, AHT17 e HMS2 (Fazenda Ipiranga), VHL150, AHT17 e HMS02 (Fazenda Nova Esperança) e AHT17, HMS02 e HTG04 (Fazenda Promissão).

8 – O coeficiente de endocruzamento (Fis) foi baixo para as três populações estudadas.

9 – A diferenciação genética, estimada pelo cálculo do Fst, também foi baixa para as três populações.

10 – Três métodos para estimar efeito de gargalo de garrafa foram utilizados. O método gráfico e o teste Wilcoxon usando o Modelo de Mutação SMM não apresentaram padrões de gargalo de garrafa para nenhuma das três populações estudadas.

11 – Já o Modelo de Mutação TPM sugere um sinal de gargalo de garrafa para os animais das Fazenda Ipiranga e Promissão.

12 – Para a estatística M, se detectou padrões de gargalo de garrafa quando consideramos os valores de desvio padrão, para Fazenda Nova Esperança.

13 – Com isso, sugerimos que não há preocupação imediata com perda de variação dentro da raça Pantaneira.

14 – Para o estudo em quatro raças brasileiras de cavalos (Brasileiro de Hipismo – BH, Crioulo, Mangalarga e Pantaneiro), também, utilizou-se 10 *loci* de microssatélites. Todos os *loci* amplificaram em todas as raças.

15 - A raça que apresentou maior diversidade alélica foi a Pantaneira, seguida pela raça Crioula, BH e finalmente pela raça Mangalarga.

16 - Foi observado um total de 91 alelos numa amostra de 227 animais de cavalos Pantaneiros, 81 alelos para a amostra de 107 cavalos Crioulos, 81 alelos para uma amostra de 46 cavalos BH e 41 alelos numa amostra de 21 animais da raça Mangalarga.

17 - A maior diversidade alélica encontrada foi entre os *loci* VHL20, AHT17 e HTG6 (Pantaneiros e Crioulos), HTG06 (BH) e HTG04 e HTG08 (Mangalarga).

18 – As heterozigosidades observadas foram menores que as esperadas em todas as raças.

19 – Constatou-se a presença de alelos exclusivos nas raças Pantaneira (10) Crioula (4) e BH (2).

20 – Os valores do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram altamente informativos para as quatro raças de cavalos estudadas.

21 - A probabilidade de exclusão de paternidade (PE) foi de 99,3% para a raça Pantaneira, 96,8% para a raça Crioula, 95,3% para BH e 88,4% para Mangalarga.

22 - O coeficiente de endocruzamento (Fis) foi alto para as quatro raças estudadas.

23 – A partir dos cálculos da estatística F, sugere-se que Mangalarga é a raça que mais se diferencia das demais raças estudadas: Pantaneiro, Crioulo e BH.

24 - Pode-se inferir que as quatro raças não estão estruturadas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achmann R, Curik I, Dovic P, Kavar T, Bodo I, Habe F, Marti E, Sölkner J & Brem G (2004) Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics* 35:285-295.
- Ahrens E & Stranzinger G (2005) Comparative chromosomal studies of *E. caballus* (ECA) and *E. przewalskii* (EPR) in a female F1 hybrid. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122:97-102.
- Anunciação CE & Astolfi-Filho S (2000) Paternity test in "Mangalarga-Marchador" equines by DNA-fingerprinting. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 35:2007-2015.
- Aranguren-Méndez J, Jordana J & Gomez M (2001) Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers *Genetic Selection Evolution* 33:433-442.
- Azor P, Valera M, Gomez M, Goyache F & Molina A (2007) Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 30:37-42.
- Bailey E, Skow L, Bernoco D, Delvalle A, Scavone M, Bowling A & Murray J (2000) Equine dinucleotide repeat loci LEX071 through LEX078. *Animal Genetics* 31:286-287.
- Behara A, Colling D & Gibson J (1998) Using Genetics to Pinpoint Endangered Canadian Horse Breeds. In: *The Canadian Horse Annual*. Canada Anais.
- Behl R, Behl J, Gupta, N, Gupta S, Ahlawat, S, Ragnekar M & Ahmed Z (2006) Genetic characterization of Zanskari breed of horse. *Journal of Genetics* 85:199-203.
- Binns M, Swinburne J & Breen M (2000) Molecular genetics of the horse. In: Bowling A & Ruvinsky A (eds.) *The genetics of the horse*. California. CABI Publishing. p:109-121.
- Binns MM, Holmes NG, Holliman A & Scott AM (1995) The identification of polymorphic microsatellite loci in the horse and their use in thoroughbred parentage testing. *British Veterinary Journal* 151:9-16.

- Botstein D, White R, Skolnick M & Davis R (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32:314-331.
- Bowling A, Eggleston-Scott M, Byrns G, Clark R, Dileanis S & Wictum E (1997) Validation of microsatellite markers for routine horse parentage testing. *Animal Genetics* 28:247-252.
- Bowling A & Ruvinsky A (2000) Genetics aspects of domestication, breeds and their origins. In: Bowling A & Ruvinsky A (eds.) *The genetics of the horse*. Califórnia. CABI Publishing. p:25-51.
- Braga R (2000) *Cavalo Lavradeiro em Roraima. Aspectos Históricos, Ecológicos e de Conservação*. Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, Brasília, 119pp.
- Caetano A & Bowling A (1998) Characterization of a microsatellite in the promoter region of the IGF1 gene in domestic horses and other equids. *Genome* 41:70-73.
- Cañon J, Checa M, Carleos C, Vega-Pla J, Vallejo M & Dunner S (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 31:39-48.
- Comings D (1998) Polygenic inheritance and micro/minisatellites. *Molecular Psychiatry* 3:21-31.
- Cothran E, Santos S, Mazza M, Lear T & Sereno R (1998) Genetics of the Pantaneiro Horse of the Pantanal region of Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 21:343-349.
- Curik I, Zechner P, Sölkner J, Achmann R, Bodo I, Dovic P, Kavar T, Marti E & Brem G (2003) Inbreeding, Microsatellite Heterozygosity, and Morphological Traits in Lipizzan Horses. *Journal of Heredity* 94:125-132.
- Dawson R, Gibbs H, Hobson K & Yezerinac S (1997) Isolation of microsatellite DNA markers from a passerine bird, *Dendroica petechia* (the yellow warbler), and their use in population studies. *Heredity* 79:506-514.

- Dias I, Bergmann J, Rezende A & Castro G (2000) Formation and population structure of the Brasileiro de hipismo horse breed. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences* 52:647-654.
- Dunner S, Checa M, Gutierrez J, Martin J & Cañon J (1998) Genetic Analysis and management in small populations: the Asturcon pony as an example. *Genetic Selection Evolution* 30:397-405.
- Ellegren H, Johansson M, Sandberg K & Andersson L (1992) Cloning of highly polymorphic microsatellites in the horse. *Animal Genetics* 23:133-142.
- Fuck B, Mariante A, Albuquerque M, McManus C & Egito A (2000) Characterization of the Pantaneiro Horse: A Contribution for the Conservation of the Breed. In: V Conferência Mundial sobre Conservação de Recursos Genéticos de Animais Domésticos (RBI). Brasília. Anais.
- Galov A, Byrne K, Duras-Gomereie M, Gomereie T, Nushof Z, Vincek D, Kocijan I, Tadié Z, Benković V, Basié I & Funk S (2005) Effectiveness of nine polymorphic microsatellite markers in parentage testing in Posavina, Croatian Coldblood and Lipizzaner horse breeds in Croatia. *Livestock Production Science* 93:277-282.
- Gerber S, Mariette S, Streiff R, Bodénés C & Kremer A (2000) Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9:1037-1048.
- Giacomoni E (2002) Variabilidade Genética em Duas Raças de Equinos (*Equus caballus* - Equidae) Crioulo e Pantaneiro - Através do Marcador de DNA Microsatélite. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFRGS. 65pp.
- Groves C & Ryder O (2000) Systematics and Phylogeny of the horse. In: BOWLING A & RUVINSKY A (eds.) *The Genetics of the horse*. CABI Publishing, California, p:01-24.
- Guérin G, Bailey E, Bernoco D, Anderson I, Antczak DF, Bell K, Binns MM, Bowling AT, Brandon R, Cholewinski G, Cothran EG, Ellegren H, Förster M, Godard S, Horin P, Ketchum M, Lindgren G, McPartlan H, Mériaux J-C, Mickelson JR, Millon LV, Murray J, Neau A, Røed K, Sandberg K, Shiue Y-L, Skow LC et al. (1999) Report of the International Equine Gene Mapping Workshop: male linkage map. *Animal Genetics* 30:341-354.

- Hermesen J (1997) Enciclopédia dos Cavalos. Livros e Livros, Lisboa, 312pp.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder O & Wilson A (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312:282-284.
- Horín P & Matiasovic J (2000) Two polymorphic markers for the horse SLC11A1 (NRAMP1) gene. *Animal Genetics* 31:152.
- Jeffreys A & Pena S (1993) Brief introduction to human DNA fingerprinting. In: Pena, S, Chakraborty R, Epplen J & Jeffreys A (eds.) DNA fingerprinting: state of the science. p:01-20.
- Jones W (1987) Genética e Criação de Cavalos. Editora Roca LTDA, São Paulo, 666p.
- Jordana J, Folch P & Aranguren-Méndez JA (2001) Microsatellite analysis of genetic diversity in the Catalanian donkey breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 118:57-63.
- Jordana J, Folch P & Sanchez A (1999) Genetic variation (protein markers and microsatellites) in endangered Catalanian donkeys. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:791-798.
- Juras R & Cothran E (2004) Microsatellites in Lithuanian native horse breeds: usefulness for parentage testing. *Biologija* 4:6-9
- Kelly L, Postiglioni A, Andrés D, Veja-Plá J, Gagliardi R, Biagetti R & Franco J (2002) Genetic characterization of the Uruguayan Creole horse and analysis of relationships among horse breeds. *Research in Veterinary Science* 72:69-73.
- Kichler K, Holder, M, Davis S, Márquez-M R & Owens D (1999) Detection of multiple paternity in the Kemp's ridley sea turtle with limited sampling. *Molecular Ecology* 8:819-830.
- Krüger K, Gaillard C, Stranzinger G & Rieder S (2005) Phylogenetic analysis and species allocation of individual equids using microsatellite data. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122:78-86.

- Lee S & Cho G-J (2006) Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *Journal of Veterinary Science*. 7:63-67.
- Lindgren G (2000) Ten equine dinucleotide microsatellite repeats HTG18-19, HTG22-24, HTG26-27, HTG29-30 and HTG32. *Animal Genetics* 31:145.
- Lippi AS & Mortari N (2003) Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Marngalarga (*Equus caballus*). *Genetics and Molecular Biology* 26 431-434.
- Marklund S (1997) Applied molecular genetics in domestic animals with particular focus on the horse. Tese de doutorado. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 58pp.
- Marklund S, Ellegren H, Erikson S, Sandberg K & Anderson L (1994) Parentage testing and linkage analysis in the horse using a set of highly polymorphic microsatellites. *Animal Genetics* 25:19-23.
- Marklund S, Sandberg K & Anderson L (1996) Forensic tracing of horse identities using samples and DNA markers. *Animal Biotechnology* 7:145-153.
- Mariante A & Cavalcante N (2006) Animais do Descobrimento – raças domésticas da história do Brasil. 2ª ed. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 274p.
- Mashima S, Tozaki T, Swinburne J, Kakoi H, Binns M & Miura N (2001) Characterization of equine microsatellite loci, TKY102-TKY112. *Animal Genetics* 32:117-119.
- Mattapallil M & Ali S (1999) Alalysis of conserved microsatellite sequences suggests closer relationship between Water Buffalo *Bubalus bubalis* and Sheep *Ovis aries*. *DNA and Cell Biology* 18:513-519.
- Milenkovic D, Mariat D, Swinburne J, Chadi-Taorit S, Binns M & Guérin G (2005) Characterization and localization of 17 microsatellites derived from BACs in the horse. *Animal Genetics* 36:164-166.
- Miserani M, Mcmanus C, Santos S, Mariante A, Silva J & Abreu U (2000) Variance analyses for biometric measures of the pantaneiro horse. In: V Conferência Mundial

sobre Conservação de Recursos Genéticos de Animais Domésticos (RBI). Brasília. Anais.

Miserani, M., McManus, C., Santos, S., Silva, J., Mariante, A., Abreu, U (2002) Evaluation of the factors which influence linear measurements of the Pantaneiro Horse. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 335-341.

Morais J, Oom M, Malta-Vacas J & Luís C (2005) Genetic structure of an endangered Portuguese semiferale Pony Breed, the Garrano. *Biochemical Genetics* 43:347-364.

Morey D (1995) The Early Evolution of the Domestic Dog. In: SLATKIN M (ed.) *Exploring Evolutionary Biology*. p:140-151.

Nesje M, Roed K, Lifjeld J, Lindberg P & Steens O (2000) Genetic relationships in the peregrine falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 9:53-60.

Nowak R (1999) *Walker's Mammals of the World*. Johns Hopkins University Press, Maryland, 2015pp.

Pons D (1993) *O Cavalo Crioulo*. Editora Agropecuária, Guaíba, 141pp.

Roberts M, Murtaugh J, Valberg S, Mickelson J & Alexander L (2000) Twenty-one new equine dinucleotide repeat microsatellites. *Animal Genetics* 31:141.

Romaszkan G & Junqueira J (1992) *O Cavalo*. Editora Itatiaia LTDA, Belo Horizonte, 281pp.

Santos S, Mariante A, Abreu U & McManus C (2000) Conservation and management of the Pantaneiro Horse in the Pantanal. In: V Conferência Mundial sobre Conservação de Recursos Genéticos de Animais Domésticos (RBI). Brasília. Anais.

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

Schubertowski D, Venta P, Douglass C, Zhou R & Ewerts S (2001) Polymorphism identification within 50 equine gene-specific sequence tagged sites. *Animal Genetics* 32:78-88.

Silver C (2000) Tudo sobre cavalos. Editora Martins Fontes, São Paulo, 231pp.

Swinburne J, Marti E, Breen M & Binns M (1997) Characterization of twelve new horse microsatellite loci: AHT12-AHT23. *Animal Genetics* 28:453.

Swinburne J, Turner A, Alexander L, Mickelson J & Binns M (2003) Characterization and linkage map assignments for 61 new horse microsatellites loci (AHT49-109). *Animal Genetics* 34:65-68.

Tautz, D. (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: PENA, S., CHAKRABORTY, R., EPPLEN, J., JEFFREYS, A. DNA fingerprinting: state of the science. p:21-29.

Torres A & Jardim W (1992) Criação do Cavalo e de outros Eqüinos. Editora Nobel, São Paulo, 654pp.

Tozaki T, Kakoi H, Mashima S, Hirota K, Hasegawa T, Ishida N, Miura N & Tomita M (2000) The isolation and characterization of 18 equine microsatellite loci, TKY272-TKY289. *Animal Genetics* 31:149.

Tozaki T, Mashima S, Hirota K, Miura N, Choi-Miura N & Tomita M (2001) Characterization of equine microsatellites and microsatellite-linked repetitive elements (eMLREs) by efficient cloning and genotyping methods. *DNA Research* 8:33-45.

Tozaki T, Takezaki N, Hasegawa T, Ishida H, Kurosawwa M, Tomita M, Saitou N & Mukoyama H. 2003 Microsatellite variation in Japanese and Asian Horses and their phylogenetic relationship using a european horse outgroup. *Journal of Heredity* 94:374-380.

Wagner H-J & Reissmann M (2000) New polymorphism detected in the horse MC1R gene. *Animal Genetics* 32:289-290.

Wagner M, Goh G, Wu J, Morrison L, Alexander L, Raudsepp T, Skow L, Chowdhary B & Mickelson J (2004) Sixty-seven new equine microsatellite loci assigned to the equine radiation hybrid map. *Animal Genetics* 35:484-487.

Weir B & Cockerham C (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wytténbach A, Narain Y & Fredga K (1999) Genetic structuring and gene flow in a hybrid zone between two chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus*, Insectivora) revealed by microsatellites. *Heredity* 82:79-88.