

## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

### Diversidade genética de remanescentes do cavalo Nordestino em 2 mesorregiões Norte e Centro-Norte do estado do Piauí através de marcadores microsatélites<sup>1</sup>

Dênea de Araújo Fernandes Pires<sup>2</sup>, Eduardo Geraldo Alves Coelho<sup>3</sup>, Jânio Benevides de Melo<sup>4</sup>, Maria Norma Ribeiro<sup>5</sup>, Denise Aparecida Andrade de Oliveira<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor

<sup>2</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFRPE/Recife. Bolsista CNPq. E-mail: dna@zootecnista.com.br

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG/Belo Horizonte. Pesquisador da FAPEMIG. E-mail: eduardogacoelho@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais – UESB/Itapetinga. Professor Adjunto. E-mail: benevidesster@gmail.com

<sup>5</sup>Departamento de Zootecnia-UFRPE/Recife. Professor Adjunto. Bolsista CNPq E-mail: ribeiromn1@hotmail.com

<sup>6</sup>Departamento de Zootecnia, Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG/Belo Horizonte. Professora Associada 3. E-mail: denise@vet.ufmg.br

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética dos remanescentes do cavalo Nordestino nas mesorregiões Centro-Norte e Norte do estado do Piauí. Foram retirados pêlos com bulbos de 89 animais distribuídos entre 2 mesorregiões do estado (Centro-Norte e Norte). Após a extração do DNA procedeu-se a amplificação com 14 marcadores microsatélites e demais reagentes. O produto da PCR foi submetido à corrida em gel de eletroforese capilar. Foi verificado elevado polimorfismo nos loci estudados e valores de PIC satisfatórios. Com exceção do HMS3, os demais marcadores se encontravam em EHW. O teste para déficit de heterozigotos foi significativo somente para o locus HMS7. A subpopulação de remanescentes que foi avaliada nesse trabalho, biologicamente não está sob ameaça imediata de extinção, mas no cenário social, econômico e político enfrenta sérios riscos a sua continuidade enquanto raça.

**Palavras-chave:** alelo, equilíbrio de Hardy-Weinberg, equinos, índice de fixação

**Abstract:** This paper describes genetic diversity of remnant animals of the Nordestino horse breed from Norte and Centro-Norte ecoregion at Piauí state. Hair roots from 89 horses were collected. After that, genomic DNA was extracted, a PCR was performed with 14 microsatellites and others reagents. The PCR products were submitted a capillary electrophoretic run. High polymorphism and satisfactory PIC values per each locus were observed. A significant deviation from Hardy-Weinberg was observed just HMS3 marker. There was a deficit in heterozygote only in the HMS7 marker. Genetic diversity of the subpopulations analyzed had led the conclusion they are not undergone an extinction immediately.

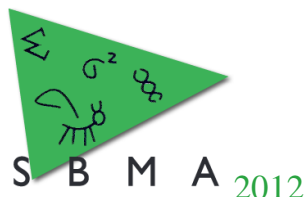
**Keywords:** allele, fixation index, Hardy-Weinberg equilibrium, horses

#### Introdução

O Brasil possui rico patrimônio genético animal com uma enorme gama de mamíferos e aves domésticos que se naturalizaram as diferentes condições climáticas do nosso território, originando as diferentes raças. No período em que a Associação Brasileira dos Criadores do cavalo Nordestino esteve ativa, cerca de 25 anos, existia diversos criatórios da raça. No início da década de 90 cessou o registro de animais, o que acarretou no fechamento dos criatórios oficiais e, conseqüente declínio da raça. Muitos dos animais registrados foram abatidos, castrados e outros acasalados indiscriminadamente com outras raças e animais sem padrão racial. Todavia, como era uma raça ainda em formação e seus primeiros exemplares foram selecionados nos estados da Bahia, Pernambuco, Ceará e Piauí, que segundo Costa et al. (1974) eram esses o habitat natural do cavalo Nordestino, muitos desses animais ainda sobrevivem nesses estados, distribuídos ao longo do semiárido Nordestino em condições praticamente de vida livre, com pouco contato com o homem, notadamente nos estados do Piauí e da Bahia. Por essas razões é um recurso genético perfeitamente adaptado as condições de meio do semiárido brasileiro no qual outras raças especializadas de cavalos não conseguiriam sobreviver sem haver perdas em seu desempenho. Portanto, o objetivo foi avaliar a diversidade genética dos remanescentes do cavalo Nordestino nas mesorregiões Centro-Norte e Norte do estado do Piauí.

#### Material e Métodos

Foram coletados pêlos com bulbos de 89 animais encontrados nos municípios de Campo Maior,



Nossa Senhora de Nazaré, pertencentes à mesorregião Centro-Norte, Batalha e Cabeceiras localizados na mesorregião Norte do estado do Piauí. Apesar dos municípios pertencerem a mesorregiões distintas, o relevo e vegetação são bem semelhantes com vegetação de transição entre os biomas Caatinga e Cerrado. Os animais nos quais os pêlos foram coletados apresentavam características fenotípicas semelhantes ao antigo padrão da raça (1987), sendo considerados como remanescentes típicos da raça.

A extração de DNA foi realizada conforme descrito em Coelho et al. (2004). A solução para PCR foi preparada utilizando a enzima Phusion Flash Master Mix (Finnzymes), água ultra pura e mix de *primers*. Foram utilizados 3 painéis *multiplex* na PCR para os marcadores moleculares com temperatura de anelamento a 60°C (AHT4, AHT5, ASB17, ASB23, HMS6, HMS7, HTG4 e VHL20), 56°C (ASB2, HTG10 e HMS3) e de 60°C (LEX33, HTG6 e HTG7). A solução para corrida eletroforética consistiu em 0,3 µL de LIZ™ (padrão de peso molecular), 8,7 µL de Formamida Hi-Di, ambos produtos da Applied Biosystems e 1 µL da mistura dos painéis dos 3 produtos de PCR, por amostra. As amostras foram submetidas à corrida por eletroforese capilar no aparelho ABI3130 da Applied Biosystems e os eletroferogramas foram avaliados pelo programa GeneMapper da Applied Biosystems. As análises laboratoriais foram realizadas no laboratório de genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, em Belo Horizonte – MG. O programa CERVUS v.3.0.3 (Kalinowski et al., 2007) foi utilizado para calcular os valores de PIC (Conteúdo de informação polimórfica). Os valores do número efetivo e total de alelos, as heterozigosidades observadas e esperadas não viesadas e o índice de fixação por marcador microssatélite foram estimados pelo GenAlex v.6.4 (Paekall & Smouse, 2006). O teste para detectar possíveis desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e para déficit de heterozigotos foram realizados no programa GENEPOP v. 4.1.2 (Rousset, 2008).

#### Resultados e Discussão

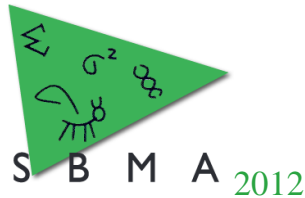
Os resultados da diversidade alélica, do teste para desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg e do PIC para cada marcador microssatélite utilizados nesse trabalho se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 Parâmetros genéticos utilizados para avaliar a diversidade alélica de animais remanescentes da raça equina Nordestina nas mesorregiões Norte e Centro-Norte no estado do Piauí, Brasil.

Locus	N	Na	Ne	Ho	UHe	EHW	F	PIC
AHT4	89	8	4,580	0,820	0,786	NS	-0,049	0,751
AHT5	89	7	4,487	0,798	0,782	NS	-0,027	0,743
ASB17	89	14	5,009	0,775	0,805	NS	0,031	0,784
ASB2	89	9	5,122	0,809	0,809	NS	-0,005	0,779
ASB23	89	9	5,220	0,798	0,813	NS	0,013	0,784
HMS3	89	7	5,024	0,775	0,805	*	0,032	0,772
HMS6	89	6	3,389	0,764	0,709	NS	-0,084	0,674
HMS7	89	6	3,431	0,640	0,713	NS	0,096	0,666
HTG10	89	9	7,120	0,854	0,864	NS	0,007	0,844
HTG4	89	6	3,366	0,685	0,707	NS	0,025	0,657
HTG6	89	6	2,115	0,517	0,530	NS	0,020	0,486
HTG7	89	4	2,192	0,584	0,547	NS	-0,074	0,505
LEX33	89	8	5,074	0,798	0,807	NS	0,006	0,776
VHL20	89	9	5,996	0,809	0,838	NS	0,029	0,813

N=tamanho da amostra; Na=número total de alelos; Ne=número efetivo de alelos; Ho= Heterozigosidade observada; UHe=Heterozigosidade esperada não viesada; EHW=Equilíbrio de Hardy-Weinberg; NS=Não Significativo; \* =  $P < (0,05)$ ; F=Índice de Fixação; PIC=Conteúdo de Informação Polimórfica.

Todos os marcadores utilizados nesse trabalho foram polimórficos com número de alelos (Na) igual ou superior a 4 conforme recomenda Baker (1994). Com exceção do marcador HTG6 para os valores de PIC, os demais foram altamente informativos de acordo com Botstein et al. (1980). Logo, esses marcadores se mostraram eficazes na caracterização genética do remanescente da raça equina



## IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Nordestina para os locais estudados. Observação semelhante foi verificada por Pires et al. (2011) com os mesmos marcadores para remanescentes da mesma raça no município de Agrestina no estado de Pernambuco.

A heterozigidade esperada não viesada foi elevada, provavelmente seja reflexo dos cruzamentos indiscriminados, pois raças estabelecidas tendem a ter valores de  $U_{He}$  mais baixos que o observado nesse trabalho porque geneticamente são grupo mais bem definidos. O marcador HMS3 apresentou desvio significativo ( $P < 0,05$ ) para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Achmann et al. (2001) observaram uma mutação de ponto no HMS3 em cavalos Lipizaner que prejudica a obtenção de um sinal evidente na amplificação de alguns alelos, sendo talvez essa provável explicação para o desvio no EHW. O valor de  $F$  para esse marcador foi próximo de zero o que sugere que esteja ocorrendo acasalamentos ao acaso, bem como não foi identificado déficit de heterozigotos. Os demais valores de  $F$  para os outros marcadores foram também próximos de zero. O teste de déficit de heterozigoto foi significativo ( $P = 0,047$ ) para o marcador HMS7, talvez seja devido ao leve excesso de homozigotos causado por acasalamento de indivíduos mais aparentados. Todavia, esse fenômeno não foi tão evidente uma vez que não se observou desvio no EHW para esse mesmo marcador, pois sabe-se que forças evolutivas e endogamia podem causar desvios. Por outro lado, Hedrick (2005) alerta que fatores evolutivos e acasalamentos preferenciais podem estar presentes em uma população e não causarem desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### Conclusões

Os animais remanescentes da raça equina Nordestina das mesorregiões avaliadas apresentaram elevada diversidade genética e, de modo geral, com predominância de acasalamento ao acaso sem evidências de ameaças imediatas a diversidade genética do remanescente.

### Literatura citada

- ACHMANN, R.; HUBER, T.; WALLNER, B. et al. Base substitutions in the sequences flanking microsatellite markers HMS3 and ASB2 interfere with parentage testing in the Lipizzan horse. **Animal Genetics**, v.32, p.52, 2001.
- BARKER, J. S. F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5, 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph: International Committee for World Congresses on Genetics Applied to Livestock Production, 1994. p.501-508.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p.314-331, 1980.
- COELHO, E.G.A.; OLIVEIRA, D.A.A.; TEIXEIRA, C.S. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. Comunicação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, p.111-115, 2004.
- COSTA, N.; VAL, L.J.; LEITE, G.U. **Estudo da Preservação do Cavalo Nordestino**. Departamento de Produção Animal, 1974. p.38. Recife.
- HEDRICK, P.W. **Measures of Genetic Variation**. In: Genetics of Populations. 3 ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, 2005. p.90-97.
- KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v.16, p.1099-1006, 2007.
- PAEKALL, R.; SMOUSE, P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.288-295, 2006.
- PIRES, D.A.F.P.; COELHO, E.G.A.; MELO, J.B. et al. Avaliação de marcadores Microsatélites utilizados em rotina de teste de parentesco para cavalos remanescentes da raça equina Nordestina oriundos do município de Agrestina, Pernambuco. In: SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DE PERNAMBUCANO, 4, 2011, Garanhuns. **Anais...** Garanhuns: Unidade Acadêmica de Garanhuns / UFRPE, 2011. p.1-4.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Computer Notes. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.103-106, 2008.