

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

ESTRUTURA GENÉTICA FINA DAS RAÇAS BRASILEIRAS DE CAVALOS

MARCELO BCHARA NOGUEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
Maio de 2021**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

ALUNO: MARCELO BCHARA NOGUEIRA

ORIENTADORA: CONCEPTA MCMANUS PIMENTEL, PhD

CO-ORIENTADORA: DANIELLE ASSIS DE FARIA, PhD

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 240/21

**BRASÍLIA/DF
Maio de 2021**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

BCHARA, M. N. Estrutura genética fina das raças brasileiras de cavalos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 127 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

BCHARA, M. N. Estrutura genética fina das raças brasileiras de cavalos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2021.

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

ESTRUTURA GENÉTICA FINA DAS RAÇAS BRASILEIRAS DE CAVALOS

MARCELO BCHARA NOGUEIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADO POR:

CONCEPTA MCMANUS PIMENTEL, PhD (ORIENTADORA)

RENATO CAPARROZ, PhD (EXAMINADOR)

LAILA TALARICO DIAS, PhD (EXAMINADOR)

BRASÍLIA/DF, 24 de Maio de 2021

Á minha família, meu namorado, meus amigos e todos que acreditaram que eu era capaz

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora e pesquisadora, PhD. Concepta McManus Pimentel pela oportunidade de realizar esse trabalho, pela paciência, pelos valiosos ensinamentos e disponibilidade. Muito obrigado por tudo, o que aprendi ao longo dessa experiência com certeza será levado para a vida toda, e tudo começou graças a você!

À minha coorientadora e pesquisadora, PhD. Danielle Assis de Faria Paiva, responsável pelo meu treinamento antes e durante a execução desse trabalho. Agradeço a paciência, confiança e a oportunidade ao longo dos anos em que trabalhamos juntos, os conhecimentos teóricos e práticos que adquiri ao longo desse período tornaram tudo isso possível!

Ao meu ex-chefe e pesquisador, PhD. Samuel Rezende Paiva por todas as oportunidades dadas, ensinamentos, confiança e experiências durante o período em que trabalhamos juntos. Seu apoio foi parte fundamental para meu crescimento profissional e para que tudo isso acontecesse. Muito obrigado!

Agradecimentos à Universidade de Brasília, em especial, à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e ao Instituto de Biologia, por todo o suporte ao longo da minha formação acadêmica.

Sou grato à Capes, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro durante o período de elaboração desse trabalho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, onde realizei estágios, treinamentos e atividades que me capacitaram como biólogo. Agradeço, ainda, a

disponibilização de espaço e tecnologias para a execução das análises e permissão para o uso de amostras do Banco Genético de Germoplasma Animal.

Aos meus pais, Soraya Regina Bchara Nogueira e Roberto de Azevedo Nogueira. Obrigado por me apoiarem em todas as decisões, sempre com muito carinho e paciência. Por me criarem de forma que permitisse com que eu me tornasse a pessoa que sou hoje em dia. Pelas oportunidades que vocês me deram ao longo de tantos anos, que me permitiram chegar até aqui, e com certeza continuarão permitindo que eu vá cada vez mais longe. Muito obrigado por tudo que vocês fizeram e fazem por mim, sou eternamente grato!

À minha irmã, Caroline Bchara Nogueira. Obrigado por sempre estar lá para me apoiar, tanto nos momentos bons quanto nos difíceis, e por sempre manter uma atitude positiva e contagiante. Sua perseverança e força de vontade são inspiradoras, e com certeza me impulsionaram para que eu conseguisse concluir esse trabalho. Melhor irmã do mundo!

Ao meu namorado, Lucas Küster. Não sei nem por onde começar a agradecer todo o apoio e motivação que você me deu nesse período. Você acreditou em mim quando eu estive com dificuldades e sempre me incentivou a continuar caminhando. Além de todo o incentivo, você também esteve lá quando precisei para me ajudar a segurar as emoções e não desistir. Nada disso teria sido possível sem você, te amo, meu amor!

Aos meus amigos, Vinicius, Maria e Luisa. Vocês me acompanham há muito tempo e sempre estiveram lá quando mais precisei, e não foi diferente durante a elaboração desse trabalho. Muito obrigado por todo o apoio e incentivo, e por sempre acreditarem que eu era capaz. Vocês são demais!

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvi
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Problemática e Relevância.....	2
1.2 Objetivos.....	7
1.2.1 Objetivo Geral	7
1.2.2 Objetivos Específicos	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 Equinos no Brasil e no Mundo	8
2.2 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)	10
2.3 Estudos de Estrutura Genética e Populacional	13
2.4 Raças Equinas Naturalizadas no Brasil	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 2 DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE RAÇAS EQUINAS LOCALMENTE ADAPTADAS BRASILEIRAS POR MEIO DE FERRAMENTAS GENÔMICAS	43
RESUMO	44
ABSTRACT	46
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 Amostras	51
2.1.1 Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA)	51
2.1.2 Banco de Dados Público (Petersen <i>et al.</i> , 2013b).....	52 51
2.2 Extração e quantificação de DNA	56 55
2.3 Genotipagem.....	57 56
2.4 Análise de Diversidade Genética	59 58
2.5 Análise de Estrutura Genética de Populações.....	60 59
3. RESULTADOS	61 60
3.1 Genotipagem por SNPs e Amostragem	61 60
3.2 Diversidade e Estrutura Genética de Populações.....	61

3.2.1 Parâmetros Básicos de Diversidade.....	61
3.2.2 Distância Genética (Matriz de F_{ST} par a par).....	63 62
3.2.3 Análise de Componentes Principais (PCA).....	64
3.2.4 Análise de Distância Genética de Nei	68 67
3.2.5 Análise de Estrutura Genética de Populações (ADMIXTURE).....	70 69
3.2.6 Análise de Variância Molecular (AMOVA)	74 73
4. DISCUSSÃO	77 76
4.1 Raças Brasileiras – Variabilidade Genética Intra-racial	77 76
4.2 Raças Brasileiras – Variabilidade Genética Inter-racial	80 79
4.3. Raças Brasileiras – Origem e Relação com Raças Exóticas.....	85
4. CONCLUSÕES	89
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PANTANEIRA	100
RESUMO	101
ABSTRACT	102
1. INTRODUÇÃO.....	103
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	107
2.1 Amostras	107
2.2 Extração e Quantificação de DNA.....	109
2.3 Genotipagem.....	110
2.4 Análise de Diversidade Genética	111
2.5 Análise de Estrutura Genética de Populações.....	111
2.6 Análise de Correlação entre Distâncias Genética e Geográfica (Teste de Mantel)	112
3. RESULTADOS	113
3.1 Genotipagem por SNPs e Amostragem	113
3.2 Diversidade e Estrutura Genética de Populações.....	113
3.2.1 Parâmetros Básicos de Diversidade.....	113
3.2.2 Distância Genética (Matriz de F_{ST} par a par).....	114
3.2.3 Análise de Componentes Principais (PCA).....	115
3.2.4 Análise de Estrutura Genética de Populações (ADMIXTURE).....	116
4. DISCUSSÃO	118
4.1 Variabilidade Genética Intrapopulacional	118
4.2 Variabilidade Genética Interpopulacional	119
4.3 Estrutura Genética de Populações (ADMIXTURE).....	119
5. CONCLUSÕES	122

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 123
ANEXOS 126

ESTRUTURA GENÉTICA FINA DAS RAÇAS BRASILEIRAS DE CAVALO

Mestrando: Marcelo Bchara Nogueira

Orientadora: Concepta McManus Pimentel, PhD

RESUMO

O Brasil conta com diversas raças de animais domésticos de variadas espécies, dentre elas, os cavalos (*Equus caballus*). Utilizando marcadores SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único), é possível gerar uma grande quantidade de informações genótípicas em pouco tempo e com alta taxa de repetibilidade e confiabilidade. Amostras de sangue de 285 cavalos de 8 raças naturalizadas (Baixadeira, Lavradeira, Marajoara, Puruca, Campeira, Crioula, Mangalarga Marchador e Pantaneira) e 2 exóticas coletadas no Brasil (Árabe e Puro Sangue Inglês) foram analisadas, visando a identificação da existência e caracterização da estrutura e composição genética dentro e entre raças localmente adaptadas de equinos e seus possíveis fundadores. A estes animais, foram agregados dados genóticos de 165 amostras de 7 raças exóticas, com o objetivo de correlacionar e comparar com as raças naturalizadas brasileiras. Com base nos dados genóticos do *GGP Equine SNP70 BeadChip* (Geneseek-Neogen, 65.157 SNPs), estimamos os parâmetros básicos de diversidade, distância genética (F_{ST} e Nei), análise de componentes principais (PCA), análise de variância molecular (AMOVA) e análise de estrutura populacional (ADMIXTURE). Dentre as raças de equinos naturalizadas brasileiras, o Pantaneiro chama a atenção, devido a suas características adaptativas. O Pantaneiro foi utilizado como modelo estudo de caso de raça naturalizada brasileira para avaliar a caracterização, estrutura e diversidade genética, assim como sua distribuição. Amostras de sangue de 116 cavalos Pantaneiros foram divididas em populações com base em seus locais de coleta e analisadas objetivando a identificação de existência e caracterização da estrutura genética dentro e entre si. Foi feita a comparação entre as populações para melhor elucidar questões de variabilidade genética e diferenciação, assim como avaliar o impacto das barreiras geográficas do Pantanal no fluxo gênico entre as populações. Foi realizado o Teste de Mantel, visando investigar a correlação entre a distância genética e geográfica das populações. O painel de marcadores utilizado no presente estudo se mostrou eficiente na elucidação da caracterização e estrutura genética dentro e entre as raças naturalizadas brasileiras analisadas e seus possíveis fundadores. Não foi observada correlação entre distância geográfica e genética nas análises envolvendo os Pantaneiros, indicando que as barreiras apresentadas pelo ecossistema do Pantanal não impedem o fluxo gênico entre as

populações. Além disso, os resultados encontrados podem, potencialmente, ser utilizados na otimização de programas de conservação dessas raças, além de ajudar a traçar uma estratégia de implementação das mesmas em programas de melhoramento de raças comerciais de equinos mundialmente difundidas.

Palavras-chave: Recursos genéticos animais; Genética de conservação; *Equus caballus*; Animais de produção; Marcadores moleculares; Raças naturalizadas; SNPs

ABSTRACT

A diverse number of livestock animal breeds from different species can be found in Brazil, including horses (*Equus caballus*) among them. With the use of SNPs markers (Single Nucleotide Polymorphism), it is possible to generate a great amount of genotypic information in a short period of time and with a high rate of repeatability and reliability. Blood samples from 285 horses belonging to 8 naturalized breeds (Baixadeiro, Lavradeiro, Marajoara, Puruca, Campeiro, Crioulo, Mangalarga Marchador and Pantaneiro) and 2 exotic breeds sampled in Brazil (Arabian and English Thoroughbred) were analyzed, aiming to identify the existence and characterize the genetic structure and composition within and between locally adapted horse breeds and their possible founders. Genotypic data from 165 animals belonging to 7 exotic breeds were used aiming to compare and correlate to Brazilian naturalized horse breeds. Data from the *GGP Equine BeadChip* (*Geneseek-Neogen*, 65.157 SNPs) was used to assess basic diversity parameters, genetic distance (F_{ST} and Nei), Principal Component Analysis (PCA), Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and population structure (ADMIXTURE) for the sampled animals. Among the Brazilian equine naturalized breeds, the Pantaneiro stands out due to its adaptative traits. For that reason, the Pantaneiro breed was used as a study model of Brazilian naturalized breed to assess genetic characterization, structure and diversity, as well as distribution. Blood samples from 116 Pantaneiro horses were divided into populations based on their sampling location and analyzed aiming to identify the existence and characterize the genetic structure within and between them. The populations were compared to better understand the genetic variability and differentiation, as well as to assess the impact of Pantanal's geographic barriers on gene flow between populations. Mantel test was performed aiming to investigate the correlation between genetic and geographic distances between the populations. The marker panel used in this study was efficient in helping elucidate the genetic characterization and structure of the analyzed locally adapted horse breeds in Brazil, as well as their possible founders. No correlation between genetic and geographic distances was observed, indicating that the environment's barriers do not hinder the gene flow between the suggested populations. Low genetic distance and similar heterozygosity values were observed, suggesting strong genetic proximity and low differentiation between the suggested populations. The results obtained in this study can, potentially, be used in the optimization of conservation programs for these naturalized Brazilian breeds, as well as in helping to strategize their implementation in breeding programs for other commercial and worldwide spread horse breeds.

Key words: Animal genetic resources; Conservation genetics; *Equus caballus*; Livestock; Molecular markers; Naturalized breeds; SNPs

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

Figura 1. Raças naturalizadas brasileiras de cavalos.....17

CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE RAÇAS EQUINAS LOCALMENTE ADAPTADAS BRASILEIRAS POR MEIO DE FERRAMENTAS GENÔMICAS

Figura 1. Estrutura de populações de raças de equinos brasileiras naturalizadas revelada por Análise de Componentes Principais (PCA).....65

Figura 2. Estrutura de populações envolvendo raças de equinos brasileiras naturalizadas e raças exóticas mundiais revelada por Análise de Componentes Principais (PCA).....66

Figura 3. Dendrograma de 17 raças de equinos a partir da distância genética de Nei (Nei, 1972) e frequências alélicas dentro de cada população67

Figura 4. A) Estrutura populacional envolvendo 8 raças de equinos naturalizadas brasileiras. **B)** Gráfico do teste de validação cruzada71

Figura 5. A) Estrutura populacional envolvendo 17 raças de equinos **B)** Gráfico do teste de validação cruzada72

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PANTANEIRA

Figura 1. Localização geográfica dos locais de coleta das populações de Pantaneiro 108

Figura 2. Estrutura populacional envolvendo 6 populações de equinos da raça Pantaneira relevada por Análise de Componentes Principais (PCA).....115

Figura 3. A) Estrutura populacional envolvendo 6 populações de equinos da raça Pantaneira. **B)** Gráfico do teste de validação cruzada.....116

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE RAÇAS EQUINAS LOCALMENTE ADAPTADAS BRASILEIRAS POR MEIO DE FERRAMENTAS GENÔMICAS

Tabela 1. Raças de equinos utilizadas no estudo. Local de coleta (Banco Brasileiro de Germoplasma Animal – BBGA) e país de origem (banco de dados público – Petersen et al., 2013b), número de amostras por local e <i>beadchip</i> utilizado para genotipagem indicados para cada raça.	52
Tabela 2. Número de SNPs utilizados nas análises para cada grupo.....	57
Tabela 3. Parâmetros genéticos básicos por raça equina genotipada com o <i>GGP Equine 70K</i> neste trabalho, com um total de 61.746 SNPs	61
Tabela 4. Matriz par a par de F_{ST} estimada com 19.656 SNPs em 17 raças de equinos	63
Tabela 5. Matriz de distância genética de Nei (Nei, 1972). Matriz calculada para 17 raças de equinos a partir de 19.656 SNPs.....	68
Tabela 6. Estrutura genética de raças de equinos analisada por Análise de Variância Molecular (AMOVA).....	74

CAPÍTULO 3 - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PANTANEIRA

Tabela 1. Locais de coleta, código dos locais e número de animais Pantaneiros coletados em cada local, totalizando 116 indivíduos	108
Tabela 2. Distância geográfica aproximada (em km) entre os locais de coleta das populações de cavalos Pantaneiro	108
Tabela 3. Parâmetros genéticos básicos das populações de Pantaneiro genotipadas com o <i>GGP Equine 70K</i> , com um total de 61.746 SNPs	114
Tabela 4. Matriz par a par de F_{ST} em 6 populações de equinos da raça Pantaneira utilizando 27.930 SNPs.	115

CAPÍTULO 1
REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUÇÃO

1.1 Problemática e Relevância

A datar da domesticação, os cavalos têm sido amplamente utilizados para atividades rotineiras, como transporte e agropecuária, e, devido a isso, têm sido selecionados por sua performance e características físicas (aparência), resultando numa distribuição global de centenas de raças. Os primeiros equinos foram trazidos ao Brasil em 1534 por colonos e introduzidos em três locais ao longo do litoral brasileiro: Pernambuco, em 1535; São Vicente, em 1543 e Bahia, em 1549 (Chieffi, 1950; Torres & Jardim, 1977). Nessas três regiões originaram-se os primeiros centros de reprodução, locais onde os animais recém-chegados se reproduziram livremente, aumentando em número e eventualmente sendo levados pelo homem para auxiliarem em diversas tarefas, espalhando-se pelo país (Hermsdorff, 1956). Os animais introduzidos na Bahia e Pernambuco disseminaram-se em direção à região Centro-Oeste, e aqueles trazidos para São Vicente (SP) na direção dos estados do Paraná e Santa Catarina (Goulart, 1964). Segundo o estudo realizado por Santos *et al.* (1992), as raças que compunham esses animais inicialmente introduzidos no país eram majoritariamente de origem hispânica, sendo também trazidos animais de origem árabe, berbere, inglesa e turca.

Ao longo de cinco séculos, os equinos passaram por fortes pressões seletivas (clima, manejo e condições sanitárias) nas mais diversas regiões do país, ao ponto de apresentarem características específicas por habitarem esses ambientes únicos por um longo período (Braga, 2000). De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação

e a Agricultura (FAO, 2010), uma raça naturalizada diz respeito a uma raça de espécie exótica que, por se encontrar em um determinado ambiente por um longo período, apresenta características adaptativas provenientes dos ecossistemas e sistemas de produção daquele local. As raças naturalizadas de equinos são de grande importância para as regiões em que ocorrem, auxiliando o homem em vários aspectos, principalmente no transporte em locais mais afastados e na lida com animais, além de estarem inseridas em práticas terapêuticas e esportivas, como a equoterapia.

Recursos genéticos animais para agricultura e alimentação são considerados capitais biológicos primários em se tratando do desenvolvimento agropecuário, sendo, ainda, vitais nas áreas de segurança alimentar e desenvolvimento sustentável em áreas rurais (FAO, 2015). Sendo assim, a conservação desses recursos possui prioridade a nível internacional (Lauvie *et al.*, 2014; Tamminen, 2015). Cerca de 70% de regiões rurais menos favorecidas dependem de animais de produção como componentes essenciais de seus meios de vida, sendo que esses, ainda, contribuem para o ecossistema em que vivem de diversas formas, como auxílio na dispersão de sementes de diversos tipos de plantas e na ciclagem de nutrientes do bioma (FAO, 2015). Ainda segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO), o termo “animal de produção” é definido de forma ampla, considerando e incluindo todas as espécies domesticadas de animais (FAO, 2011). Através da domesticação e seleção reprodutiva visando ressaltar características de interesse para atividades agropecuárias, diversas raças com fenótipos específicos de espécies variadas surgiram. Raças com níveis elevados de diversidade genética permitem com que os sistemas de produção animal consigam operar, com maior eficiência, sob uma ampla gama de condições de estresses ambientais (Tammien, 2015).

O Brasil é o país com o terceiro maior rebanho de equinos no mundo, contando com cerca de 5,7 milhões de animais, perdendo nesse aspecto apenas para os Estados Unidos (10,6 milhões) e México (6,4 milhões) (FAOSTAT, 2018). O setor movimenta aproximadamente R\$ 16,5 bilhões ao ano, tendo crescido ~12% na última década (MAPA, 2016). As raças brasileiras de equinos naturalizadas (ou localmente adaptadas) encontram-se amplamente distribuídas ao longo de todo o território do país, dentre elas: Baixadeira (MA), Campeira (SC), Campolina (MG), Crioula (RS), Lavradeira (RO), Mangalarga (SP e MG), Marajoara (PA – Ilha de Marajó), Nordestina (região Nordeste), Pantaneira (MT - Pantanal) e Puruca (PA). Além das naturalizadas, são encontradas criações de diversas outras raças equinas mundialmente difundidas ao longo do território brasileiro, como por exemplo: Andaluz, Appaloosa, Árabe, *Paint Horse*, Puro Sangue Inglês, Quarto de Milha etc. Os

animais diferem uns dos outros em diversos aspectos de sua composição genética e, conseqüentemente, de suas características morfológicas, sendo possível observar essa diferença em diversos graus, como entre animais de espécies diferentes, entre raças dentro de uma mesma espécie e entre indivíduos dentro de uma mesma raça. Esse conjunto de diferenças é o que hoje se conhece como diversidade genética (Woolliams & Oldenbroek, 2017). A diversidade genética tem papel importante em populações de animais encontradas na natureza, possuindo influência no processo de adaptação de seus indivíduos e, por tabela, da espécie em questão. Essa diversidade, ainda, é de grande relevância para programas de melhoramento, uma vez que é utilizada como forma de selecionar animais que servirão de genitores das próximas gerações em populações que se encontram sobre pressão de seleção artificial (Woolliams & Oldenbroek 2017). O conhecimento dessa diversidade genética de raças naturalizadas é, portanto, imprescindível em se tratando de finalidades como programas de conservação e manejo.

Nos últimos 10 anos da era pós genômica, diversas conquistas foram alcançadas em variadas áreas referentes à genética de equinos, como a melhoria na caracterização de função e estrutura do genoma, a identificação da composição genética de raças e populações, a elucidação da ancestralidade da espécie e a busca contínua por causas moleculares de características e doenças de heranças mendelianas e complexas. A base que possibilita esses tipos de estudo envolve o genoma de referência de alta qualidade disponível para equinos, em conjunto com avanços em tecnologias genômicas e colaborações globais entre pesquisadores de diversas áreas, criadores e proprietários (Raudsepp *et al.*, 2019).

Segundo Hendricks (2007), a diversidade genética contida em populações ancestrais de equinos vem sendo explorada através de cruzamentos selecionados para uma ampla variedade de fenótipos. Apesar disso, o autor sugere que o aparecimento de cerca de 500 raças/populações (devido à seleção artificial e ao estabelecimento de *studbooks* fechados) ocorreu mais recentemente, por volta de 100 a 200 anos atrás. Esse direcionamento nos acasalamentos, em conjunto com a inclusão apenas de indivíduos com traços específicos nos *studbooks*, culminaram em características genômicas que variam entre populações (Petersen *et al.*, 2013a). Com os avanços e disponibilidade de ferramentas e recursos genômicos, tornou-se possível o estudo desses grupos com características distintas de forma mais detalhada em se tratando de composição genética, marcas de seleção e parentesco com outras raças (Raudsepp *et al.*, 2019). Essas ferramentas permitiram, ainda, a elucidação de mais de 130 características hereditárias em equinos (como transtornos musculares, alergias, asma etc.), que podem ser utilizadas como modelos para o estudo de condições semelhantes que

afetam humanos (Wade *et al.*, 2009; OMIA – *Online Mendelian Inheritance in Animals*). Sendo assim, o número de estudos de características genéticas continua a crescer de forma acelerada, variando de diversas raças (McCue *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2013a; Petersen *et al.*, 2013b; Jagannathan *et al.*, 2019) a raças específicas e/ou relacionadas (Petersen *et al.*, 2014; Avila *et al.*, 2018; Marchiori *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2019; Nanaei *et al.*, 2019; Nolte *et al.*, 2019; Sadeghi *et al.*, 2019; Tozaki *et al.*, 2019).

Tecnologias atuais tornaram possível a redução de custos e tempo de geração de dados e processamento de amostras, incentivando ainda mais o uso de ferramentas como os marcadores moleculares. De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), marcadores moleculares são quaisquer fenótipos moleculares provenientes da expressão de um gene ou sequência específica de DNA correspondente a regiões expressas (ou não) do genoma. O uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites ainda é frequente em casos de aplicações forenses e verificação de *pedigrees*. Entretanto, os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e as técnicas de sequenciamento vêm crescendo em uso e popularidade nos dias de hoje, sendo ferramentas moleculares amplamente utilizadas e aceitas mundialmente para avaliação e estudo de diversidade genética de raças e populações, o que facilitou o acesso a informações genômicas (Souza *et al.*, 2008).

A genotipagem dos marcadores SNPs geralmente utiliza metodologias relacionadas a microarranjos, disponíveis, atualmente, em *chips* que contém centenas de milhares de SNPs encontrados ao longo do genoma. Atualmente, são três os *beadchips* comerciais desenvolvidos para equinos, sendo eles: *Equine SNP50 Beadchip* (Illumina, 54.602 SNPs); *GGP Equine SNP70 BeadChip* (Geneseek-Neogen, 65.157 SNPs) e *Equine HD Array* (Affymetrix, 670.796 SNPs). O *Equine SNP50 Beadchip* não se encontra mais disponível atualmente, pois os SNPs nele presentes foram reavaliados e incorporados ao desenvolvimento do *GGP Equine SNP70 BeadChip*.

O conhecimento aprofundado da diversidade genética da espécie equina (e de animais de criação como um todo) é necessário para que seja possível suprir as necessidades produtivas nos mais diversos biomas de um país, auxiliar no direcionamento de programas de melhoramento genético e facilitar a rápida adaptação a objetivos reprodutivos em constante mudança. Em se tratando de manejo de espécies de produção, pontos importantes relacionados à diversidade genética envolvem a distribuição de alelos em locos atrelados a características quantitativas potencialmente úteis entre raças ao redor do mundo (Notter, 1999). A priorização de raças naturalizadas em programas de conservação de acordo com a sua variabilidade genética (possível através de estudos de caracterização dessas raças) pode,

por esse motivo, ser uma estratégia para auxiliar na preservação dessa valiosa diversidade presente dentro da espécie equina.

A produção de equinos é, portanto, de grande importância para a economia do país, e as raças de cavalos naturalizadas brasileiras compõem grande parte desse setor. Com os avanços tecnológicos recentes, possuímos, atualmente, ferramentas moleculares adequadas que, além de fornecerem custos de tempo e financeiro reduzidos, nos permitem a realização de estudos de caracterização genética das raças naturalizadas brasileiras de equinos, fatores que se mostram grande atrativos para a economia e agropecuária nacionais.

Esse trabalho teve como objetivo a identificação de estrutura e caracterização genética dentro e entre raças localmente adaptadas de equinos e seus possíveis fundadores, visando investigar a variabilidade genética nelas contida para melhor entendimento de questões de diferenciação, assim como conhecimento das populações em para potenciais aplicações em programas de melhoramento e conservação dessas raças. Além disso, realizou-se a comparação das raças naturalizadas brasileiras com raças comerciais e outras mundialmente difundidas, com o intuito de melhor elucidar questões referentes à sua origem. Devido à ampla e única distribuição geográfica da raça Pantaneira pelo ecossistema do Pantanal, foi, dedicado um capítulo para análises da estrutura genética dentro da mesma.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Identificação da existência e caracterização da estrutura genética dentro e entre raças localmente adaptadas de equinos e seus possíveis fundadores com base em marcadores moleculares do tipo SNP.

1.2.2 Objetivos Específicos

- 1) Identificação e caracterização de estrutura genética intra e interracial dos grupos genéticos estudados;
- 2) Caracterização genética das raças estudadas, visando investigar a variabilidade genética nelas contida para melhor entendimento de questões de diferenciação, assim como conhecimento das populações para usos potenciais em programas de melhoramento e conservação;
- 3) Comparação das raças naturalizadas brasileiras com raças comerciais e outras mundialmente difundidas com o objetivo de melhor elucidar sua origem.
- 4) Identificação da existência e caracterização da estrutura genética dentro da raça naturalizada Pantaneira;
- 5) Caracterização genética da raça Pantaneira e comparação das populações estudadas para melhor elucidação de questões de variabilidade genética e diferenciação, assim como conhecimento das populações em questão para usos potenciais em programas de melhoramento e conservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Equinos no Brasil e no Mundo

O cavalo doméstico moderno (*Equus ferus caballus*) é uma espécie de estudo de notável importância devido ao seu histórico evolutivo e a proximidade com o ser humano, além de seu relevante papel na agropecuária contemporânea. Pertencem à família *Equidae*, originária da América do Norte há cerca de 55 milhões de anos atrás (MacFadden, 2005). O gênero *Equus*, devido à uma combinação de fatores ambientais e climáticos e, possivelmente, à caça em excesso desses animais pelo ser humano na época, desapareceu dos registros fósseis na América do Norte há cerca de 10 mil anos atrás (Librado *et al.*, 2016). Diferentemente de outras espécies de animais de produção, como ovelhas (Pedrosa *et al.*, 2005) e porcos (Larson *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2007), evidências genéticas e arqueológicas sugerem que múltiplos eventos de domesticação da espécie equina ocorreram na Eurásia (Lippold *et al.*, 2011; Cieslak *et al.*, 2010; Jansen *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2009; Lira *et al.*, 2010; Vila *et al.*, 2001). Na Eurásia, os cavalos se tornaram uma fonte importante de alimento para o homem durante o período Paleolítico Superior, com evidências arqueológicas de que sua caça extensiva quase levou à extinção da espécie durante o período anterior à sua domesticação (Achilli *et al.*, 2012; Librado *et al.*, 2017; Warmuth *et al.*, 2012). Dentes fossilizados (Lippold *et al.*, 2011) e a presença de leite de éguas em cerâmicas apontam que a domesticação do cavalo na região leste da Eurásia se deu há cerca de 6 mil anos atrás, por povos da cultura Boati (Outram *et al.*, 2009). Além disso, há indícios de que, no período referente ao início da expansão que levou o

cavalo doméstico no sentido leste-oeste dos estepes euroasiáticos de baixa diversidade do cromossomo Y e alta diversidade mitocondrial no cavalo moderno e de altos níveis de introgressão com cavalos selvagens da região (Ling *et al.*, 2010; Lippold *et al.*, 2011; Warmuth *et al.*, 2012). O cavalo não é a única espécie de animal de produção com esse histórico, já que se acredita que o mesmo ocorreu durante o processo de domesticação do gado bovino (Beja-Pereira *et al.*, 2006; Gotherstrom *et al.*, 2005).

Com a domesticação do cavalo, foi possível criar uma certa familiaridade com a espécie, o que encorajou e permitiu com que os animais fossem utilizados de forma alternativa ao seu uso anterior, como o transporte de pessoas e carroças, além da sua utilidade em arar campos (Olsen, 2003). Desde sua domesticação, o *Equus ferus caballus* tem sido alvo de seleções naturais e artificiais, efeitos gargalos e miscigenações periódica. De acordo com dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO, 2015), a espécie apresenta 905 raças geneticamente distintas ao redor do mundo. A população mundial de equinos conta com aproximadamente 61,2 milhões de indivíduos, sendo a maior parte encontrada nas Américas, Ásia e países europeus (FAOSTAT, 2018). Os Estados Unidos lideram em primeiro lugar, com o maior número de cabeças (cerca de 10,4 milhões), seguido do México (cerca 6,4 milhões) e, em terceiro lugar, o Brasil (cerca de 5,7 milhões) (FAOSTAT, 2018).

O setor de agronegócio de equinos no Brasil possui grande relevância, movimentando mais de R\$ 16 bilhões por ano e, considerando que uma ocupação direta implica em quatro ocupações indiretas, empregando aproximadamente 600 mil pessoas diretamente e aproximadamente 2,4 milhões indiretamente, totalizando cerca de 3 milhões de cargos gerados pelo mesmo. Apesar da considerável movimentação de capital, os investimentos públicos no setor são mínimos. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), o levantamento do efetivo de equinos no país atinge aproximadamente cinco milhões de animais, sendo que cerca de 3,9 milhões estão associados a manejo de outras espécies de produção e o restante (1,1 milhão) a atividades de esportes e lazer. É importante ressaltar que, mesmo com a implementação de equipamentos e tecnologias de última geração no setor, o papel realizado pelo cavalo continua sendo de vital importância no desenvolvimento das tarefas agropecuárias em grande parte das propriedades de produção no país (MAPA, 2016).

O uso de cavalos no manejo de rebanhos, especialmente de bovinos, vem crescendo e se destacando cada vez mais no setor de agronegócio no Brasil, refletindo em uma movimentação de capital de aproximadamente 53% e gerando cerca 71% dos empregos

diretos existentes no mesmo (FAO, 2016). Essa associação acentuada resultou em um deslocamento dos cavalos, que acompanhou o dos bovinos, em direção às regiões Centro-Oeste e Norte do país. Apesar disso, o estado de Minas Gerais, na região Sudeste, ainda ocupa o primeiro lugar em criação de equinos no Brasil, contando com cerca de 715 mil cabeças e 208 mil estabelecimentos agropecuários contendo equinos (IBGE, 2017). No estado de Minas Gerais, cerca de 49% dos estabelecimentos estão associados à criação de cavalos para a lida com o gado (especialmente bovino), cerca de 17% ao lazer e esporte, cerca de 7% com intuito unicamente para comércio e cerca de 27% apresentaram mais de um objetivo de criação (Vieira, 2011). Somando os custos de manutenção, valor anual da tropa e a renda associada à mão de obra, estima-se que o segmento de lida é responsável por cerca de R\$ 8,5 bilhões do complexo do agronegócio do cavalo no país (FAO, 2016).

Apesar do marcante uso da espécie em questão no manejo de bovinos, setores que dizem respeito a esportes equestres vêm tomando cada vez mais força ao longo dos últimos anos no contexto da equinocultura no Brasil e no mundo. Diversas modalidades competitivas envolvendo cavalos, como corridas, adestramento, salto, concurso de equitação e provas de resistência têm se tornado cada vez mais comuns (Lima *et al.*, 2006), movimentando em torno de R\$ 5,8 bilhões e provendo cerca de 125 mil empregos diretos (FAO, 2016).

Os cavalos apresentam, ainda, um papel importante na equoterapia, forma de auxílio que se torna cada vez mais reconhecida por sua eficácia no tratamento de diversas questões físicas, comportamentais e mentais no ser humano.

O comércio de sêmen de garanhões e embriões promove uma movimentação considerável de capital no setor da equideocultura do Brasil e do mundo. Utilizando como exemplo informações da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Mangalarga Marchador (ABCCMM), o material de um animal de alto valor econômico custa, em média, cerca de R\$ 30.000,00, sendo que, por variar de acordo com as características do indivíduo, já chegou a atingir valores de R\$ 100.000,00.

2.2 Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs)

De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), é considerado como marcador molecular qualquer variação proveniente de um gene expresso (ou fragmento específico de

DNA) que corresponde a regiões gênicas e intergênicas do genoma. Um marcador molecular pode, ainda, ser definido como marcador genético em casos em que é possível se verificar a segregação do mesmo de forma a seguir as leis de Mendel para características monogênicas ou quando suas distribuições se apresentarem de acordo com aquelas previstas para características poligênicas. A nível molecular, existem três tipos de variações de maior relevância na molécula de DNA, sendo elas: as regiões repetitivas (mini e microssatélites), as inserções e deleções (*insertion/deletion polymorphisms* – InDels) e os polimorfismos de uma única base (*Single Nucleotide Polymorphisms* – SNPs). Com o passar do tempo, as sequências nucleotídicas que compõe os genomas foram sendo cada vez mais elucidadas, devido ao avanço de tecnologias que permitiram o sequenciamento de genomas individuais, o que tornou possível encontrar uma alta quantidade de variações de base única pela comparação de segmentos correspondentes do mesmo genoma (Pereira, 2017; Jagannathan *et al.*, 2019).

Essas variações controlam a porção herdável da diversidade fenotípica em animais e humanos, sendo os SNPs as mais abundantes, encontrados de forma homogênea ao longo do genoma (Caetano, 2009; Jagannathan *et al.*, 2019). Sequenciamentos de genomas inteiros de diversas espécies de animais e plantas indicam que, em geral, a domesticação tende a resultar na perda de variabilidade genética e aumento na proporção de variantes deletérias segregando nessas populações (Makino *et al.*, 2018).

Métodos de sequenciamento de nova geração, assim como outros avanços na área de genética molecular, tornaram possível o reconhecimento massivo desses marcadores disseminados ao longo dos cromossomos de indivíduos da mesma espécie, o que, por sua vez, possibilitou o desenvolvimento de painéis de SNPs de alta densidade, hoje disponíveis na forma dos *beadchips* comerciais (Beltrán, 2014). Os *beadchips* comerciais foram desenvolvidos com o objetivo de identificar regiões do genoma que foram modificadas pela seleção (assinaturas de seleção), assim como SNPs e genes relacionados a características de interesse zootécnico em espécies de animais domésticos mais utilizadas atualmente ao redor do mundo (estudos de associação ampla do genoma – GWAS) (*Illumina Inc. Datasheet*, 2011).

Com relação a outras espécies de animais de produção, os primeiros genomas a ficarem disponíveis para algumas delas foram: Btau_4.2, para bovinos (*The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium et al.*, 2009); Sscrofa10.2, para suínos (Groenen *et al.*, 2012); Oar_v3.1, para ovinos (Jiang *et al.*, 2014); ARS1, para caprinos (Bickhart *et al.*, 2017); canFam3.1, para cães (Hoepfner *et al.*, 2014); Gallus_gallus-5.0, para galinhas (Warren *et al.*, 2017).

Foram, então, elaborados painéis de diversas densidades para essas espécies com o decorrer dos anos: *BovineLD v2.0 Beadchip*, 7.931 SNPs (*Illumina Inc. Datasheet*, 2015a); *BovineSNP50 v3 Beadchip*, 53.218 SNPs (*Illumina Inc. Datasheet*, 2020); *BovineHD Beadchip*, 777.000 SNPs (*Illumina Inc. Datasheet*, 2015c); *PorcineSNP60 Beadchip*, 64.232 SNPs (*Illumina Inc. Datasheet*, 2015b); *Affymetrix Axiom Porcine Array*, 658.692 SNPs (*Affymetrix Datasheet*, 2015a); *OvineSNP50 Beadchip*, 54.241 SNPs (*Illumina Inc. Datasheet*, 2015d); *CanineHD Beadchip*, mais de 170.000 SNPs (*Illumina Inc. Datasheet*, 2009); *CanineHD Genotyping Array*, mais de 700.000 SNPs (*Applied Biosystems™ Axiom™ Datasheet*, 2017a); *Affymetrix Axiom Chicken Array*, 580.961 SNPs (*Applied Biosystems™ Axiom™ Datasheet*, 2017b); *GoatSNP50 Beadchip*, aproximadamente 52.000 SNPs (Tosser-Klopp *et al.*, 2014); entre outros.

Com uma ampla variedade de painéis para animais domésticos disponíveis, estudos com o intuito de avaliar a aplicabilidade dos mesmos na genotipagem de espécies próximas e raças naturalizadas, como o uso de *beadchips* de bovinos em raças brasileiras (Campos *et al.*, 2017), búfalos (Michelizzi *et al.*, 2010) e alpacas (More *et al.*, 2019); de ovinos em animais chineses (Ma *et al.*, 2015), escoceses (Johnston *et al.*, 2011) e brasileiros (Toledo, 2014); de suínos em populações do Havaí (Faria *et al.*, 2019) e da Europa (Muñoz *et al.*, 2019); caprinos em animais franceses (Carillier *et al.*, 2013), africanos (Lashmar *et al.*, 2015) e espanhóis (Molina *et al.*, 2017).

Assim como outras espécies importantes de animais domésticos, o cavalo é considerado um modelo viável para pesquisas genéticas de animal de grande porte (Andersson, 2016). Na era de projetos genômicos com mamíferos, o cavalo foi selecionado como representante da ordem *perissodactyla*, sendo que a montagem do primeiro genoma de referência para a espécie (EquCab2.0), desenvolvida pelo Consórcio de Diversidade do Genoma Equino (*Equine Genome Diversity*), foi feita com base em um indivíduo da raça Puro Sangue e ficou disponível em 2009 (Wade *et al.*, 2009). Posteriormente, foram feitas atualizações no EquCab2.0, culminando em sua versão mais recente (EquCab3.0), liberada em 2018 (Raudsepp *et al.*, 2019; Kalbfleisch *et al.*, 2018). Jagannathan *et al.* (2019) identificaram e catalogaram aproximadamente 26 milhões de SNPs em relação ao novo EquCab3.0, encontrando a média de 1 SNP de alta qualidade a cada 105 pb, além de uma relação de variantes heterozigotas para homozigotas de 2,16. Nesse estudo, Jagannathan *et al.* (2019) identificaram, ainda, média de 1.814.866 marcadores SNPs homozigotos e 3.922.449 heterozigotos no genoma de cada um dos 88 animais analisados em relação ao EquCab3.0. Com relação ao número de InDels nesses animais, foram encontradas 1.282.573 inserções

curtas (1 a 396 pb) e 1.591.971 deleções curtas (1 a 317 pb), com média de 395.882 inserções e 426.380 deleções no genoma de cada um dos animais, estimativa de 1,73 deleções curtas heterozigotas em relação às homozigotas e, em média, uma InDel a cada 867 pb. Sendo assim, é esperado que os cavalos, de forma similar a humanos e diversas outras espécies domésticas, apresentem um pequeno número de alelos recessivos altamente deletérios em seu genoma (Das *et al.* 2015; Charlier *et al.* 2016). Um estudo realizado por Raudsepp *et al.* (2019) com o intuito de revisar (e melhor elucidar) esse progresso e avanços conquistados na área após dez anos de disponibilização do genoma de referência para equinos também se encontra disponível.

Com as informações dos genomas de referência, foram elaborados painéis de média densidade (*EquineSNP50 Beadchip*, 54.602 SNPs, mais tarde incorporado no novo *GGP Equine70K Beadchip*, 65.157 SNPs - *Illumina Inc. Datasheet*, 2010) e alta densidade (*Affymetrix Axiom 670k Equine Genotyping Array*, 670.796 SNPs, com base em 24 raças de cavalo - Schaefer *et al.*, 2017; *Affymetrix Datasheet*, 2015b). Como grande parte dos marcadores do *EquineSNP50 Beadchip* foi incorporada ao desenvolvimento do *GGP EquineSNP70K BeadChip*, o primeiro não se encontra mais comercialmente disponível. Os *beadchips* foram bem-sucedidos em estudos de identificação de SNPs, regiões e genes associados a enfermidades e síndromes que afetam algumas raças equinas, tais como a lordose (Cook *et al.*, 2010), nanismo (Eberth *et al.*, 2009), osteocondrose (Teyssèdre *et al.*, 2012), síndrome do potro lavanda (Brooks *et al.*, 2010) e neuropatia laringeal recorrente (Dupuis *et al.*, 2011). Dessa forma, foi possível o desenvolvimento de trabalhos a respeito de características de maior complexidade relacionadas, principalmente, a aptidões físicas e ao desempenho em competições de modalidade esportivas em animais da espécie equina (Pereira *et al.*, 2017; Meira *et al.*, 2014b; Faria, 2016; Hill *et al.*, 2010; Binns *et al.*, 2010; Regatieri *et al.*, 2016; Schröder *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2017; Petersen *et al.*, 2013a).

Diversos estudos utilizando esses *beadchips* de equinos em raças naturalizadas de outros países vêm sendo realizados, como na China (Kader *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018), Alemanha (Kulbrock *et al.*, 2013; Nolte *et al.*, 2019), Finlândia (Kvist *et al.*, 2020), Polônia (Jasielczuk *et al.*, 2020), Áustria/Itália (Druml *et al.*, 2018), Suíça (Hasler *et al.*, 2011) e Japão (Tozaki *et al.*, 2019), além de um resumo em congresso a respeito da diversidade genética em raças naturalizadas brasileiras de equinos (Iannela *et al.*, 2018).

2.3 Estudos de Estrutura Genética e Populacional

A diversidade genética de animais domésticos é necessária para que as necessidades produtivas de um país possam ser supridas em condições ambientais variadas, permitir o melhoramento genético de forma adequada e facilitar a adaptação rápida aos objetivos de criação em constante mudança (Notter, 1999). A compreensão da estrutura genética é essencial para se alcançar o melhoramento através do uso de técnicas como estudos de associação ampla do genoma (GWAS), seleção genômica e avaliação de características quantitativas (Kijas *et al.*, 2009). Estudos a respeito da estrutura genética de populações distintas de diversas espécies de animais domésticos, especialmente de raças nativas, são essenciais na preservação de sua variabilidade genética, estabelecimento de políticas de conservação e contribuição para sua sustentabilidade (Muñoz *et al.*, 2019).

Estudos dessa natureza permitem com que se avalie a composição genética de populações de interesse, tornando possível avaliar questões como susceptibilidade a doenças, características de interesse do ponto de vista zootécnico, origem e parentesco. Tais estudos vem se tornando cada vez mais frequentes, possibilitados por análises paralelas de centenas de milhares de SNPs que se encontram distribuídos ao longo do genoma dos indivíduos (Kijas *et al.*, 2009, com ovinos; Gibbs *et al.*, 2009; McKay *et al.*, 2007, com bovinos; Faria *et al.*, 2019; Muñoz *et al.*, 2019; Mujibi *et al.*, 2018, com suínos; Paim *et al.*, 2019, com caprinos; Petersen *et al.*, 2013b, com equinos). Trabalhos com o objetivo de estimar o grau de diversidade genética (características genéticas na composição dos genes de uma espécie) dentro e entre populações, visando a comparação da composição genética entre os indivíduos de um grupo e entre grupos vêm sendo realizados para diversas espécies de animais de produção (Zenger *et al.*, 2006, com bovinos; Faria *et al.*, 2019, com suínos; Petersen *et al.*, 2013b, com equinos). A avaliação e conhecimento dos níveis de endogamia (acasalamento entre indivíduos aparentados geneticamente próximos, gerando aumento da homozigosidade dentro de uma população e podendo resultar na redução dos traços de aptidão dos mesmos, processo conhecido como depressão endogâmica) tornam imprescindível o papel da diversidade genética dentro de uma população na redução de efeitos negativos da mesma (Pemberton *et al.*, 2017; Pekkala *et al.*, 2014). Existem, ainda, diversos outros tipos de estudos sendo realizados utilizando marcadores SNPs, como avaliação da perda de alelos devido à seleção (Muir *et al.*, 2008, com galináceos) e identificação e localização regiões do genoma que se encontram sob seleção, (Petersen *et al.*, 2013a; Pereira, 2017; Hestand *et al.*, 2015, com equinos; Iso-Touru *et al.*, 2016, com bovinos, Qanbari & Simianer, 2014, com animais de produção).

Como mencionado anteriormente, os SNPs geram uma grande quantidade de informações genóticas em pouco tempo e com alta taxa de repetibilidade e confiabilidade que auxiliam na inferência populacional e elucidação de possíveis locos que foram objetos de pressões seletivas. Para os dados gerados, existem diversas aplicações posteriores, como atribuição de indivíduos a populações, existência de populações distintas entre si, identificação de animais migrantes e mestiços e identificação de marcadores moleculares específicos para determinados grupos (Falush *et al.*, 2003; Falush *et al.*, 2007; Al Abri *et al.*, 2017; Hristov *et al.*, 2014; Barcaccia *et al.*, 2013).

Os dados genômicos gerados a partir de genotipagem de milhares de marcadores SNPs podem ser usados em análises multivariadas, como a análise de componentes principais (PCA), que é eficiente no auxílio de estudos que visam avaliar a variação entre grupos genéticos e seus indivíduos com o (Jombart, 2008; Price *et al.*, 2006). A PCA é capaz de elucidar informações a respeito não somente da variabilidade genética estruturada (variação interpopulacional), como também a variabilidade genética randômica (variação intrapopulacional), ou seja, a variabilidade geral entre indivíduos (Jombart *et al.*, 2010). Para a PCA, é necessário conhecer previamente a estrutura populacional dos indivíduos analisados, não sendo possível extrair essa informação somente a partir dos dados. Essa ferramenta apresenta grande potencial e utilidade na conversão das informações originais dos alelos em componentes principais (PC), representados por cada eixo da projeção gráfica construída a partir dos dados gerados na análise, reduzindo drasticamente a dimensão das variáveis envolvidas.

2.4 Raças Equinas Naturalizadas no Brasil

O Brasil conta com diversas raças de animais domésticos que foram originadas a partir das que acompanharam os colonizadores espanhóis e portugueses na época de sua chegada (Paiva, 2005). Os animais, ao longo desses cinco séculos, estiveram sob pressões constantes de seleção natural em determinados ambientes, chegando ao ponto de apresentarem características adaptativas específicas para essas condições (Mariane *et al.*, 1999). Esses grupos adaptados passaram a ser denominados raças “naturalizadas” (ou “locais”), podendo apresentar vantagens em regimes de produção extensiva em comparação às recém-chegadas em determinadas regiões do país. A conservação e o melhoramento de raças naturalizadas estão associados ao contexto de obtenção de indivíduos para diversos

objetivos, porém, para que isso ocorra, é necessário encontrar o sistema de produção onde o potencial contido nas mesmas seja evidenciado da melhor forma possível, visando atrair a atenção dos criadores e mostrar que a utilização dessas raças pode resultar em um maior retorno financeiro (Paiva, 2005). Isso é necessário pois a justificativa para a conservação dessas raças naturalizadas se encontra diretamente ligada à utilização delas, o que evidencia ainda mais a relevância da associação entre pesquisadores e criadores, a fim de garantir o sucesso dessa conservação. Esse tipo de associação, visando proporcionar a sobrevivência dessas raças, torna possível com que, no futuro, elas possam servir como fonte de materiais genéticos que poderão ser utilizados para melhorar a resistência em raças que se encontram em condições ambientais de criação desfavoráveis (Notter, 1999).

As raças naturalizadas de equinos são de grande importância histórica nas regiões em que ocorrem, estando envolvidas nas mais diversas atividades, como na lida com animais de outras espécies (principalmente na criação de gado), atividades esportivas, transporte, equitação e práticas terapêuticas (equoterapia). A produção de equinos é, portanto, de grande importância para a economia do país, e essas raças naturalizadas brasileiras compõem grande parte desse setor, exercendo papel imprescindível em suas regiões e no Brasil como um todo (MAPA, 2016). Dentre as raças naturalizadas, encontram-se: Baixadeira, Campeira, Crioula, Lavradeira, Mangalarga, Marajoara, Pantaneira e Puruca (Figura 1). Além das naturalizadas, são encontradas criações de diversas outras raças mundialmente difundidas no Brasil, como por exemplo: Andaluz, Appaloosa, Árabe, *Paint Horse*, Puro Sangue Inglês, Quarto de Milha, entre outras.



Figura 1. Raças naturalizadas brasileiras de cavalos. (A) Baixadeira. Fonte: Revista RG News 2 (1) 2016 - Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos; (B) Campeira. Fonte: <http://cavalocampeiro.com/>; (C) Crioula. Fonte: <https://cavalo-crioulo.com/>; (D) Lavradeira. Fonte: <http://vetsmart.com.br>; (E) Mangalarga Marchador. Fonte: <https://abccmm.org.br/>; (F) Marajoara. Fonte: <https://vetsmart.com.br/>; (G) Pantaneira. Fonte: <https://portalsaofrancisco.com.br/>; (H) Puruca. Fonte: <http://portalcavaloonline.com.br/>.

A Baixada Maranhense, formada pelas bacias hidrográficas dos rios Mearim, Pindaré, Grajaú, Pericumã, Turiaçú, Aura e outras menores, rios conhecidos por anualmente transbordarem e inundarem as planícies do local, é a região onde a raça equina naturalizada Baixadeira é proeminente (Amorim Filho *et al.*, 2018). O cavalo Baixadeiro tem grande relevância no trabalho e vida cotidiana dos habitantes da Baixada Maranhense que dependem de atividades agrícolas e pecuárias para sua sobrevivência (Gazolla *et al.*, 2016). De acordo com os criadores, cruzamentos indiscriminados com outras raças de equinos, além de acasalamentos consanguíneos, condições não ideais de manejo sanitário e ausência de manejo reprodutivo, são fatores que ocasionam a diminuição anual da população Baixadeiro, situação que, caso não seja remediada, poderá levar a extinção desses animais a longo prazo (Santos *et al.*, 2013b).

Cavalos da raça Lavradeira possuem esse nome por ocorrerem em paisagens de lavrados (região do Alto do Rio Branco, Roraima), ecossistemas únicos e sem correspondentes em outros locais do Brasil, caracterizado por altos gradientes de altitude e pluviosidade que contribuem na formação de um mosaico de fitofisionomias de áreas abertas (sem florestas) intercaladas por regiões florestais (Campos *et al.*, 2008). A raça teve origem a partir dos equinos introduzidos por colonizadores espanhóis e portugueses, sendo esses ancestrais pertencentes a raças como Árabe, Andaluz e Garrano (Marques, 2001). Dados da Agência de Defesa Agropecuária de Roraima (<http://www.aderr.rr.gov.br/>), em 2016, coloca o

efetivo de equinos, ao longo dos 15 municípios do estado, em aproximadamente de 31.943 animais, sendo que, considerando apenas 8 (Alto Alegre, Amajari, Boa Vista, Bonfim, Cantá, Normandía, Pacaraima e Uiramutã) dos 15 municípios, onde há pastagem nativa e criação extensiva de cavalos, estima-se que existem cerca de 21 mil equinos habitando condições de savana (65,7% do efetivo do estado). Até o momento, não houve êxito no estabelecimento de uma associação de criadores para a raça, sendo necessário para que haja o reconhecimento oficial do Lavradeiro como raça equina localmente adaptada pelo MAPA (Braga, 2019).

De acordo com relatos históricos, os primeiros equinos introduzidos na Ilha de Marajó possuíam origem lusitana. Assim como todas as raças de animais naturalizados, os cavalos introduzidos na Ilha de Marajó desenvolveram, ao longo do tempo, atributos únicos (rusticidade, resiliência e força), como forma de adaptação às pressões seletivas intensas e ao trabalho no campo, culminando na raça Marajoara (Teixeira, 1995). Como não existem registros de entrada de outros equinos no Brasil na época, a hipótese é que a raça Marajoara foi originada da raça Andaluz (Marques, 2008). A raça possui associação de criadores, estabelecida em 1979 (Associação Brasileira dos Criadores de Cavalos da Raça Marajoara – ABCCRM), entretanto, a mesma não possui forte atuação na coordenação do trabalho de registro dos animais no estado do Pará (Figueiró *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2016). Marques *et al.* (2001) e Costa *et al.* (2005) estimaram o efetivo da raça em 150.000 indivíduos, pontuando que a raça tem relevância regional no cotidiano das fazendas e é imprescindível no desenvolvimento da pecuária, principalmente na lida de espécies como bovinos e bubalinos em sistemas extensivos de criação. Isso deve-se à sua resistência e adaptações ao ambiente local (cascos arredondados e modificações em músculos das coxas, garupa e das costas, devido ao trote em terras alagadas típicas da região) (Reis *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2016). Segundo o trabalho de caracterização genética utilizando microssatélites realizado por Costa (2007), os atributos dos animais refletem um processo de descaracterização do cavalo Marajoara, resultando em uma modificação do seu padrão, devido, principalmente, a cruzamentos indiferenciados com outras raças, em especial o Mangalarga Marchador.

A raça Puruca, único mini cavalo brasileiro, é resultado de cruzamentos da raça naturalizada brasileira Marajoara com pôneis da raça *Shetland*, animais introduzidos na Ilha de Marajó da região francesa conhecida como Bois Boulogne (Teixeira, 1985). O Puruca apresenta distinções grandes o suficiente das outras raças, o que levou à formação de uma associação própria (Costa, 2007), denominada Associação Brasileira dos Criadores de Puruca (ABCP, Belém – PA), fundada em 1986. Entretanto, assim como a associação destinada ao Marajoara (ABCCRM), a ABCP não apresenta forte atuação (Marques *et al.*, 2016). Segundo

o mesmo levantamento realizado para a raça Marajoara (Marques *et al.*, 2001), o rebanho de animais Puruca existente no arquipélago é reduzido a menos de mil indivíduos.

A raça Pantaneira se encontra fortemente associada ao Pantanal Matogrossense, ambiente localizado na região Centro-Oeste do Brasil, onde se originou. Esses cavalos apresentam traços adaptativos que permitem com que ocorram nesse bioma, conferindo a eles, por exemplo, a capacidade de suportar marchas por um período prolongado em áreas de alagamento, muito comuns no Pantanal durante o período de chuvas (Serenó, 1997; Mariante & Cavalcante, 2000). Indivíduos pertencentes à essa raça, historicamente, são muito utilizados na região como forma de meio de transporte dos trabalhadores no campo, assim como na lida com rebanho de outras espécies de produção, principalmente bovinos (Beck, 1985; Santos *et al.*, 1995; Sereno, 1997; Mariante & Cavalcante, 2000). Entretanto, devido à sua capacidade física, a raça começou a ser utilizada, ainda, em modalidades esportivas (Ribeiro *et al.*, 2008). Instituições do governo iniciaram estudos a respeito da raça por volta da década de 80, em 1972, quando a Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Pantaneiro (ABCCP) foi criada e, com o auxílio de projetos de conservação de outras instituições, mantém, atualmente, diversos núcleos da raça (Mariante & Cavalcante, 2000; Santos, 2001). Em 1988, foi criado o Núcleo de Conservação do Cavalo Pantaneiro, situado na Estação Experimental Fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal – Corumbá, MS, Brasil) e sendo encarregado da produção de diversos trabalhos a respeito do sistema de criação e a caracterização genética da raça, assim como estudos sobre a sua origem (Santos, 1993; Sereno *et al.*, 2008; McManus *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). De acordo com Santos *et al.* (2016), existem cerca de 5 mil cavalos Pantaneiros puros registrados na ABCCP, com mais de 130 criadores localizados em 21 sub-regiões, porém, o número estimado de equinos na região do Pantanal se encontra em torno de 100 mil, o que indica uma grande quantidade de animais mestiços. Estudos de origem, morfologia e caracterização genética do Pantaneiro empregando diversos tipos de marcadores já foram publicados (Cothran *et al.* (1998), com marcadores bioquímicos; Sereno (2002) e Sereno *et al.* (2008), com marcadores microssatélites).

O Mangalarga Marchador, assim como o Mangalarga Paulista, teve sua origem há mais de 200 anos, partindo de cavalos portugueses da raça Alter. Seus ancestrais foram divididos entre os estados de Minas Gerais e São Paulo e, com diferentes pressões seletivas e demandas ambientais atuando sobre eles, houve, eventualmente, a diferenciação deles em Mangalarga Paulista e Marchador, raças que, apesar de diversos pontos em comum, são, atualmente, distintas geneticamente (Beck, 1985). Lippi & Mortari (2003), utilizando Alelo Específico, confirmaram a proximidade entre o Marchador e Paulista através da presença da

raça Andaluz em ambos, assim como diferenças entre elas, pela presença da raça Berbere, identificada apenas no Mangalarga Marchador. De acordo com Beck (1985), o Mangalarga Marchador pode ser considerado, sob o ponto de vista zootécnico, uma raça brasileira, e apresenta a maior distribuição geográfica em território nacional quando comparada a outras raças equinas naturalizadas. Cavalos dessa raça são reconhecidos e utilizados, principalmente, em função de sua marcha, que difere das apresentadas por outras raças de cavalos marchadores ao redor do mundo. Estudos a respeito do Mangalarga Marchador envolvem, geralmente, o distinto trote dos animais, mas também incluem características reprodutivas e possíveis fatores que podem influenciar na performance durante testes de desempenho (Lage *et al.*, 2017; Rua *et al.*, 2018; Coelho *et al.*, 2019; Di Flippo *et al.*, 2019; Prado Silva *et al.*, 2019). Um estudo recente sobre a particularidade da raça (andar de velocidade intermediária conhecido como “marcha”, dividido em “marcha batida” e “marcha picada”) realizado por Bussiman *et al.* (2019) sugere que as modalidades de marcha se encontram sob controle poligênico, o que corrobora com outros estudos publicados (Patterson *et al.*, 2015; Fonseca *et al.*, 2017). Além disso, Santos (2020a) identificou e associou diversos genes candidatos a assinaturas de seleção para ambas as modalidades de marcha. Santos *et al.* (2020b) avaliaram a endogamia da raça e concluíram que o genoma do Mangalarga Marchador apresenta coeficiente de endogamia moderado, atribuído a gerações mais distantes, e não à endogamia recente. Estudos de diversidade genética com marcadores moleculares (DeAssis *et al.*, 2009), demonstram baixa estruturação geográfica da raça.

A provável origem do cavalo Campeiro está atrelada aos animais trazidos ao Brasil durante a época das expedições espanholas de Álvaro Núñez Cabeza de Vaca, traçando um trajeto por terra a partir do litoral de Santa Catarina (SC) até Assunção, no Paraguai, (Araújo, 1990). Por conta dos extravios que levou os animais a eventualmente se fixarem na região, a existência de cavalos em locais além do planalto catarinense era observada, ocupando também o planalto do Rio Grande do Sul e sudoeste do Paraná, área conhecida como Pinheirais do Brasil, levando o cavalo Campeiro a ser conhecido como Marchador das Araucárias (Souza *et al.*, 2018). De acordo com Mariante & Cavalcante (2000), um exemplo de ação do homem sobre o cavalo Campeiro ocorreu em 1912, quando o belga Dr. Vicent fez a seleção de alguns animais para cruzamento posterior com garanhões das raças Puro Sangue Inglês e Árabe, trazidos da França. No ano de 1976 foi criada a Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo Campeiro (ABRACCC) Seu livro de registro oficial da raça (*studbook*) teve seu credenciamento em 1985 e segundo dados da associação, entre 1985 e 2016 foram registrados cerca de 1.203 animais (Souza *et al.*, 2018). Entre 2010 e 2016, a média anual de

registro de machos em livro aberto e fechado foi de 3 e 4 animais, respectivamente, e 32 e 11 em fêmeas, números alarmantes se comparados a outras raças nacionais, que registram milhares de animais por ano (Souza *et al.*, 2018).

O cavalo Crioulo originou-se das populações de equinos da Península Ibérica (Portugal e Espanha) no século XVI. Em 1492, com a chegada de Colombo na América, diversas expedições, vindas, principalmente, da Espanha, chegaram ao novo continente, trazendo consigo, dentre outros animais, representantes da espécie equina (Rodero *et al.*, 1992). Os descendentes do cavalo Crioulo chegaram à América no ano de 1493, com o desembarque de Cristóvão Colombo na Ilha de São Domingos em sua segunda expedição rumo ao novo continente. Tendo esse evento como ponto de partida, os cavalos disseminaram-se ao longo da América no decorrer do século XVI por três pontos de entrada. A Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo foi fundada em 1932, com o objetivo de direcionar o futuro da seleção e preservação do pedigree da raça. A entidade é responsável por determinar os critérios fenotípicos necessários para a inclusão de animais no livro de registros oficial da raça (*Criollo Studbook*). Maciel *et al.* (2014) realizaram um estudo de caracterização genética do Crioulo utilizando marcadores microssatélites, o qual indica que essa raça não apresenta valores de endogamia tão elevados em comparação com as demais naturalizadas brasileiras.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achilli, A., Olivieri, A., Soares, P., Lancioni, H., Hooshiar Kashani, B., Perego, U. A., Nergadze, S. G., Carossa, V., Santagostino, M., Capomaccio, S., et al. (2012). Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2449–54.

Affymetrix Datasheet. Axiom Equine Genotyping Array (2015b). Disponível em:

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/axiom_equine_genotype_array_hr_universal_datasheet.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Affymetrix Datasheet. Axiom Porcine Genotyping Array (2015a). Disponível em:

https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/Axiom%20Porcine%20Genotyping%20Array_FINAL.PDF. Acesso em: janeiro/2021.

Al Abri, M. A., Borstel, U. K. V., Strecker, V., Brooks, S. A. Application of Genomic Estimation Methods of Inbreeding and Population Structure in an Arabian Horse Herd. **Journal of Heredity**, v. 108, p. 361-368, 2017.

Amorim Filho, E. F., Costa, F. B., Moraes-Filho, J., dos Santos, A. C. G., do Vale, T. L., da Costa, A. P., Silva, A. B., Labruna, M. B., Nogueira, R. M. S. Exposure of Baixadeiro horses to *Rickettsia spp.* and to ticks infected by *Rickettsia amblyommatis* in the Baixada Maranhense micro-region, Maranhão, Brazil (2018). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.48:09, e20180002.

ANDE-BRASIL. Associação Nacional de Equoterapia. Disponível em: <http://www.equoterapia.org.br>. Acesso em 02 de novembro de 2020.

Andersson, L. (2016) Domestic animals as models for biomedical research. *Upsala Journal of Medical Sciences* 121, 1–11.

Anuniação, A. R. A. Aspectos do desenvolvimento morfológico, morfométrico e ultraestrutural do aparelho ungueal do cavalo Baixadeiro. Dissertação Mestrado, USP. 2016, 52p.

Applied Biosystems™ Axiom™ Datasheet (2017a). Introducing the Canine High-Density (HD) Genotyping Array. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2Fcanine-high-density-genotyping-array-flyer.pdf&title=Rmx5ZXI6IENhbmluZSBlaWdoLURlbnNpdHkgR2Vub3R5cGluZyBBcnJheQ==>. Acesso em: janeiro/2021.

Applied Biosystems™ Axiom™ Datasheet (2017b). *Affymetrix Axiom Chicken Array*. Disponível em: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fbrochures%2Faxiom_chicken_array_plate_datasheet.pdf&title=RGFOYSBTaGVldHM6IEF4aW9tJnJlZzsgR2Vub211JiMONTtXaWRlIENoaWNrZW4gR2Vub3R5cGluZyBBcnJheQ==. Acesso em: janeiro/2021. Araújo, R. V. **Os Jesuítas dos sete povos**. Canoas: La Salle, 1990. 467p. Mariante, A.S., Cavalcante, N. Animais do Descobrimento. Raças domésticas da história do Brasil.

Avila F., Mickelson J. R., Schaefer R. J. & McCue M. E. (2018) Genome-wide signatures of selection reveal genes associated with performance in American quarter horse subpopulations. *Frontiers in Genetics* 9, 249.

Barcaccia, G., Felicetti, M., Galla, G., Capomaccio, S., Cappelli, K., Albertini, E., Buttazzoni, L., Pieramati, C., Silvestrelli, M., Supplizi, A. V. Molecular analysis of genetic diversity, population structure and inbreeding level of the Italian Lipizzan horse. *Livestock Science*, v. 151, p. 124-133, 2013.

Barker, D. J. P. (2001). The malnourished baby and infant. *British Medical Bulletin*, 12, 69–88. <https://doi.org/10.1093/bmb/60.1.69>.

Barnaud, A., Laucou, V., This, P., Lacombe, T., Doligez, A., 2010. Linkage disequilibrium in wild French grapevine: *Vitis vinifera* L. subsp. *silvestris*. *Heredity* (Edinb.) 104, 431–437.

Beck, S.L. **Equinos: raças, manejo e equitação**. 2.ed. São Paulo: Editora dos Criadores, 1985. 479p.

Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., et al. (2006). The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *PNAS* 103: 8113–8118.

Beltrán, N. A. R. **Assinaturas de seleção na linhagem de trabalho de equinos quarto de milha**. 2014. 59 f. Tese (Doutorado corrente em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2014.

Bickhart, D., Rosen, B., Koren, S. *et al.* Single-molecule sequencing and chromatin conformation capture enable *de novo* reference assembly of the domestic goat genome. *Nat Genet* **49**, 643–650 (2017). <https://doi.org/10.1038/ng.3802>

Binns, M. M., Boehler, D. A., Lambert, D. H. Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. **Animal Genetics**, v. 41, supl. 2, p. 154-158, 2010.

Boloramaa, S., Hayes, B. J., Savin, K., Hawken, R., Barendse, W., Arthur, P. F., Herd, R. M., Goddard, M. E. Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, p. 1684-1697, 2011.

Braga, R. M. Cavalo Lavradeiro em Roraima: aspectos históricos, ecológicos e conservação. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

Braga, R. M. Cavalo Lavradeiro: aspectos históricos, situação atual, desafios e possíveis soluções para sua conservação (2019). Embrapa Roraima. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/201421/1/DOC-N-65-.pdf>. Acesso em: novembro/2020.

Broeckx, B. J. G., Peelman, L., Saunders, J. H., Deforce, D. & Clement, L. (2017) Using variant databases for variant prioritization and to detect erroneous genotype-phenotype associations, *BMC Bioinformatics* 18, 535.

Brooks, S. A., Gabreski, N., Miller, D., Brisbin, A., Brown, H. E., Streeter, C., Mezey, J., Cook, D., Antczak, D. F. Whole-genome SNP association in the horse: Identification of a deletion in Myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. **PLoS Genet.**, v. 6(4):e1000909, 2010.

Bull, J. J. (2017). Lethal gene drive selects inbreeding. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 1, 1–16. <https://doi.org/10.1093/emph/eow030>.

Bussiman, F. O., Santos, B. A., Silva, B. C. A., Perez, B. C., Pereira, G. L., Chardulo, L. A. L., Eler, J. P., Ferraz, J. B. S., Mattos, E. C., Curi, R. A., Balieiro, J. C. C. Allelic and genotypic frequencies of the DMRT3 gene in the Brazilian horse breed Mangalarga Marchador and their association with types of gait (2019). *Genetics and Molecular Research* 18 (1): gmr18217.

Caetano, A. R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. esp., p. 64-71, 2009.

Campos, B. M., do Carmo, A. S., do Egito, A. A. et al. Genetic diversity, population structure, and correlations between locally adapted zebu and taurine breeds in Brazil using SNP markers. *Trop Anim Health Prod* 49, 1677–1684 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1376-7>

Campos, C., Pinto, F., Barbosa, R.I. 2008. O "Lavrado" de Roraima: Importância Biológica, Desenvolvimento e Conservação na maior Savana do Bioma Amazônia. Diagnóstico. Boa Vista-Roraima, INPA/Núcleo de Pesquisas de Roraima. 8p. (Documento encaminhado ao Ministério do Meio Ambiente através do Ofício INPA/Roraima sn. de 17.06.2008). Disponível em: http://agroeco.inpa.gov.br/reinaldo/RIBarbosa_ProdCient_Usu_Visitantes/2008Diagnostico_LAVRADO_MMA.pdf.

Cardellino, R. A. (2000). Animal genetics resource in southern Brazil. *Arch. Zootec.* 49: 327-331.

Carillier, C.; Larroque, H.; Palhière, I.; Clément, V.; Rupp, R.; Robert-Granié, C. (2013). *A first step toward genomic selection in the multi-breed French dairy goat population. Journal of Dairy Science*, 96(11), 7294–7305. doi:10.3168/jds.2013-6789

Charlier, C., Li, W., Harland, C. et al. (2016) NGS-based reverse genetic screen for common embryonic lethal mutations compromising fertility in livestock. *Genome Research* 26, 1333–41. Chieffi, A., 1950. *Criemos Bons Equídeos*. 2. ed. Ministério da Agricultura, Serviço de Informação Agrícola. Ríó de Janeiro. pp: 9-42.

Cieslak, M., Pruvost, M., Benecke, N., Hofreiter, M., Morales, A., et al. (2010) Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLOS One* 5: e15311.

Cintra, A. G. de C. **O Cavallo: Características, Manejo e Alimentação**. Editora ROCA. 2014.

Coelho, C. S., Adam, G. L., Agra de Omena e Silva, G., Silva de Carvalho, R., Cuña de Souza, V. R., & Fazio, F. (2019). *Heart Rate Monitoring in Mangalarga Marchador Horses During a Field Marcha Test. Journal of Equine Veterinary.*

Cook, D., Gallagher, P., Bailey, E. Genetics of swayback in American Saddlebred horses. **Animal Genetics**, v. 41, supl. 2, p. 64-71, 2010.

Costa, M. R. Caracterização genética de eqüídeos da raça marajoara por microssatélites. Belém, UFPA. 2007. 100 p. ; il; 30 cm. (Tese apresentada à Universidade Federal do Pará/UFPA - 2007).

Cothran, E. G., Santos, S. A., Mazza, M. C. M. et al. Genetics of the Pantaneiro horse of the Pantanal region of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.3, p.343349, 1998.

Das, A., Panitz, F., Gregersen, V. R., Bendixen, C. & Holm, L. E. (2015) Deep sequencing of Danish Holstein dairy cattle for variant detection and insight into potential loss-of-function variants in protein coding genes. *BMC Genomics* 16, 1043.

DeAssis, J. B. D. M., DeLaat, M. G. C. D., Peixoto, J. A. G., Bergmann, C. G., Fonseca and M. R. S. Carvalho (2009). Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses. *Genet. Mol. Res.* 8 (4): 1519-1524.

De Roos, A. P. W., Hayes, B. J., Spelman, R. J., Goddard, M. E.: Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. *Genetics*. 2008, 179: 1503-1512. 10.1534/genetics.107.084301. Di Filippo, P. A., Dias Meireles, M. A., Feitosa Ribeiro, L. M., Tinoco de Lannes, S., Torres Meireles, N. F., Viana, I. S., & Hokamura, H. K. (2019). *Influence of exercise, age, bodyweight and growth on the development of tarsal osteoarthritis in young Mangalarga Marchador horses. Journal of Equine Veterinary Science.* Diaz, S., Dulout, F. N. and Peral-Garcia, P. (2002). Greater genetic variability in Argentine Creole than in Thoroughbred horses based on serum protein polymorphisms. *Genet. Mol. Res.* 1: 261-265.

Druml, T., Neuditschko, M., Grilz-Seger, G., Horna, M., Ricard, A., Mesarič, M., Cotman, M., Pausch, H., Brem, G. (2017). *Population networks associated with runs of homozygosity reveal new insights into the breeding history of the Haflinger horse. Journal of Heredity*, (), -. doi:10.1093/jhered/esx114

Du, F. X., Clutter, A. C., Lohuis, M. M. Characterizing linkage disequilibrium in pig populations. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 3, p. 166-178, 2007.

Dupuis, M. C., Zhang, Z., Druet, T., Denoix, J. M., Charlier, C., Lekeux, P., Georges, M. Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 9-10, p. 613-20, 2011.

Eberth, J., Swerczak, T., Bailey, E. Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 5, p. 315, 2009.

Falcão, R. F. Variação genética, fenotípica e caracterização do cavalo Campeiro [dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília; 2002. 72 p.

Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, p. 1567–1587, 2003.

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

Fan B., Du Z.Q., Gorbach D.M., Rothschild M.F. (2010) Development and Application of High-density SNP Arrays in Genomic Studies of Domestic Animals. *Asian-Aust J Anim Sci* 23: 833–847.

FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments (2011). Livestock statistics - Concepts, definitions and classifications.

FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments (2015). *The second report on the state of world's: animal genetic resources for food and agriculture*. (ed. Scherf, B. D.) Rome, Italy.

FAOSTAT (2018). Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/>. Acesso em: 22 de outubro de 2020.

Faria, D. A., Wilson, C., Paiva, S. *et al.* Assessing *Sus scrofa* diversity among continental United States, and Pacific islands populations using molecular markers from a gene banks collection. *Sci Rep* 9, 3173 (2019) doi:10.1038/s41598-019-39309-9.

Faria, R. A. da S.. **Estrutura populacional e parâmetros genéticos da característica classe de tempo em corridas de equinos da Raça Quarto de Milha**. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

Ferreira, M. E., Grattapaglia, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-Cenargen: Brasília, 3 ed., 1998. 220 p.

Figueiró, M. R., Costa, J. da S., Marques, L. C., Costa, M. R., Marques, J. R. F. Equinos (*Equus caballus*) da raça Marajoara em conservação na ilha do Marajó (2012). Embrapa Amazônia Oriental. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/950511/1/594.pdf>.

Fonseca, M. G., Ferraz, G. C., Lage, J., Pereira, G. L., Curi, R. A. A genome-wide association study reveals differences in the genetic mechanism of control of the two gait patterns of the Brazilian Mangalarga Marchador breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 64-67, 2017.

Freeman, D. (2005). Managing young horses for sound growth. Retrieved from <http://pods.dasnr.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Rendition-6277/unknown>.

Gazolla, A. G., Lima, F. C., Serra, O. Condições de Manejo, Conservação, Estado Sanitário e Caracterização Fenotípica do Cavalo Baixadeiro (2016). Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos. Artigos de divulgação científica. Revista RG News 2 (1).

Gibbs, R. A., Taylor, J. F., Van Tassell, C. P. Genome-Wide Survey of SNP Variation Uncovers the Genetic Structure of Cattle Breeds. **Science**, v. 324, p. 528-532, 2009.

Goulart, J.A., 1964. O cavalo na formação do Brasil. Editora Letras e Artes, Rio de Janeiro, 249p.

Gotherstrom, A., Anderung, C., Hellborg, L., Elburg, R., Smith, C., et al. (2005). Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *P R Soc B* 272: 2345–2350.

Groenen, M. A. M., Archibald, A. L., Uenishi, H., Tuggle, C. K., Takeuchi, Y., Rothschild, M. F., ... Megens, H.-J. (2012). *Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. Nature*, 491(7424), 393–398. doi:10.1038/nature11622.

Guimarães, P. E. M., Costa, M. C. R. SNPs: Satis diferenças de um código. **Biociência**, v. 26, p. 24-27, 2002.

Gurgul, A., Emik, E., Pawlina, K., Szmatoła, T., Jasielczuk, I., Bugno-Poniewierska, M. The application of genome-wide SNP genotyping methods in studies on livestock genomes. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, n. 2, p. 197-208, 2014.

Hasler, H., Flury, C., Menet, S., Haase, B., Leeb, T., Simianer, H., Poncet, P. A., Rieder, S. (2011). *Genetic diversity in an indigenous horse breed – implications for mating strategies and the control of future inbreeding. 128(5), 394–406. doi:10.1111/j.1439-0388.2011.00932.x*

Hayes, B. J., Visscher, P. M., McPartlan, H. C. E., Goddard, M. E. Novel Multilocus Measure of Linkage Disequilibrium to Estimate Past Effective Population Size. **Genome Research.**, v. 13, p. 635-643, 2003.

Hendricks, B, L. International Encyclopedia of Horse Breeds (2007). Norman, OK: University of Oklahoma Press.

Hermisdorff, G.E., 1956. Zootecnia Especial. Tomo 1. Equídeos, Rio de Janeiro, 626p.

Hestand, M. S., Kalbfleisch, T. S., Coleman, S. J., Zeng, Z., Liu, J., Orlando, L., Macleod, J. N. Annotation of the Protein Coding Regions of the Equine Genome. **PLoS ONE**, 10(6):e0124375, 2015.

Hill, E. W., McGivney, B. A., Gu, J., Whiston, R., MacHugh, D. E. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred race horses. **BMC Genomics**, v. 11, n. 552, p. 1-10, 2010.

Hoepfner, M. P., Lundquist, A., Pirun, M., Meadows, J. R. S., Zamani, N., Johnson, J., Grabherr, M. G. *et al.* (2014). *An Improved Canine Genome and a Comprehensive Catalogue of Coding Genes and Non-Coding Transcripts*. **PLoS ONE**, 9(3), e91172. doi:10.1371/journal.pone.0091172

Hristov, P. I., Teofanova, D. R., Neov, B. S., Zagorchev, L. I.; Radoslavov, G. A. Population structure of two native bulgarian cattle breeds with regard to CSN3 and CSN1S1 gene polymorphism. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 17, p. 18-24, 2014.

Ianella, P., Albuquerque, M. do S. M., Paiva, S. R., Egito, A. A., Almeida, L. D., Sereno, F. T. P. S., Carvalho, L. F. R., Mariante, A. da S., McManus, C. M. (2017). *D-loop haplotype diversity in Brazilian horse breeds*. **Genetics and Molecular Biology**, 40(3), 604–609. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0166

Ianella, P., Albuquerque, M. do S. M., Caetano, A. R., Biazio, G. R., Paiva, S. R., Nepomuceno, A. R., Carvalho, L. F. R., McManus, C. M. (2018). Genetic diversity and Population Structure of locally adapted horse breeds in Brazil. *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Volume Electronic Poster Session - Challenges - Species Conservation, 60, 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro De Geografia e Estatística. Censo agropecuário (2017). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em outubro de 2020.

Illumina Inc. Datasheet: SNP Genotyping (2010). EquineSNP50 Genotyping BeadChip. Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_equine_snp50.pdf.

Acesso em: janeiro/2021.

Illumina Inc. Datasheet: DNA Analysis (2011). San Diego, CA, United States. Disponível em: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/brochures/datasheet_omni_whole-genome_arrays.pdf.

Illumina Inc. Datasheet: Agrigenomics (2015a). BovineLD v2.0 Genotyping BeadChip. Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_bovineLD.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Illumina Inc. Datasheet: Agrigenomics (2015b). PorcineSNP60 v2 Genotyping BeadChip. Disponível em: https://genomics.neogen.com/pdf/prodinfo/illumina_porcine_snp60v2_beadchip_datasheet.pdf. Acesso em: novembro/2020.

Illumina Inc. Datasheet: Agrigenomics (2015c). BovineHD Genotyping BeadChip. Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_bovineHD.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Illumina Inc. Datasheet: Agrigenomics (2015d). OvineSNP50 Beadchip. Disponível em: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_ovinesnp50.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Illumina Inc. Datasheet: Design Markers (2020). BovineSNP50 v3 BeadChip. Disponível em: https://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_bovine_snp50.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Illumina Inc. Datasheet: DNA Genotyping (2009). CanineHD Beadchip. Disponível em: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/datasheet_caninehd.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Iso-Touru, T., Tapio, M., Vilkki, J., Kiseleva, T., Ammosov, I., Ivanova, Z., Popov, R., Ozerov, M., Kantanen, J. Genetic diversity and genomic signatures of selection among cattle breeds from Siberia, eastern and northern Europe. **Anim Genet**, v. 47, p. 647–657, 2016.

Jagannathan, V., Gerber, V., Rieder, S., Tetens, J., Thaller, G., Drögemüller, C., Leeb, T. Comprehensive characterization of horse genome variation by whole-genome sequencing of 88 horses. *Anim Genet.* 2019 Feb;50(1):74-77. doi: 10.1111/age.12753. Epub 2018 Dec 7. PMID: 30525216.

Jansen, T., Forster, P., Levine, M. A., Oelke, H., Hurles, M., et al. (2002) Mitochondria DNA and the origins of the domestic horse. *PNAS* 99: 10905–10910.

Jasielczuk, I., Gurgul, A., Szmato Ia, T., Semik-Gurgul, E., Pawlina-Tyszko, K., Stefaniuk-Szmukier, M., Polak, G., Tomczyk-Wrona, I., Bugno-Poniewierska, M. (2020). *Linkage disequilibrium, haplotype blocks and historical effective population size in Arabian horses and selected Polish native horse breeds. Livestock Science, 239(), 104095–*. doi:10.1016/j.livsci.2020.104095.

Jiang, Y.; Xie, M.; Chen, W.; Talbot, R.; Maddox, J. F.; Faraut, T.; Wu, C. *et al.* (2014). *The sheep genome illuminates biology of the rumen and lipid metabolism. Science, 344(6188), 1168–1173.* doi:10.1126/science.1252806.

Johnston S. E., McEwan J. C., Pickering N. K., Kijas J. W., Beraldi D., Pilkington J. G., Pemberton J. M., Slate J. Genome-wide association mapping identifies the genetic basis of discrete and quantitative variation in sexual weaponry in a wild sheep population. *Mol Ecol.* 2011 Jun;20(12):2555-66. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05076.x. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21651634.

Jombart, T. Adegnet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1403–1405, 2008.

Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **Bmc Genet**, v. 11, p. 94-109, 2010.

Kader, A., Liu, X., Dong, K., Song, S., Pan, J., Yang, M., Chen, X., He, X., Jiang, L., Ma, Y. (2016). *Identification of copy number variations in three Chinese horse breeds using 70K single nucleotide polymorphism BeadChip array. Animal Genetics, (), –*. doi:10.1111/age.12451

Kalbfleisch, T. S., Rice, E. S., DePriest Jr., M. S. et al. (2018) EquCab3, an updated reference genome for the domestic horse. *bioRxiv*, 306928. <https://doi.org/10.1101/306928>.

Kijas, J. W., Townley, D., Dalrymple, B. P., Heaton, M. P., Maddox, J. F., McGrath, A., Wilson, P., Ingersoll, R. G., McCulloch, R., McWilliam, S., Tang, D., McEwan,

J., Cockett, N. V., Oddy, H., Nicholas, F. W., Raadsma, H. A. Genome Wide Survey of SNP Variation Reveals the Genetic Structure of Sheep Breeds. **PLoSOne**, 4(3):e4668, 2009.

Kulbrock, M., Lehner, S., Metzger, J., Ohnesorge, B., Distl, O. A Genome-Wide Association Study Identifies Risk Loci to Equine Recurrent Uveitis in German Warmblood Horses (2013). *PLoS ONE*, 8 (8) , art. no. e71619

Kurtz, F., & Löf, H. K. (2007). Biometria de equinos da raça Crioula no Brasil. *Archives of Veterinary Science*, 12, 47–51.

Kvist, L., Honka, J., Niskanen, M., Liedes, O., Aspi, J. Selection in the Finnhorse, a native all-around horse breed (2020). *J. Anim. Breed. Genet.* 2020; 00:1-16.

Kwok, P. Y., Gu, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? **Mol Med Today**, v. 5, p. 538-543, 1999.

Lage, J., Fonseca, M. G., de Barros, G. G. M., Feringer-Júnior, W. H., Pereira, G. T., & Ferraz, G. C. (2017). *Workload of official contests, net cost of transport, and metabolic power of Mangalarga Marchador horses of marcha batida or picada gaits1. Journal of Animal Science*, 95(6), 2488–2495.

Lashmar, S. F., Visser, C., Van Marle-Köster, E. (2015). *Validation of the 50k Illumina goat SNP chip in the South African Angora goat. South African Journal of Animal Science*, 45(1), 56–. doi:10.4314/sajas.v45i1.7

Lauvie, A., Couix, N. and Verrier, E. (2014). No development, no conservation: elements 43 from the conservation of farm animal genetic resources. *Soc. Nat. Resour.* 27, 1331–1338.

Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., et al. (2005) Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307: 1618–1621.

Lei, C. Z., Su, R., Bower, M. A., Edwards, C. J., Wang, X. B., et al. (2009) Multiple maternal origins of native modern and ancient horse populations in China. *Anim Genet* 40: 933–944.

Librado, P., Fages, A., Gaunitz, C., Leonardi, M., Wagner, S., Khan, N., Hanghoj, K., Alquraishi, S. A., Alfarhan, A. H., Al-Rasheid, K. A., et al. (2016). The evolutionary origin and genetic makeup of domestic horses. *Genetics* 204, 423–434.

Librado, P., Gamba, C., Gaunitz, C., Sarkissian, C. Der, Pruvost, M., Albrechtsen, A., Fages, A., Khan, N., Schubert, M., Jagannathan, V., et al. (2017). Ancient genomic changes associated with domestication of the horse. 445, 442–445.

Lima, R. A. S., Shiota, R., Barros, G. S. C. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil. (Relatório Final), CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, Piracicaba: ESALQ/USP, SP, Brasil, 2006. 250 p.

Ling, Y., Ma, Y., Guan, W., Cheng, Y., Wang, Y., Han, J., Jin, D., Mang, L. and Mahmut, H. (2010). Identification of y chromosome genetic variations in Chinese Indigenous horse breeds. *J. Hered.* 101, 639–643.

Lippi, A. S., Mortari, N. Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Mangalarga (*Equus caballus*). *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 431-434, 2003.

Lippold, S., Matzke, N. J., Reissmann, M. and Hofreiter, M. (2011). Whole mitochondrial genome sequencing of domestic horses reveals incorporation of extensive wild horse diversity during domestication. *BMC Evol. Biol.* 11, 328.

Lira, J., Linderholm, A., Olaria, C., Brandstrom Durling, M., Gilbert, M. T., et al. (2010). Ancient DNA reveals traces of Iberian Neolithic and Bronze Age lineages in modern Iberian horses. *Mol Ecol* 19: 64–78.

Liu, X.-X., Pan, J.-F., Zhao, Q.-J., He, X.-H., Pu, Y.-B., Han, J.-L., Ma, Y.-H., Jiang, L. (2018). *Detecting selection signatures on the X chromosome of the Chinese Debao pony. Journal of Animal Breeding and Genetics*, 135(1), 84–92. doi:10.1111/jbg.12314

Ma, Youji; Zhang, Quanwei; Lu, Zengkui; Zhao, Xingxu; Zhang, Yong (2015). *Analysis of copy number variations by SNP50 BeadChip array in Chinese sheep. Genomics*, (), S0888754315300252–. doi:10.1016/j.ygeno.2015.08.001

MacFadden, B. J. (2005). Fossil Horses —. *Evolution (N. Y.)*. 307, 1728–1730.

Maciel, F. C., Bertoli, C. D., Braccini Neto, J., Cobuci J. A., Paiva, S. R., McManus, C. M. 2014. Population structure and genealogical analysis of the Brazilian Crioula Horse. *Animal Genetic Resources*. 54:115-125.

Makino T., Rubin C.-J., Carneiro M., Axelsson E., Andersson L. & Webster M.T. (2018) Elevated proportions of deleterious genetic variation in domestic animals and plants. *Genome Biology and Evolution* 10, 276–90.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo (2016).

Mariante, A. S., Albuquerque, M. S. M., Egito, A. A., McManus, C. (1999). Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. *Animal Genetic Resources Information*, FAO, 25: 109-123.

Mariante, A. S., Cavalcante, N. **Animais do descobrimento**: raças domésticas da história do Brasil. Brasília: Embrapa - Cenargen, 2000. 232p.

Mariz, T. M. A., Anjos, A. G., Flor, J. M., Flor, L. M. A. M., Lima, C. B., Givisiez, P. E. N. & Azevedo, P.S. 2008. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. *Acta Veterinaria Brasilica* 2:39-43.

Marques, J. R. F., Figueiró, M. R., Saraiva, N. Z., Leal, R. P., Sales, R. L., Costa, M. R. Equinos em conservação na Ilha de Marajó, Amazônia, Brasil. *Revista RG News* 2 (2) 2016 - Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos.

Marques, J. R. F., Costa, M. R., Camargo, Jr. R. N. C., Albuquerque, M. S. M., et al. (2008). **Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira**. In: Anais do Congresso Brasileiro de Zootecnia, João Pessoa.

Marques, J. R. F.; Costa, M. C.; Silva, A. O. A. **Banco de recursos genéticos animais**. In: *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, n. 21, p. 32-39. Julho/Agosto 2001.

McKay, S. D., Schnabel, R. D., Murdoch, B. M., Matukumalli, L. K., Aerts, J., Wouter Coppeters, W., Crews, D., Dias Neto, E., Gill, C. A., Gao, C., Mannen, H., Stothard, P., Wang, Z., Van Tassell, C. P., Williams, J. L., Taylor, J. F., Moore, S. S. Whole genome linkage disequilibrium maps in cattle. **BMC Genetics**, v. 8, p. 74, 2007.

McKinnon, A. O. & Squires, E. L. 2007. Embryo transfer and related technologies, p.319-334. In: *Current Therapy Equine Reproduction*. Saunders, Missouri. McManus, C., Santos, S. A., Dallago, B. S. L., Paiva, S. R., Martins, R. F. S., Braccini Neto, J., Marques, P. R., Abreu, U. G. P. de. (2013). *Evaluation of conservation program for the Pantaneiro horse in Brazil*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(6), 404-413. doi:10.1590/s1516-35982013000600004.

Meira, C. T., Curi, R. A., Farah, M. M., Oliveira, H. N., Beltran, N. A. R., Silva, J. A. II V., Mota, M. D. S. Prospection of genomic regions divergently selected in racing line of Quarter Horses in relation to cutting line. **Animal Journal**, v. 8, ed. 11, p. 1754-1764, 2014a.

Meira, C. T., Farah, M. M., Fortes, M. R. S., Moore, S. S., Pereira, G. L., Silva, J. A. II V., Mota, M. D. S., Curi, R. A. A Genome-wide association study for morphometric traits in Quarter Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, ed. 8, p. 102-1031, 2014b.

Michelizzi, V. N., Wu, X., Dodson, M. V., Michal, J. J., Zambrano-Varon, J., McLean, D. J., & Jiang, Z. (2010). A global view of 54,001 single nucleotide polymorphisms

(SNPs) on the Illumina BovineSNP50 BeadChip and their transferability to water buffalo. *International journal of biological sciences*, 7(1), 18–27.

<https://doi.org/10.7150/ijbs.7.18>. Molina, A., Muñoz, E., Díaz, C., Menéndez-Buxadera, A., Ramón, M., Sánchez, M., Carabaño, M. J., Serradilla, J. M. (2017). *Goat genomic selection: Impact of the integration of genomic information in the genetic evaluations of the Spanish Florida goats. Small Ruminant Research*, (), S0921448817303310–. doi:10.1016/j.smallrumres.2017.12.010

Moraes, B. S. S., Amaral, L. A., Finger, I. S., Mazzini, A. R. A., Pazinato, F. M., Curcio, B. R., & Nogueira, C. E. W. (2017). Curva de crescimento de potros da raça Criollo do nascimento aos 24 meses de idade. *Acta Scientiae Veterinariae*, 45, 1–7.

More, M., Gutiérrez, G., Rothschild, M., Bertolini, F., & Ponce de León, F. A. (2019). *Evaluation of SNP Genotyping in Alpacas Using the Bovine HD Genotyping Beadchip. Frontiers in Genetics*, 10. doi:10.3389/fgene.2019.00361.

Moura, E. G. **Agroambientes de transição:** entre o trópico úmido e o semi-árido e do Brasil – atributos; alterações; uso na produção familiar. São Luís: UEMA, 2004

Muir, W. M., Wongb, G. K., Zhang, Y., Wangc, J., Groenend, M. A. M., Crooijmansd, R. P. M. A., Megensd, H. J., Zhange, H., Okimotof, R., Vereijeng, A., Jungeriusg, A., Albersg, G. A. A., Lawleyh, C. T., Delanvi, M. E., MacEacherne, S., Cheng, H. H. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. **Proceedings** of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, p. 17312-17317, 2008.

Mujibi, F. D., Okoth, E., Cheruiyot, E. K., Onzere, C., Bishop, R. P., Fèvre, E. M., ... Rothschild, M. (2018). *Genetic diversity, breed composition and admixture of Kenyan domestic pigs. PLOS ONE*, 13(1), e0190080.

Müller, V., Moraes, B. dos S. S., Carvalho, I. R., Wendt, C. G., Patten, R. D., Nogueira, C. E. W. Genetic parameters of morphometric measurements in Criollo horses (2020). *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2020; 00:1-5. DOI: 10.1111/jbg.12503.

Muñoz, M., Bozzi, R., García-Casco, J., Núñez, Y., Ribani, A., Franci, O., ... Óvilo, C. (2019). *Genomic diversity, linkage disequilibrium and selection signatures in European local pig breeds assessed with a high density SNP chip. Scientific Reports*, 9(1). doi:10.1038/s41598-019-49830-6.

Nakaya, H. L., Amaral, P. P., Louro, R., Lopes, A., Fachel, A. A., Moreira, Y. B., El-Jundi, T. A., Silva, A. M., Reis, E. M., Verjovski-Almeida, S. Comment reviews reports deposited research refereed research interactions information Genome mapping and

expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. **Genome Biology**, v. 8(R43), p.1-25, 2007.

Nanaei H. A., Mehrgardi A. A. & Esmailzadeh A. (2019) Comparative population genomics unveils candidate genes for athletic performance in Hanoverians. *Genome* 62, 279–85.

National Center for Biotechnology Information – NCBI. Bethesda, Maryland, United States. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: novembro/2020.

Neogen Genomics, Lincoln, NE, United States. Disponível em: <https://genomics.neogen.com/en/>. Acesso em: novembro/2020.

Nolte W., Thaller G. & Kuehn C. (2019) Selection signatures in four German warmblood horse breeds: Tracing breeding history in the modern sport horse. *PLoS ONE* 14, e0215913.

Notter, D. R. (1999). *The importance of genetic diversity in livestock populations of the future. Journal of Animal Science*, 77(1), 61. doi:10.2527/1999.77161x.

Olsen, S. H. *Horses through time* (2003). Carnegie Museum of Natural History (ed. Olsen, S. H.) Lanham, MD: Roberts Rinehart.

Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA. Sydney School of Veterinary Science. World Wide Web URL: <https://omia.org/>. Acesso em: Janeiro/2021.

Outram, A. K., Stear, N. a, Bendrey, R., Olsen, S., Kasparov, A., Zaibert, V., Thorpe, N. and Evershed, R. P. (2009). The earliest horse harnessing and milking. *Science*. 323, 1332–1335.

Paim, T.d.P., Faria, D.A., Hay, E.H. *et al.* New world goat populations are a genetically diverse reservoir for future use. *Sci Rep* 9, 1476 (2019) doi:10.1038/s41598-019-38812-3.

Paim, T. dP., McManus, C., Vieira, F. D., Oliveira, S. R. dM., Facó, O., Azevedo, H. C., Araújo, A. M.d, Moraes, J. C. F., Yamagishi, M. E. B., Carneiro, P. L. S. and others (2019). Validation of a customized 2 subset of SNPs for sheep breed assignment in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 54: 1-5.

Paiva, S. R., D.S., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2005. Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares. Tese de doutorado.

Patterson, L., Staiger, E. A., & Brooks, S. A. (2015). *DMRT3 is associated with gait type in Mangalarga Marchador horses, but does not control gait ability*. *Animal Genetics*, 46(2), 213–215. doi:10.1111/age.12273.

Pedrosa, S., Uzun, M., Arranz, J. J., Gutierrez-Gill, B., Primitivo, F. S., et al. (2005). Evidence of three maternal lineages in near eastern sheep supporting multiple domestication events. *P R Soc B* 272: 2211–2217.

Pekkala, N., Knott, K. E., Kotiaho, J. S., Nissinen, K., & Puurtinen, M. (2014). The effect of inbreeding rate on fitness, inbreeding depression and heterosis over a range of inbreeding coefficients. *Evolutionary Applications*, 7, 1107–1119. <https://doi.org/10.1111/eva.12145>.

Pemberton, J., Ellis, P., Pilkington, J. et al. Inbreeding depression by environment interactions in a free-living mammal population. *Heredity* 118, 64–77 (2017). <https://doi.org/10.1038/hdy.2016.100>.

Pereira, G. L., Chud, T., Bernardes, P., Venturini, G., Chardulo, L. A., Curi, R. A. Genotype Imputation and Accuracy Evaluation in Racing Quarter Horses Genotyped Using Different Commercial SNP Panels. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 58, p. 89 - 96, 2017.

Pereira G. L., Malheiros J. M., Ospina A. M. T., Chardulo L. A. L. & Curi R. A. (2019) Exome sequencing in genomic regions related to racing performance of Quarter Horses. *Journal of Applied Genetics* 60, 79–86.

Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Rendahl, A. K., Valberg, S. J., Andersson, L. S., Axelsson, J., Bailey, E., Bannasch, D., Binns, M. M., Borges, A. S., Brama, P., Machado, A. Da, C. Capomaccio, S., Cappelli, K., Cothran, E. G., Distl, O., Fox-Clipsham, L., Graves, K. T., Guérin, G., Haase, B., Hasegawa, T., Hemmann, K., Hill, E. W., Leeb, T.; Lindgren, G., Lohi, H., Lopes, M. S., McGivney, B. A., Mikko, S., Orr, N., Penedo, M. C. T., Piercy, J., Raekallio, M., Rieder, S., Røed, K. H., Swinburne, J., Tozaki, T., Vaudin, M., Wade, C. M., McCue, M. E. Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2013a.

Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Cothran, E. G., Andersson, L. S., Axelsson, J., et al. (2013b) Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *PLoS ONE* 8(1): e54997. doi:10.1371/journal.pone.0054997.

Petersen J. L., Valberg S. J., Mickelson J. R. & McCue M. E. (2014) Haplotype diversity in the equine myostatin gene with focus on variants associated with race distance propensity and muscle fiber type proportions. *Animal Genetics* 45, 827–35.

Pimentel, A. M. H., Rodrigues, W. B., Martins, C. F., Montanez, N. R., Boligon, A. A., & Souza, J. R. M. (2017). Gender on the growth of Criollo foals from birth to three years of age. *Ciência Rural*, 45, 1–6. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150989>.

Prado Silva, R. H., Carneiro de Rezende, A. S., Ferreira, W. M., Bastianetto, E., Mello, M. M., Pereira de Abreu, A., ... Ralston, S. L. (2019). *Apparent Digestibility of Nutrients, Blood Parameters and Body Development of Dewormed and Not Dewormed Weanlings*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 80.

Price, A. L., Patterson, N. J., Plenge, R. M., Weinblatt, M. E., Shadick, N. A., Reich, D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nature Genetics*, v. 38, p. 904–909, 2006.

Qanbari, S., Simianer, H. Mapping signatures of positive selection in the genome of livestock. *Livestock Science*, v. 166, p. 133-143, 2014.

Raudsepp, T., Finno, C. J., Bellone, R. R., & Petersen, J. L. (2019). *Ten years of the horse reference genome: insights into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era*. *Animal Genetics*. doi:10.1111/age.12857.

Ramalho, M., Santos, J. B., Pinto, C. B., Souza, E. A., Gonçalves, F. M. A., & Souza, J. C. (2012). *Genética na agropecuária* (5th ed., 565p). Lavras, Brazil: UFLA.

Regatieri, I. C., Pereira, G. L., Teixeira Neto, A. R., Ferraz, G. C., Curi, R. A., Queiroz-Neto, A. Polymorphisms in MCT1, CD147, PDK4 and DMRT3 genes in Arabian and Quarter Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 48, p. 161-165, 2016.

Reis, S. P., Gonçalves, E. C., Silva, A., & Schneider, M. P. C. (2008). *Genetic variability and efficiency of DNA microsatellite markers for paternity testing in horse breeds from the Brazilian Marajó archipelago*. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 68–72. doi:10.1590/s1415-47572008000100014.

Ribeiro, C. R., Fagliari, J. J., Galera, P. D., Oliveira, A. R. Hematological profile of healthy Pantaneiro horses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2008, vol.60, n.2, pp.492-495. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000200033>.

Rodero, A., Delgado, J. V. & Rodero, E. 1992. Primitive Andalusian livestock and their implication in the Discovery of America. *Arch.*

Sadeghi R., Moradi-Shahrbabak M., Miraei Ashtiani S. R., Schlamp F., Cosgrove E. J. & Antczak D. F. (2019) Genetic diversity of Persian Arabian horses and their relationship to other native Iranian horse breeds. *Journal of Heredity* 110, 173–82.

Santos, S.A. Avaliação e Conservação do Cavalo Pantaneiro no Pantanal Mato-Grossense, In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 30., 1993. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.287-308.

Santos, S. A., Abreu, U. G. P., Comastri Filho, J. A., Sorares, R. J. Caracterização e conservação do cavalo Pantaneiro (2008). Embrapa Pantanal. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/812962/1/FOL134.pdf>.

Santos, S. A, Figueiró, M. R., Saraiva, N. Z., Braga, R. M. Núcleos de conservação de equinos (2016). Embrapa Pantanal. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1065407>.

Santos, S. A, Mazza, M. C. M., Sereno, J. R. B. et al. Avaliação e conservação do cavalo Pantaneiro. Corumbá: Embrapa Pantanal, 1995. 40p. (Circular técnica 21).

Santos, S.A., McManus, C., Mariante, A.S. et al. A review of Conservation and Management of the Pantaneiro horse in the Brazilian Pantanal. **Animal Genetic Resources Information**, v.31, p.75-86, 2001.

Santos, S. A., McManus. C., Mariante A., Silva Sereno, J. R. B., Silva, J. A., Abreu. U. G. P., Filho, J. A. C., Lara, M. A. **Estratégias de conservação in situ do cavalo pantaneiro**. Brasília: Embrapa, 2003a.

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

Santos, W. B. (2020a). Genome-wide scan for selection signature and estimates of levels of autozygosity in Mangalarga Marchador horses [dissertation]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/193259>.

Santos, W. B., Schettini, G. P., Fonseca, M. G., Pereira, G. L., Chardulo, L. A. L., Neto, O. R. M., Baldassini, W. A., Oliveira, H. N., Curi, R. A. (2020b). Fine-scale estimation of inbreeding rates, runs of homozygosity and genome-wide heterozygosity levels in the Mangalarga Marchador horse breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2020; 00:1–13.

Santos, A. C. G., Chaves, d. P., Lima, F. C., Brito, d. R. B., Amorim Filho, E. F., Silca, C. R., Vaz, J. F. R., Silva, R. L. V., Costa, F. B. C., Costa, A. P., Lima, I. L., Soares, E. D. S. Sanidade do grupamento racial “Cavalo Baixadeiro”: doenças parasitárias e infecciosas. In: ALMEIDA, Z. S. da. Sumário executivo para plano de ação na área de proteção ambiental da Baixada Maranhense. São Luís: [s.n], 2013b. p. 218.

Sargolzaei, M., Schenkel, F. S., Jansen, G. B., Schaeffer, L. R. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2106-2117, 2008.

Schaefer, R. J., Schubert, M., Bailey, E. et al. (2017) Developing a 670k genotyping array to tag ~2M SNPs across 24 horse breeds. *BMC Genomics* 18, 565.

Schöder, W., Klostermann, A., Stock, K. F., Distl, O. A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian Warm blood horses. **Animal Genetics**, v. 43, n. 4, p. 392-400, 2011.

Sereno, F. T. P. de S., Sereno, J. R. B., Vega-Pla, J. L., Kelly, L., & Bermejo, J. V. D. (2008). *Genetic diversity of Brazilian Pantaneiro horse and relationships among horse breeds. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(5), 595–604.

Sereno, F. T. P. S. **Caracterización genética del caballo Pantaneiro**. Córdoba: Universidad de Córdoba, 2002. 126p. Tesis (Doctoral in Genetica Animal) - Universidad de Córdoba, 2002.

Solis, A., Jugo, B. M., Mériaux, J. C. et al. Genetic diversity within and among four south European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: implications for conservation. **Journal Heredity**, v.96, n.6, p.670-678, 2005.

Souza, A. F. de., Fonteque, J. H., Costa, D. Cavalos Campeiros: passado, presente e futuro do Marchador das Araucárias. *Rev Acad Cienc Anim.* 2018;16 (Ed Esp 2): e162102 DOI: 10.7213/1981-4178.2018.162102 eISSN: 1981- 4178.

Souza, G. A. de., Carvalho, M. R. de O., Martins, E. R., Guedes, R. N. C., Oliveira, L. O. de. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 843-49, 2008.

Squires, E. L., McCue, P. M. & Vanderwall, D. K. 1999. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology* 51:91-104.

Staniar, W. B., Kronfeld, D. S., Akers, R. M., & Harris, P. A. (2007). Insulin-like growth factor I in growing thoroughbreds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 91, 390–399. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2006.00666.x>.

Swine Genome Sequencing Consortium. Disponível em: <https://www.igb.illinois.edu/labs/schook/sgsc/>). Acesso em: novembro/2020.

Tamminen, S. (2015). Changing values of farm animal genomic resources. From historical breeds to the Nagoya Protocol. *Front. Genet.* 6, 1–9.

Teixeira, J. C. O. O Cavalo; Origem e Evolução. Cavalo Marajoara, v.11. p.8. 1985.

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

Teyssèdre, S., Dupuis, M. C., Guérin, G., Schibler, L., Denoix, J. M., Elsen, J. M., Ricard, A. Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotters. **Journal Animal Science**, v. 90, p. 45-53, 2012.

The Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium, Elsik, C. G., Tellam, R. L., Worley, K. C. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution (2009). *Science*. Vol. 324, Issue 5926, pp. 522-528.

Toledo, N. M. Estudo da estrutura genética de ovinos localmente adaptados do Brasil por meio de marcadores de base única (SNP - Single Nucleotide Polymorphism). 2014. ix, 79 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Torres, A. P., e W.R. Jardim, 1977. Criação do cavalo e de outros equídeos. 3. ed. Nobel, São Paulo. 654p.

Tosser-Klopp, G., Bardou, P., Bouchez, O., Cabau, C., Crooijmans, R., et al. (2014) Design and Characterization of a 52K SNP Chip for Goats. PLoS ONE 9(1): e86227. doi:10.1371/journal.pone.0086227.

Tozaki T., Kikuchi M., Kakoi H. et al. (2019) Genetic diversity and relationships among native Japanese horse breeds, the Japanese Thoroughbred and horses outside of Japan using genome-wide SNP data. *Animal Genetics* 50, 449–59.

Vanderwall, D. K. & Woods, G. L. 2007. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, Missouri.

Vieira, E.R. Aspectos econômicos e sociais do complexo agronegócio cavalo no Estado de Minas Gerais. 2011. 140p. Dissertação (Mestrado em: Zootecnia). Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Vila, C., Leonard, J. A., Gotherstrom, A., Marklund, S., Sandberg, K., et al. (2001). Widespread origins of domestic horse lineages. *Science* 291: 474–477.

Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S. et al. (2009) Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* 326, 865–7.

Warmuth, V., Eriksson, A., Bower, M. A., Barker, G., Barrett, E., Hanks, B. K., Li, S., Lomitashvili, D., Ochir-Goryaeva, M., Sizonov, G. V., et al. (2012). Reconstructing

the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8202–8206.

Warren, W. C.; Hillier, L. W., Tomlinson, C., Minx, P., Kremitzki, M., Graves, T., Markovic, C., Bouk, N., Pruitt, K. D., Thibaud-Nissen, F., Schneider, Va., Mansour, T. A., Brown, C. T., Zimin, A., Hawken, R., Abrahamsen, M., Pyrkosz, A. B., Morisson, M., Fillon, V., Vignal, A., Chow, W., Howe, K., Fulton, J. E., Miller, M. M., Lovell, P., Mello, C. V., Wirthlin, M., Mason, A. S., Kuo, R., Burt, D. W., Dodgson, J. B., Cheng, H. H. (2017). *A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. G3: Genes/Genomes/Genetics*, 7(1), 109–117. doi:10.1534/g3.116.035923

Welsh, C. S., Stewart, T. S., Schwab, C., Blackburn, H. D.: Pedigree analysis of 5 swine breeds in the United States and the implications for genetic conservation. *J Anim Sci* 2010, 88(5):1610-1618.

Woolliams, J. A., Oldenbroek, K. J. (2017) Genetic diversity issues in animal populations in the genomic era. In: Oldenbroek K (ed) *Genomic management of animal genetic diversity*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 13-47.

Wu, G. S., Yao, Y. G., Qu, K. X., Ding, Z. L., Li, H., et al. (2007) Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biol* 8: R245.

Zenger, K. R., Khatkar, M. S., Cavanagh J. A. L., Hawken, R. J., Raadsma, H. W. Genome-wide genetic diversity of Holstein Friesian cattle reveals new insights into Australian and global population variability, including impact of selection. **Animal Genetics**, v. 38, p. 7-14, 2006.

Zhu, M., Zhao, S. Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 7, p. 420-427, 2007.

CAPÍTULO 2
DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE RAÇAS
EQUINAS LOCALMENTE ADAPTADAS BRASILEIRAS POR MEIO DE
FERRAMENTAS GENÔMICAS

RESUMO

Os animais introduzidos inicialmente no Brasil foram submetidos as mais variadas pressões seletivas durante os cinco séculos após a sua chegada, conferindo a eles características adaptativas específicas aos mais extremos biomas do país. O uso de marcadores SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único) permite gerar uma grande quantidade de informações genotípicas em pouco tempo e com alta taxa de repetibilidade e confiabilidade. Amostras de sangue de 285 cavalos de 8 raças naturalizadas (Baixadeira, Lavradeira, Marajoara, Puruca, Campeira, Crioula, Mangalarga Marchador e Pantaneira) e 2 exóticas coletadas no Brasil (Árabe e Puro Sangue Inglês) foram analisadas, visando a identificação da existência e caracterização da estrutura e composição genética dentro e entre raças localmente adaptadas de equinos e seus possíveis fundadores. A estes animais, foram agregados dados genotípicos de 165 amostras de 7 raças exóticas, com o objetivo de correlacionar e comparar com as raças naturalizadas brasileiras. Utilizando dados genotípicos do *GGP Equine SNP70 BeadChip* (*Geneseek-Neogen*, 65.157 SNPs), foram estimados os parâmetros básicos de diversidade e distância genética (F_{ST} e N_{ei}) e realizadas as análises de componentes principais (PCA), variância molecular (AMOVA) e estrutura populacional (ADMIXTURE). Os resultados mostram que as raças Crioula, Pantaneira, Mangalarga Marchador e Campeira possuem uma base genética distinta das demais (e entre si). Já as raças Lavradeira, Baixadeira, Puruca e Marajoara apresentaram uma base genética em comum, dificultando o processo de diferenciação delas. As análises de PCA refletem uma divisão geográfica das raças brasileiras de equinos, onde animais das regiões Norte e Nordeste (Lavradeiro, Marajoara, Puruca e Baixadeiro) se agruparam, enquanto raças das regiões Sudeste e Sul (Crioulo, Campeiro e Mangalarga Marchador) se encontraram mais próximas umas das outras. Já o Pantaneiro, pertencente ao Pantanal Matogrossense na região Centro-Oeste do país, apresentou-se separado dos demais. As raças comerciais (Árabe e Puro Sangue Inglês) criadas no Brasil apresentaram níveis de variabilidade genética similares a algumas naturalizadas brasileiras, porém são diferenciadas geneticamente em relação a elas. No geral, as raças naturalizadas brasileiras apresentaram alta variabilidade genética e baixa endogamia. Os resultados encontrados podem, potencialmente, ser utilizados na otimização de programas de conservação dessas raças, além de auxiliar a traçar uma estratégia de implementação das mesmas em programas de melhoramento de raças comerciais de equinos mundialmente difundidas.

Palavras-chave: Recursos genéticos animais; Genética de conservação; *Equus caballus*; Marcadores moleculares; Raças naturalizadas; SNPs; Caracterização genética; Diversidade genética

ABSTRACT

Animals first introduced in Brazil were submitted to a variety of selective pressures during the five centuries after their introduction, granting them adaptive traits specific to the most hostile environments found in the country. With the use of SNPs markers (Single Nucleotide Polymorphism), it is possible to generate a great amount of genotypic information in a short period of time and with a high rate of repeatability and reliability. Blood samples from 285 horses belonging to 8 naturalized breeds (Baixadeiro, Lavradeiro, Marajoara, Puruca, Campeiro, Crioulo, Mangalarga Marchador and Pantaneiro) and 2 exotic breeds sampled in Brazil (Arabian and English Thoroughbred) were analyzed, aiming to identify the existence and characterize the genetic structure and composition within and between locally adapted horse breeds and their possible founders. Genotypic data from 165 animals belonging to 7 exotic breeds was used aiming to compare and correlate to Brazilian naturalized horse breeds. Data from the *GGP Equine BeadChip* (Geneseek-Neogen, 65.157 SNPs) was used to assess basic diversity parameters, genetic distance (F_{ST} and Nei), Principal Component Analysis (PCA), Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and population structure (ADMIXTURE) for the sampled animals. Results show that the Crioulo, Pantaneiro, Mangalarga Marchador and Campeiro breeds possess a distinct genetic basis from the others and each other. The Lavradeiro, Baixadeiro, Puruca and Marajoara breeds were shown to have a shared genetic basis, which hinders the differentiation process between them. The PCA results reflect a geographic division of the Brazilian equine breeds, where individuals from the North and Northeast regions (Lavradeiro, Marajora, Puruca and Baixadeiro) grouped together, while animals from the South and Southeast regions (Crioulo, Campeiro and Mangalarga Marchador) were closer to each other. The Pantaneiro breed, originated from Pantanal Matogrossense in the Midwest region, placed separately from the others. Both commercial breeds (Arabian and English Thoroughbred) sampled in Brazil presented a similar genetic variability when compared to the naturalized breeds, being, however, genetically differentiated from them. Overall, high values of genetic variability and low levels of inbreeding were observed for the Brazilian naturalized breeds. The results found in this study may, potentially, help in optimizing conservation programs for these breeds, as well as in strategizing their implementation in breeding programs for other commercial and worldwide spread horse breeds.

Key words: Animal genetic resources; Conservation genetics; *Equus caballus*; Molecular markers; Naturalized breeds; SNPs; Genetic characterization; Genetic diversity

1. INTRODUÇÃO

As raças naturalizadas brasileiras apresentam adaptações à uma gama de ambientes naturais, como terrenos montanhosos localizados na região Sul do país (Campeira – Santa Catarina), clima tropical da região Norte (Lavradeira – Roraima, Baixadeiro – Maranhão), Pantanal na região Centro-Oeste (Pantaneira – Pantanal Matogrossense) e região Sudeste (Mangalarga Marchador – Minas Gerais) (Mariante, 2009). Essas raças possuem um importante papel e a maioria delas é muito utilizada, principalmente, no manejo de rebanhos bovinos em pastagens nativas (McManus *et al.*, 2005; McManus *et al.*, 2008), sendo que mudanças em sua composição genética podem acarretar implicações em sua utilidade no sistema produtivo do país. As populações dessas raças sofreram redução resultante do cruzamento com raças exóticas como Anglo Árabe, Árabe e Puro Sangue Inglês na tentativa de melhorar sua conformação e aumentar sua estatura, juntamente com o aumento de ocorrência de doenças como tripanossomíases e Anemia Infecciosa Equina (Beck, 1985). A composição genética das raças de cavalos introduzidos inicialmente no país é, majoritariamente, de origem hispânica, sendo que animais de origem árabe, berbere, inglesa e turca também foram trazidos (Santos *et al.*, 1992).

A diversidade genética entre e dentro de rebanhos possui importância para programas de melhoramento e conservação, uma vez que é utilizada como forma de selecionar animais que servirão de genitores das próximas gerações em populações que se encontram sob pressão de seleção artificial (Woolliams & Oldenbroek 2017). Com isso em mente, estimativas de parâmetros que tornem possível o acesso a informações de diversidade

genética de raças naturalizadas é essencial no auxílio de atividades como programas de preservação e manejo.

A produção de equinos é de grande importância para a economia do Brasil, e as raças de cavalos naturalizadas brasileiras compõem grande parte desse setor, exercendo papel imprescindível nas regiões em que ocorrem. Esse setor movimentava mais de R\$ 16 bilhões ao ano, além de ser responsável pela geração de cerca de 3 milhões de empregos (MAPA, 2016). O uso de equinos no manejo de rebanhos, especialmente de bovinos, tem crescido e se destacado cada vez mais no setor, refletindo em uma movimentação de capital e gerando cerca de 71% dos empregos diretos existentes no setor de agronegócio equino do Brasil (MAPA, 2016).

A conservação das raças naturalizadas brasileiras e a manutenção de alelos raros encontrados em seus genes, provenientes de cinco séculos de pressões de seleção natural em condições ambientais, é justificável devido à importância que elas possuem em suas respectivas regiões (Silva *et al.*, 2012). Diversas dessas raças possuem Associações de Criadores¹. Apesar disso, algumas ainda não obtiveram sucesso em ter uma associação estabelecida, sendo essa etapa necessária para que uma raça seja oficialmente reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como raça localmente adaptada (Braga, 2019). Dito isso, a caracterização genética é uma ferramenta importante na orientação de estratégias de preservação desses grupos genéticos, auxiliando no estabelecimento de prioridades de conservação de acordo com a sua variabilidade genética e atributos (como resistência a doenças, genes únicos, adaptação ao ambiente e mudanças climáticas), com o objetivo de manter a diversidade presente nas mesmas.

Estudos a respeito de dados morfológicos (McManus *et al.*, 2005; McManus *et al.*, 2008; Miserani *et al.*, 2002; Meira *et al.*, 2013; Rezende *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2016; Santos & Juliano, 2013; Gonçalves *et al.*, 2012), com marcadores RAPD (Egito *et al.*, 2007), caracterização genética com marcadores microssatélites (Silva *et al.*, 2012; DeAssis, *et al.*, 2009; Pires *et al.*, 2014; Sereno *et al.*, 2008; Costa, 2007) e informações de *pedigree* (Maciel *et al.*, 2014) já foram realizados para essas raças. Diversos trabalhos foram realizados com o uso de marcadores moleculares SNPs para raças mundialmente difundidas, entre as quais: Quarto de Milha (Marchiori, 2018), Árabe (Cosgrove *et al.*, 2020) e Puro Sangue Inglês (Corbin *et al.*, 2010). Se encontram disponíveis, atualmente, poucos estudos a respeito da

¹ Tais como Árabe (www.abcca.com.br), Crioulo (www.cavalocrioulo.org.br), Campeiro (www.cavalocampeiro.com), Mangalarga Marchador (www.abccmm.org.br), Pantaneiro (www.abccp.com.br), Puro Sangue Inglês (www.abcpcc.com.br), Puruca e Marajoara (www.cbh.org.br)

caracterização genética e estrutura das raças naturalizadas brasileiras utilizando marcadores moleculares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), como Bizarria dos Santos *et al.* (2020), com a raça Mangalarga Marchador, e o resumo de congresso de Ianella *et al.* (2018), com algumas raças.

Até então, foram elaborados três *beadchips* para a espécie equina, sendo dois deles de média (*EquineSNP50 Beadchip*, 54.602 SNPs, mais tarde incorporado no novo *GGP Equine70K Beadchip*, 65.157 SNPs - Illumina Inc., San Diego, CA, United States - <https://www.illumina.com/>) e um de alta (*Affymetrix Axiom 670k Equine Genotyping Array*, 670.796 SNPs, com base em 24 raças de cavalo - Schaefer *et al.*, 2017; Neogen Genomics, Lincoln, NE, United States - <https://genomics.neogen.com/en/affymetrix-axiom-equine-hd-array>) densidades. Devido à eventual incorporação dos marcadores presentes no *EquineSNP50 Beadchip* ao *Equine70K Beadchip*, o primeiro não se encontra mais comercialmente disponível. Desde sua elaboração, esses painéis vêm sendo utilizados em diversos estudos. Dentre eles, destacam-se trabalhos envolvendo características relacionadas à aptidão física e desempenho em modalidades esportivas (Pereira *et al.*, 2017; Meira *et al.*, 2014; Faria, 2016; Hill *et al.*, 2010; Binns *et al.*, 2010; Regatieri *et al.*, 2016; Schröder *et al.*, 2011; Fonseca *et al.*, 2017; Petersen *et al.*, 2013a). Além disso, estudos relacionados à identificação de marcadores, regiões e genes associados a doenças e condições que afetam raças equinas, como a lordose (Cook *et al.*, 2010), nanismo (Eberth *et al.*, 2009), osteocondrose (Teyssèdre *et al.*, 2012), síndrome do potro lavanda (Brooks *et al.*, 2010) e neuropatia laringal recorrente (Dupuis *et al.*, 2011), também vêm sendo realizados.

O objetivo desse capítulo foi a identificação de estrutura e caracterização genética de algumas raças localmente adaptadas de equinos e seus possíveis fundadores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

2.1.1 Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA)

Amostras de sangue de 285 cavalos de 8 raças foram coletadas em diferentes regiões do Brasil – Norte (Baixadeira, N = 20; Lavradeira, N = 20; Marajoara, N = 20; Puruca, N = 19), Sul (Campeira, N = 20; Crioula, N = 11), Sudeste (Mangalarga Marchador, N = 20) e Centro-Oeste (Pantaneira, N = 117). Duas raças exóticas coletadas no Brasil foram utilizadas para comparação com as brasileiras citadas acima (Puro Sangue Inglês, N = 20; Árabe, N = 18). As amostras de sangue foram coletadas de núcleos de conservação da Embrapa ou criadores privados/associações de criadores (Tabela 1) e se encontram armazenadas no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA).

Foi feita uma análise de grau de parentesco, utilizando essas 285 amostras e 34.296 SNPs. A partir disso, foi construída uma matriz de relacionamento genômico, sendo eliminada uma amostra de cada par que apresentou grau de parentesco maior do que o estabelecido como limite ($> 0,8$). Foram incluídas três amostras repetidas como forma de controle, sendo que elas apresentaram valores de grau de identidade acima de 1 entre suas respectivas repetições, demonstrando acurácia na análise. As repetições foram retiradas antes de dar continuidade às análises. A eliminação de amostras com alto grau de parentesco em análises de programas de conservação é comumente realizada, pois indivíduos muito

semelhantes geneticamente são redundantes, já que ambos carregam praticamente as mesmas informações genéticas, sendo necessário apenas um deles. Ao eliminar amostras dessa natureza, reduz-se a média dos valores parentesco entre os animais, minimizando, assim, a taxa de alelos duplicados que descendem de ancestrais em comum entre eles (Eding & Meuwissen, 2001).

2.1.2 Banco de Dados Público (Petersen *et al.*, 2013b)

Informações de outros 165 animais pertencentes a 7 raças (Andaluz, N = 17; Mangalarga Paulista, N = 14; Passo Fino Porto Rico, N = 20; Passo Peruano, N = 21; Morgan, N = 43; *Saddlebred* Americano, N = 25; *American Trotter*, N = 25) de um estudo anterior (Petersen *et al.*, 2013b) foram utilizados para elucidar questões de origem e comparar a variabilidade genética entre raças para as quais a ferramenta foi desenvolvida, elevando o número total de animais utilizados no estudo para 450 (Tabela 1).

Tabela 1. Raças de equinos utilizadas no estudo. Local de coleta (Banco Brasileiro de Germoplasma Animal – BBGA) e país de origem (banco de dados público – Petersen et al., 2013b), número de amostras por local (N) e *beadchip* utilizado para genotipagem indicados para cada raça.

Raça	Sigla	Local/País	N	Total	Beadchip
Andaluz	EAND	Espanha	17	17	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)
American Trotter	EAT	EUA	25	25	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)
Árabe	EAR	Fazenda Saia Velha - Valparaíso, GO	2	18	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Haras Double C - Brasília, DF	5		
		Haras Natan - Anápolis, DF	8		
		São Carlos, SP	3		
Baixadeiro	EBA	UEMA - Universidade Estadual do Maranhão, MA	20	20	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
Crioulo	ECRI	Fazenda Paulo Coelho	11	11	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
Campeiro	ECA	Curitibanos, SC	14	20	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Ponte Alta, SC	2		
		Campos Novos, SC	4		
Lavradeiro	ELV	Poesia, RR	14	20	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Apolinario, RR	6		

Marajoara	EMAR	Tucumanduba - PA	1	20	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Camburupi - PA	1		
		Salvaterra - PA	2		
		Soure - PA	16		
Mangalarga Marchador	EMM	Haras Lumiar - Brasília/DF	16	20	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Haras Cavaru - Retã/Brasília-DF	4		
Mangalarga Paulista	EMP	Brasil	14	14	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)
Morgan	EMOR	EUA	43	43	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)
Pantaneiro	EPAN	CPAP - Nhumirim, MS	59	117	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Fazenda Promissão - Poconé, MT	19		
		Campo Grande, MS	6		
		Barra do Bugres, MT	13		
		Cuiabá, MT	20		
Passo Peruano	EPP	Peru	21	21	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)
Passo Fino (Porto Rico)	EPF	Porto Rico e Colômbia	20	20	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)
Puro Sangue Inglês	EPSI	Jockey – Brasília/DF	18	20	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Centro de Equoterapia - Brasília/DF	2		

Puruca	EPUR	Camburupi - PA	4	19	GGP EquineSNP70K BeadChip (Geneseek-Neogen)
		Ramal Jabuti - Cachoeira do Arari	10		
		Salvaterra - PA	1		
		Soure - PA	4		
Saddlebred Americano	ESA	EUA	25	25	Equine SNP50 Beadchip (Illumina)

2.2 Extração e quantificação de DNA

As amostras de sangue foram coletadas utilizando tubos *vacutainer* de 10ml contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – anticoagulante) e refrigerados até o processamento. O processamento das amostras visou separar os componentes do sangue para isolamento dos leucócitos e seguiu os seguintes passos: (1) centrifugação a 3.000 RPM por 10 minutos; (2) Remoção da camada de leucócitos com o uso de uma pipeta de Pasteur e transferência para tubos *ependorf*; (3) Extração do DNA genômico desses leucócitos segundo o protocolo modificado (Anexo 1) de purificação de DNA da *Puregene* (*Gentra Puregene Blood Kit*[®]).

A quantificação do DNA foi feita de duas formas. Primeiro, através do uso de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando o padrão de 200 ng/ul, 100 ng/ul e 50 ng/ul para comparação. As amostras também foram submetidas à análise em espectrofotômetro *NanoDrop Thermo Scientific* (*NanoDropTM 8000. Thermo Fisher Scientific*, 2010. <https://www.thermofisher.com/>). O aparelho utiliza a quantidade de luz absorvida pelos ácidos nucleicos no λ de 260nm do DNA em solução, sendo que a absorção nesse comprimento de onda está diretamente relacionada com a concentração do DNA, ou seja, quanto maior a absorção, maior a concentração na solução em questão. Foi também estimada a pureza do material genético em questão, dada pela razão da quantidade de luz absorvida no λ de 260nm pela quantidade de luz absorvida por proteínas no λ de 280nm, sendo consideradas com bom teor de pureza as amostras que apresentaram valores dessa proporção (260/280) entre 1,8 e 2,0, indicando uma extração eficaz (Desjardins & Conklin, 2010).

Após os processos de extração e quantificação, o material foi armazenado a uma temperatura de -20°C até o momento de sua diluição e envio para genotipagem. O DNA restante foi incluído no banco de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, cadastrados adequadamente no portal Alelo Animal (http://aleloanimal.cenargen.embrapa.br/database_collaboration_page_dev).

2.3 Genotipagem

Alíquotas de cada amostra, com aproximadamente 300ng de DNA, foram desidratadas à temperatura ambiente e encaminhadas em placas de 96 poços para serem genotipadas.

Os animais do grupo de dados do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) - (8 raças nativas + 2 raças exóticas) foram enviados para *Neogen® Genomics* (<https://genomics.neogen.com/>) para genotipagem. Foi utilizado o *GGP Equine 70K*, com 65.157 SNPs distribuídos pelo genoma equino, para a genotipagem desses animais.

Os 165 animais provenientes de banco de dados público (Petersen *et al.*, 2013b) foram genotipados com o *Equine SNP50 Beadchip* (Illumina – 54.602 SNPs).

Como os dois bancos de dados foram genotipados com *beadchips* diferentes, foi realizada, para inclusão dos dados do trabalho de Petersen *et al.* (2013b), a fusão de ambos previamente à aplicação dos filtros, pois o número final de marcadores em comum entre os painéis difere do número original de ambos separadamente.

O controle de qualidade foi realizado com o uso do *software SNP & Variation Suite v8* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com), removendo (a) amostras que apresentaram mais de 10% de dados faltantes (*call rate sample* < 0,90); (b) marcadores relacionados a cromossomos sexuais; (c) marcadores que apresentaram mais de 1% de dados faltantes (*call rate markers* < 0,99); (d) marcadores que apresentaram frequência alélica mínima inferior a 5% (MAF < 0,05) ao longo de todas as raças e (e) marcadores que se encontraram fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg - EHW ($p < 0,001$). Além disso, foi aplicado um filtro de DL, visando remover (f) marcadores com um valor de $r^2 > 0,5$ em uma janela de intervalo de 50 SNPs. Com o objetivo de remover (g) animais com alto nível de relacionamento entre si, foi calculada uma matriz genômica de parentesco. Devido ao histórico de algumas raças indicarem altos níveis de cruzamentos direcionados (como por exemplo as raças Puro Sangue Inglês e Árabe, raças comerciais altamente selecionadas para corridas) e de um número amostral desigual entre as raças utilizadas no estudo, um animal de cada par com valores de parentesco genético de 80% (0,8) ou mais foi removido.

O número de marcadores SNPs utilizados nas análises para cada grupo estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Número de SNPs utilizados nas análises para cada grupo de equinos avaliado.

Grupos	Número de SNPs por Análise					
	Parâmetros Básicos	F _{ST}	PCA	AMOVA	Nei	ADMIXTURE
8 raças brasileiras	-	-	33.147	33.147	-	33.422
8 brasileiras + 2 comerciais	61.746	-	-	-	-	-
8 brasileiras + 4 iberoamericanas	-	-	-	19.656	-	-
8 brasileiras + 2 comerciais + 4 iberoamericanas + 3 americanas	-	19.656	19.656	-	19.656	19.656

F_{ST} – Distância Genética; PCA – Análise de Componentes Principais; AMOVA – Análise de Variância Molecular; Nei – Distância Genética de Nei

2.4 Análise de Diversidade Genética

Parâmetros básicos de diversidade genética foram estimados para os animais do grupo Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA - 8 raças nativas + 2 raças exóticas), tais como: média de *call rate*; Heterozigosidade Observada (Weir & Cockerham, 1983) e Esperada (Nei, 1978) - H_O e H_E respectivamente; média do número de alelos e número de marcadores polimórficos. Os mesmos foram calculados com o auxílio dos softwares *SNP & Variation Suite v8* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com) e Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

A distância entre os grupamentos genéticos foi avaliada através de uma matriz de F_{ST} par a par ($p < 0.05$ e 2000 permutações), com o uso do software Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Utilizando o mesmo software, construiu-se uma matriz com as distâncias par a par de Nei (Nei, 1978). A matriz gerada foi utilizada para construção de um dendrograma de distância genética não fixado baseado na junção de vizinhos (*Neighbour-Joining Based Unrooted Tree* - Saitou & Nei, 1987) utilizando o programa PHYLIP v.3.6 (Felsenstein, 2005).

A distância e a relação entre as raças de equinos também foi avaliada por meio de Análise de Componentes Principais (PCA), a qual utiliza o método EIGENSTRAT (Price *et al.*, 2006). Os cálculos foram feitos com auxílio do software *SNP & Variation Suite v8* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com). Foram construídos gráficos 3D com o uso do programa SigmaPlot13 (<https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/>) para ilustrar os resultados obtidos na análise de PCA, sendo que cada eixo do gráfico representa a porcentagem da variação genética explicada.

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada por meio do software Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer 2010) em duas etapas para as raças naturalizadas brasileiras: I) 10 raças, 1 grupo (oito raças nativas, Árabe e Puro Sangue Inglês), com três níveis; II) 10 raças, 2 grupos (um com as oito raças nativas e o outro com as raças Árabe e Puro Sangue Inglês), com adição de um quarto nível (variação entre grupos) aos três níveis anteriores. Posteriormente, foram feitas duas outras análises utilizando: III) as oito raças nativas brasileiras somadas a outras quatro raças iberoamericanas (Andaluz, Mangalarga Paulista, Passo Fino – Porto Rico e Passo Peruano) do trabalho de Petersen *et al.* (2013b), em

um único grupo e IV) 12 raças, 2 grupos (um com as oito brasileiras naturalizadas e outro com as quatro iberoamericanas). Todas as AMOVA foram feitas com 1000 permutações e o número de marcadores utilizados em cada uma estão descritos na Tabela 2.

2.5 Análise de Estrutura Genética de Populações

As análises de estruturação populacional e miscigenação das raças foram realizadas com o uso do ADMIXTURE 1.2.2 (Alexander *et al.*, 2009), que estima a ancestralidade dos indivíduos utilizando um modelo de máxima verossimilhança. Nessa análise, a caracterização da estrutura genética dos indivíduos foi feita a partir das frequências alélicas juntamente com a ancestralidade estimada e partindo de um número hipotético de *clusters* (K), sendo, então, calculada a probabilidade de cada indivíduo (ou a proporção genômica de cada um deles) ser designado a determinado *cluster*. Essa análise foi dividida em níveis, sendo eles: 1) apenas as 8 raças naturalizadas brasileiras; 2) 8 raças naturalizadas brasileiras + Árabe e Puro Sangue Inglês + 7 raças ibero-americanas do trabalho de Petersen *et al.* (2013b). Foram aplicadas 10 iterações para cada K, cada uma com seu valor de erro de validação cruzada, e um mínimo de 4 Ks a mais que o valor elegido para K em cada nível. As projeções gráficas foram feitas com o uso da ferramenta *online StructureSelector* (Li & Liu, 2018). Para selecionar o melhor valor de K a ser utilizado nas análises, realizou-se um teste de validação cruzada. Esse teste foi feito através da construção de um gráfico de dispersão utilizando o valor médio dos erros de validação cruzada das iterações rodadas em cada K dentro de cada nível, sendo o K mais indicado aquele que apresentou o menor valor de erro de validação cruzada (menor valor da média das 10 iterações para aquele nível), assumindo-se pelo menos um ancestral em comum em cada K (Alexander *et al.*, 2009). O número de marcadores utilizados em cada análise de ADMIXTURE está descrito na Tabela 2.

3. RESULTADOS

3.1 Genotipagem por SNPs e Amostragem

Com o primeiro filtro aplicado, amostras com *call rate* abaixo de 90% ($\text{call rate} < 0,9$) foram eliminadas. Duas amostras foram retiradas com esse filtro, sendo elas das raças Baixadeira e Marajoara. Isso provavelmente ocorreu devido à baixa concentração e/ou qualidade de DNA dessas amostras.

A matriz de relacionamento genômico revelou duas amostras diferentes da raça Pantaneira apresentando grau de parentesco maior do que o estabelecido como limite ($> 0,8$), sendo eles de 0,96 e 0,94. Foram mantidas as amostras com *call rate* mais elevado.

Outras duas amostras, da raça Crioula, foram retiradas das análises posteriores logo após a realização da análise de Componentes Principais (PCA). Essa decisão foi tomada visto que as mesmas se encontraram distantes do restante da amostragem da raça, agrupando-se com animais Mangalarga Marchador.

Ao final de todos os controles de qualidade relativos à amostragem, o número amostral foi reduzido para 279 animais.

3.2 Diversidade e Estrutura Genética de Populações

3.2.1 Parâmetros Básicos de Diversidade

Com a remoção de marcadores ainda não mapeados no genoma equino ou mapeados em cromossomos sexuais, o número total caiu de 65.157 para 61.746 SPNs. Com esses marcadores, foram calculados parâmetros genéticos básicos para cada raça individualmente e os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros genéticos básicos por raça equina genotipada com o *GGP Equine 70K* neste trabalho, com um total de 61.746 SNPs.

Raça	N	Nº locos Polimórficos	Call Rate	Nº Alelos	H _o	H _e
Árabe ^C	18	49.660	0,98	1,81	0,338	0,338
Baixadeira ⁿ	19	51.714	0,98	1,84	0,321	0,323
Crioula ⁿ	9	37.611	0,98	1,60	0,449	0,382
Campeira ⁿ	20	52.327	0,98	1,85	0,324	0,328
Lavradeira ⁿ	20	51.277	0,98	1,84	0,319	0,321
Marajoara ⁿ	19	51.425	0,98	1,85	0,324	0,323
Mangalarga ⁿ	20	51.910	0,98	1,84	0,318	0,321
Pantaneira ⁿ	115	56.903	0,98	1,93	0,301	0,301
Puro Sangue Inglês ^C	20	48.430	0,98	1,83	0,348	0,351
Puruca ⁿ	19	50.368	0,98	1,85	0,322	0,323

^C – Raças Comerciais; ⁿ – Raças Naturalizadas; N – Número Amostral; Nº Alelos – Número médio de Alelos; H_o – Heteroziguidade Média Observada; H_e – Heteroziguidade Média Esperada.

Não foi observada uma diferença muito grande em termos de polimorfismo entre as raças, sendo que, em alguns casos, as naturalizadas chegaram até a apresentar um número maior de locos polimórficos em relação às comerciais. Dentre as raças naturalizadas, o menor número de locos polimórficos observado foi na raça Crioula (37.611) e o maior na raça Pantaneira (56.903). Entretanto, a raça Crioula apresentou um número de marcadores polimórficos consideravelmente reduzido quando comparada às demais raças, totalizando aproximadamente metade do total de locos analisados.

A maior heteroziguidade (H_o e H_E) foi observada na raça Crioula (0,449 e 0,382, respectivamente). A raça Pantaneira apresentou os menores valores para esses dois parâmetros (0,301). As demais raças naturalizadas brasileiras mostraram valores similares de heteroziguidade, tanto a observada quanto a esperada, variando entre 0,318 (Mangalarga Marchador) e 0,324 (Campeira e Marajoara) e entre 0,321 (Lavradeira e Mangalarga Marchador) e 0,328 (Campeira), respectivamente. Os resultados para as raças comerciais Puro Sangue Inglês e Árabe foram, com exceção da Crioula, os mais elevados (H_o = 0,348 e 0,338; H_E = 0,351 e 0,338, respectivamente).

3.2.2 Distância Genética (Matriz de F_{ST} par a par)

Os valores de distância genética entre as raças foram significativos (Tabela 4). A raça Crioula apresentou resultados elevados em relação às demais raças naturalizadas brasileiras analisadas nesse estudo, variando de 9,8% (com a Pantaneira) a 12,1% (com a Lavradeira). Já a raça Pantaneira, por sua vez, apresentou valores baixos de F_{ST} em relação às demais, variando de 2,6% (com o Baixadeiro) a 9,8% (com o Crioulo).

A Tabela 4 permite observar a existência de proximidade genética entre as raças naturalizadas brasileiras, com exceção da Crioula, que apresentou valores elevados com às demais. Isso torna-se evidente ao se analisar a distância genética entre raças como Baixadeira, Marajoara e Puruca, que apresentaram os resultados mais baixos, ficando em torno de 1,5%. As comparações de F_{ST} entre as demais raças brasileiras variaram de aproximadamente 3 a 5%.

O Andaluz, Morgan, Passo Peruano e Passo Fino Porto Riquenho apresentaram valores de F_{ST} relativamente baixos entre si e com as raças brasileiras Pantaneira, Marajoara, Baixadeira, Puruca, Lavradeira, Mangalarga Marchador e Campeira. Já os valores de F_{ST} para as raças comerciais (Puro Sangue Inglês e Árabe) e as demais norte americanas (*American Trotter* e *Saddlebred* Americano) foram consideravelmente elevados, tanto entre si quanto em relação às brasileiras e outras raças exóticas, confirmando o distanciamento genético delas. O Mangalarga Paulista se mostrou distante das demais raças brasileiras, com valores de F_{ST} variando de cerca de 10% (com o Mangalarga Marchador) a 20% (com o Crioulo), resultados mais elevados que os observados em algumas raças comerciais.

Tabela 4. Matriz par a par de F_{ST} estimada com 19.656 SNPs em 17 raças de equinos, calculada utilizando 2.000 permutações e $p < 0.05$.

Raças	Andaluz	Morgan	Árabe	Baixadeira	Campeira	Crioula	Puro Sangue Inglês	Lavradeira	Mangalarga Marchador	Mangalarga Paulista	Marajoara	Pantaneira	Passo Fino (Porto Rico)	Passo Peruano	Puruca	Saddlebred Americano
Morgan	0,070															
Árabe	0,091	0,082														
Baixadeira	0,058	0,055	0,082													
Campeira	0,066	0,060	0,083	0,049												
Crioula	0,131	0,120	0,148	0,115	0,107											
Puro Sangue Inglês	0,128	0,107	0,122	0,118	0,103	0,124										
Lavradeira	0,066	0,061	0,091	0,032	0,055	0,121	0,124									
Mangalarga Marchador	0,064	0,060	0,085	0,036	0,041	0,112	0,121	0,047								
Mangalarga Paulista	0,146	0,136	0,165	0,123	0,120	0,204	0,187	0,130	0,097							
Marajoara	0,057	0,053	0,081	0,014	0,046	0,112	0,116	0,029	0,034	0,117						
Pantaneira	0,053	0,049	0,074	0,026	0,036	0,098	0,111	0,039	0,030	0,106	0,026					
Passo Fino (Porto Rico)	0,092	0,084	0,117	0,076	0,082	0,149	0,152	0,081	0,080	0,164	0,074	0,067				
Passo Peruano	0,062	0,058	0,087	0,045	0,053	0,115	0,124	0,051	0,048	0,133	0,044	0,039	0,075			
Puruca	0,058	0,054	0,078	0,013	0,048	0,115	0,115	0,032	0,036	0,120	0,011	0,029	0,076	0,047		
Saddlebred Americano	0,093	0,063	0,098	0,079	0,080	0,114	0,114	0,085	0,083	0,159	0,078	0,071	0,111	0,084	0,079	
American Trotter	0,109	0,085	0,116	0,095	0,096	0,122	0,122	0,102	0,097	0,174	0,094	0,086	0,126	0,100	0,094	0,102

*Todas as estimativas par a par foram significativas ($p < 0,05$)

3.2.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA entre as raças naturalizadas apresentou os dois primeiros componentes explicando apenas 5,41% da variação presente e o terceiro componente explicando 1,88% (Figura 1). Foi possível observar o agrupamento das raças naturalizadas brasileiras de acordo com a divisão geográfica: raças do Norte/Nordeste (Baixadeira, Marajoara, Puruca e Lavradeira), do Sul (Crioula, Campeira e Mangalarga Marchador) e Centro-Oeste (Pantaneira). A raça Pantaneira apresentou alta dispersão, estando distribuída ao longo de praticamente todo o primeiro componente. A raça Crioula se posicionou distante das demais raças naturalizadas brasileiras.

Os três primeiros componentes principais da análise de PCA envolvendo 17 raças de cavalos (Figura 2) apresentaram, respectivamente, 6,33, 3,66 e 3,35% da variação genética existente entre elas. Nessa análise, as 4 raças iberoamericanas (Andaluz, Morgan, Passo Fino Porto Riquenho e Passo Peruano) se posicionaram relativamente próximas entre si e das raças Pantaneira, Baixadeira, Mangalarga Marchador, Marajoara, Puruca, Lavradeira e Campeira.

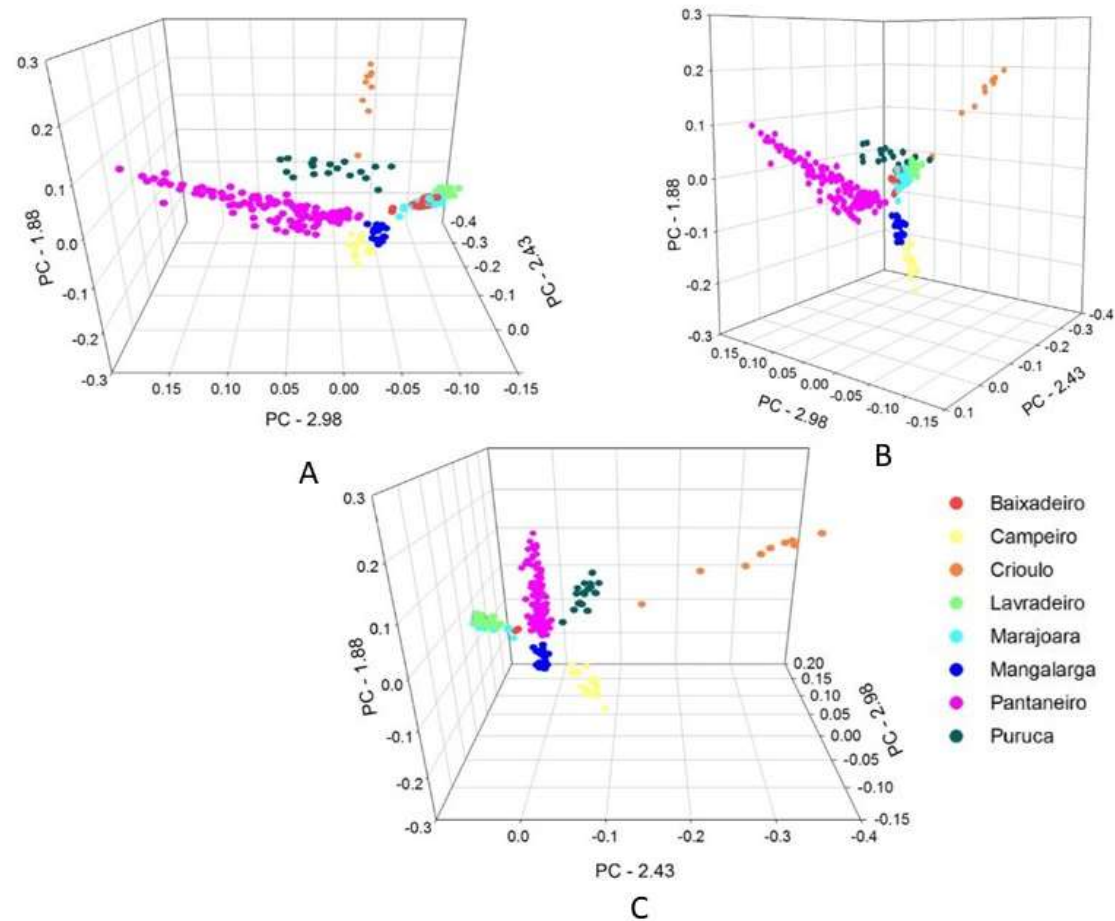


Figura 1. Estrutura de populações de raças de equinos brasileiras naturalizadas revelada por Análise de Componentes Principais (PCA).

O gráfico 3D representa os três primeiros componentes, que explicam 2,98; 2,43 e 1,88% da variação genética entre as populações, respectivamente, utilizando 33.147 SNPs. A) B) e C) diferentes ângulos do gráfico 3D.

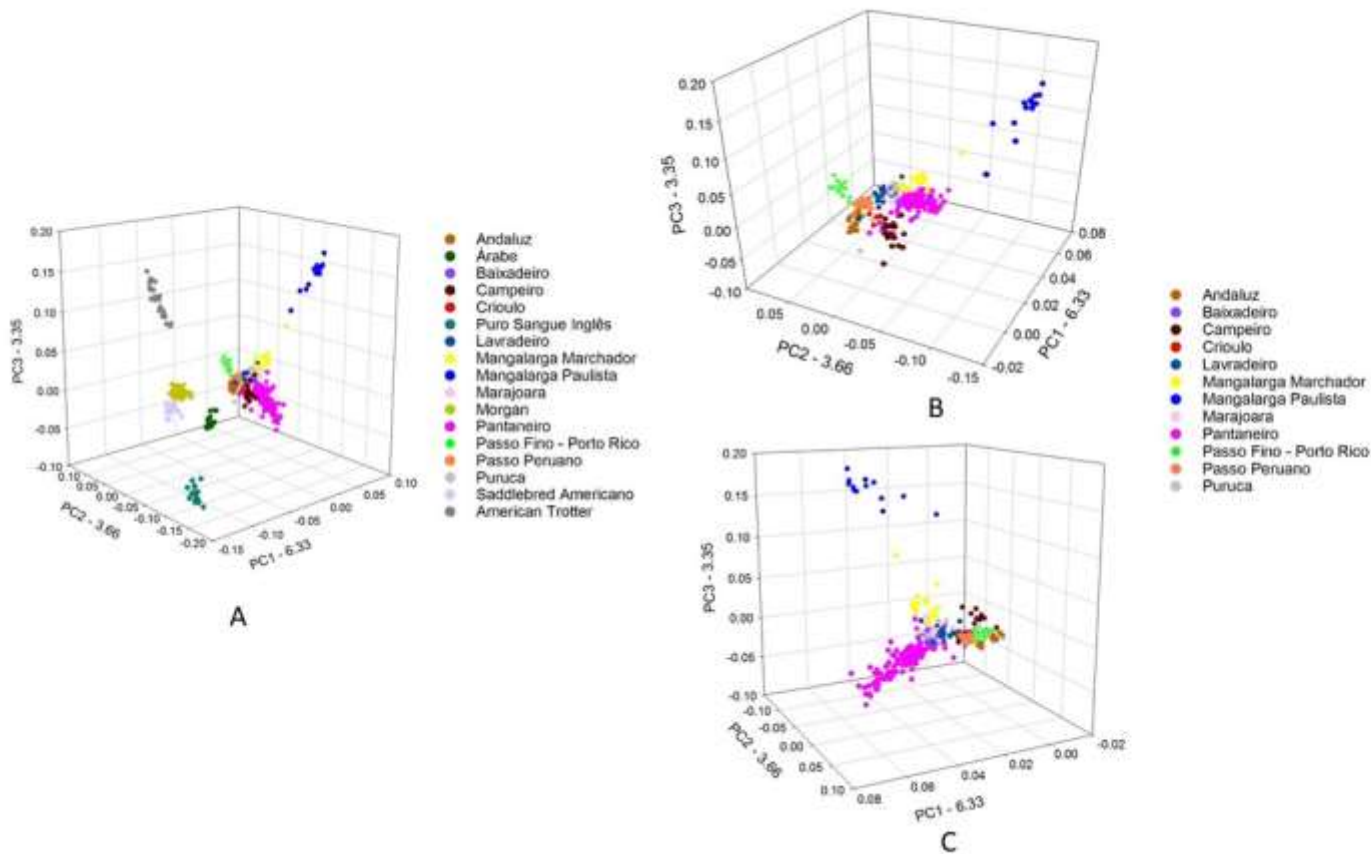


Figura 2. Estrutura de populações envolvendo raças de equinos brasileiras naturalizadas e raças exóticas mundiais revelada por Análise de Componentes Principais. O gráfico 3D representa os três primeiros componentes explicando 6,33; 3,66 e 3,35% da variação genética entre as populações, respectivamente. **A)** PCA 3D contendo 8 raças naturalizadas do Brasil, juntamente com algumas raças escolhidas do trabalho de Petersen *et al.* (2013b). **B e C)** PCA 3D contendo as 8 raças naturalizadas do Brasil, juntamente com um menor número de raças retiradas do trabalho de Petersen *et al.* (2013b).

3.2.4 Análise de Distância Genética de Nei

No dendrograma (Figura 3) construído, utilizando a distância genética de Nei (Tabela 5), pode-se observar a segregação entre as raças comerciais e as brasileiras. Dentre as naturalizadas, é possível observar que as raças do Nordeste se encontram próximas umas às outras, não havendo distinção muito acentuada. Já as do Centro-Oeste, Sul e Sudeste se apresentaram mais bem delimitadas.

A partir da matriz par a par de distâncias de Nei (Tabela 5), foi construído um dendrograma de distância genética baseado na junção de vizinhos (*neighbour-joining based unrooted tree* - Saitou & Nei, 1987 – Figura 3), com o intuito de melhor observar a distribuição das raças com base em suas distâncias genéticas.

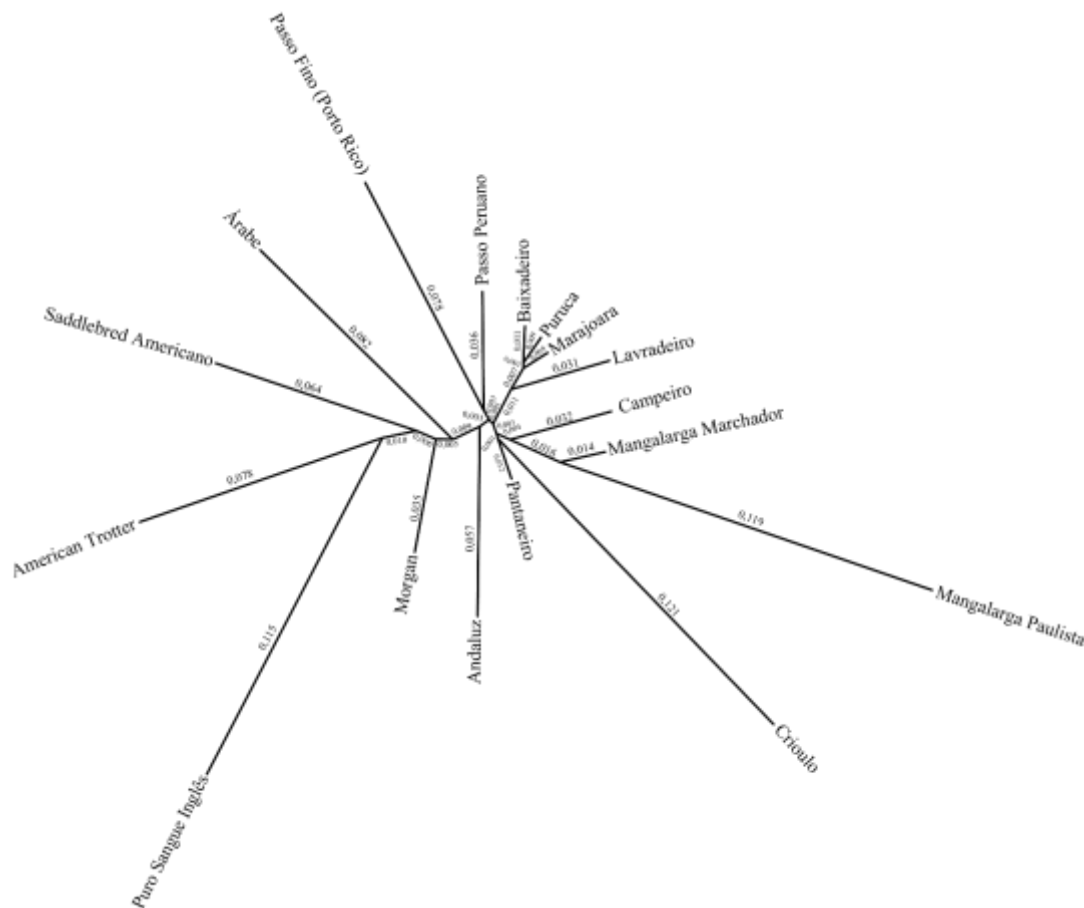


Figura 3. Dendrograma de 17 raças de equinos, construído por UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic mean* – método de grupo de pares não ponderados com média aritmética) a partir da distância genética de Nei (Nei, 1972) e frequências alélicas dentro de cada população. Árvore criada utilizando 19.656 marcadores SNPs. Comprimento de cada ramo indicado na figura.

Tabela 5. Matriz de distância genética de Nei (Nei, 1972) calculada para 17 raças de equinos a partir de 19.656 SNPs.

Raças	Andaluz	Morgan	Árabe	Baixadeira	Campeira	Crioula	Puro Sangue Inglês	Lavradeira	Mangalarga Marchador	Mangalarga Paulista	Marajoara	Pantaneira	Passo Fino (Porto Rico)	Passo Peruano	Puruca	Saddlebred Americano
Morgan	0,111															
Árabe	0,145	0,130														
Baixadeira	0,092	0,088	0,131													
Campeira	0,103	0,095	0,131	0,078												
Crioula	0,187	0,170	0,214	0,163	0,150											
Puro Sangue Inglês	0,208	0,176	0,197	0,195	0,169	0,259										
Lavradeira	0,105	0,097	0,144	0,052	0,086	0,172	0,203									
Mangalarga Marchador	0,101	0,096	0,136	0,058	0,064	0,159	0,198	0,075								
Mangalarga Paulista	0,210	0,191	0,239	0,172	0,166	0,283	0,273	0,184	0,133							
Marajoara	0,089	0,085	0,129	0,023	0,072	0,157	0,191	0,046	0,054	0,162						
Pantaneira	0,082	0,077	0,116	0,041	0,056	0,133	0,184	0,060	0,048	0,142	0,041					
Passo Fino (Porto Rico)	0,140	0,127	0,181	0,116	0,123	0,212	0,239	0,122	0,122	0,235	0,111	0,098				
Passo Peruano	0,098	0,092	0,138	0,072	0,083	0,163	0,203	0,081	0,076	0,185	0,071	0,061	0,114			
Puruca	0,091	0,086	0,124	0,020	0,076	0,162	0,190	0,050	0,058	0,167	0,017	0,045	0,115	0,075		
Saddlebred Americano	0,147	0,100	0,154	0,126	0,126	0,210	0,185	0,134	0,131	0,228	0,123	0,111	0,170	0,133	0,125	
American Trotter	0,170	0,132	0,181	0,149	0,149	0,232	0,193	0,160	0,152	0,251	0,147	0,133	0,192	0,156	0,146	0,158

3.2.5 Análise de Estrutura Genética de Populações (ADMIXTURE)

Para as 8 raças naturalizadas brasileiras, foram estimados os *clusters* de 2 a 10, com 10 repetições para cada (Figura 4). O teste de validação cruzada apresentou o número mais provável de *clusters* igual a seis ($K = 6$). A Figura 4, ainda, apresenta os valores relevantes de K para esse cenário (2, 4, 6, 7 e 10), que demonstram o comportamento das raças ao longo dos *clusters* gerados e a representação gráfica do teste de validação cruzada.

A primeira raça a mostrar certo grau de diferenciação, assim como de miscigenação, foi a Pantaneira, em $K = 2$ (Figura 4). Em $K = 4$, o Crioulo e Campeiro apresentaram uma composição genética distinta dos demais, além de majoritariamente pura. Ambos se mantiveram assim ao longo dos *clusters* analisados, sendo possível observar certa proporção do Campeiro nas demais raças, e especial na Mangalarga Marchador e Pantaneira, ainda em $K = 4$. Em $K = 6$, a miscigenação observada no Pantaneiro se intensificou, com o aparecimento de uma estrutura genética não visualizada nos níveis anteriores e praticamente exclusiva do mesmo. Em $K = 7$, houve a diferenciação do Lavradeiro dos demais, sendo que a composição observada nele foi majoritariamente pura. Até então, o Mangalarga Marchador apresentou miscigenação razoável de raças como Campeira, Marajoara, Puruca e Baixadeira, porém, em $K = 10$, houve o aparecimento de uma estrutura genética não observada anteriormente, que também está presente em certo grau em algumas raças, principalmente no Campeiro. Nesse nível, o Pantaneiro apresentou um grau de miscigenação ainda mais intenso em comparação com os níveis anteriores. As raças Baixadeira, Marajoara e Puruca apresentaram uma estrutura genética parecida no intervalo analisado, sendo praticamente pura, porém com algum grau de miscigenação de outras raças.

Na análise com todas as 17 raças, foram estimados os *clusters* de 2 a 20, com 10 repetições para cada, sendo o melhor valor de K a ser utilizado para esse grupo de dados, segundo o teste de validação cruzada, o $K = 13$ (Figura 5). Os valores relevantes de K para essa análise (3, 4, 5, 7, 10, 11, 13, 14 e 18) demonstram o comportamento das raças ao longo dos *clusters* gerados, assim como uma representação gráfica do teste mencionado acima.

Na Figura 5, a primeira raça a se diferenciar foi a Puro Sangue Inglês ($K = 3$), mantendo-se dessa forma com a adição de mais níveis. Nesse nível, pode-se observar a similaridade genética na base das raças norte americanas Morgan, *American Trotter* e *Saddlebred* Americano antes das mesmas se diferenciarem posteriormente. Em $K = 4$, houve a diferenciação do Mangalarga Paulista das demais e sua composição genética pode ser vista

em algumas outras raças, em especial na Mangalarga Marchador. Em $K = 5$, houve a elucidação da estrutura genética do *American Trotter*, possível de ser vista em certa proporção no Morgan e *Saddlebred* Americano. Em $K = 7$, o Passo Fino Porto Riquenho se diferenciou e as raças Andaluz, Baixadeira, Lavradeira, Marajoara, Puruca, Passo Peruano e até mesmo a Árabe mostraram semelhanças em sua estrutura genética. Ainda nesse nível, é possível observar uma intensificação na miscigenação apresentada na raça Pantaneira, que continua a aumentar à medida com que mais *clusters* foram sendo adicionados. Em $K = 10$, o *Saddlebred* Americano apresentou conformação diferente do Morgan, estando, a partir desse nível, todas as raças norte americanas diferenciadas. Houve ainda, a elucidação da estrutura genética do Crioulo e Árabe. Em $K = 11$, houve a diferenciação do Andaluz dos demais, com certa proporção da composição genética dele presente nas raças Campeira, Mangalarga Marchador, Passo Peruano, Pantaneira, Marajoara e Puruca. Em $K = 13$, melhor número indicado pelo teste de validação cruzada, o Passo Peruano se diferenciou dos demais, sendo possível observar certa contribuição do mesmo nas raças Morgan, Baixadeira, Campeira, Lavradeira, Marajoara, Pantaneira, Passo Fino Porto Riquenho e Puruca. Em $K = 14$, com a elucidação da estrutura genética do Campeiro, foi possível observar que essa contribuição nas raças mencionada acima é proveniente do mesmo. Em $K = 18$, houve a separação do Lavradeiro das raças Baixadeira, Marajoara e Puruca, que por sua vez apresentaram uma estruturação genética similar entre si. Pode-se, ainda, visualizar a presença de uma nova componente genética no Mangalarga Marchador, que está presente também em alguns indivíduos da raça Campeira.

No geral, a estruturação genética observada na PCA entre as raças brasileiras (Figura 4) se mostrou praticamente a mesma da observada na PCA contendo as 17 raças (Figura 5), porém com um número menor de populações hipotéticas. Mesmo com a retirada das raças exóticas, não foi possível observar uma distinção genética entre o Puruca, Baixadeiro e Marajoara. O Campeiro, apesar de majoritariamente puro e diferenciado dos demais no nível mencionado, também está presente na composição do Mangalarga Marchador.

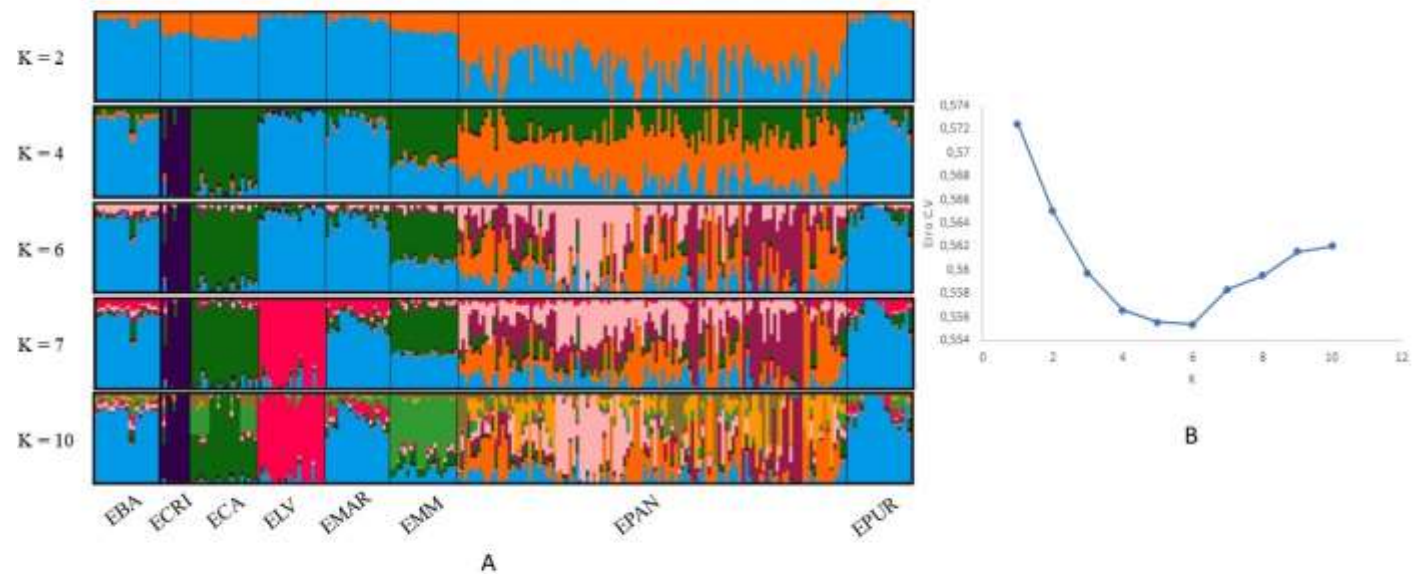


Figura 4. A) Estrutura populacional envolvendo 8 raças de equinos naturalizadas brasileiras estimada pelo programa ADMIXTURE, onde K é o número de clusters ancestrais e variou de 2 a 10, utilizando 33.422 SNPs. EBA – Baixadeira; ECRI – Crioula; ECA – Campeira; ELV – Lavradeira; EMAR – Marajoara; EMM – Mangalarga Marchador; EPAN – Pantaneira; EPUR – Puruca. **B) Gráfico do teste de validação cruzada** calculada pela média dos valores de 10 repetições para cada *cluster* (K), evidenciando que o menor valor encontrado foi para K = 6.

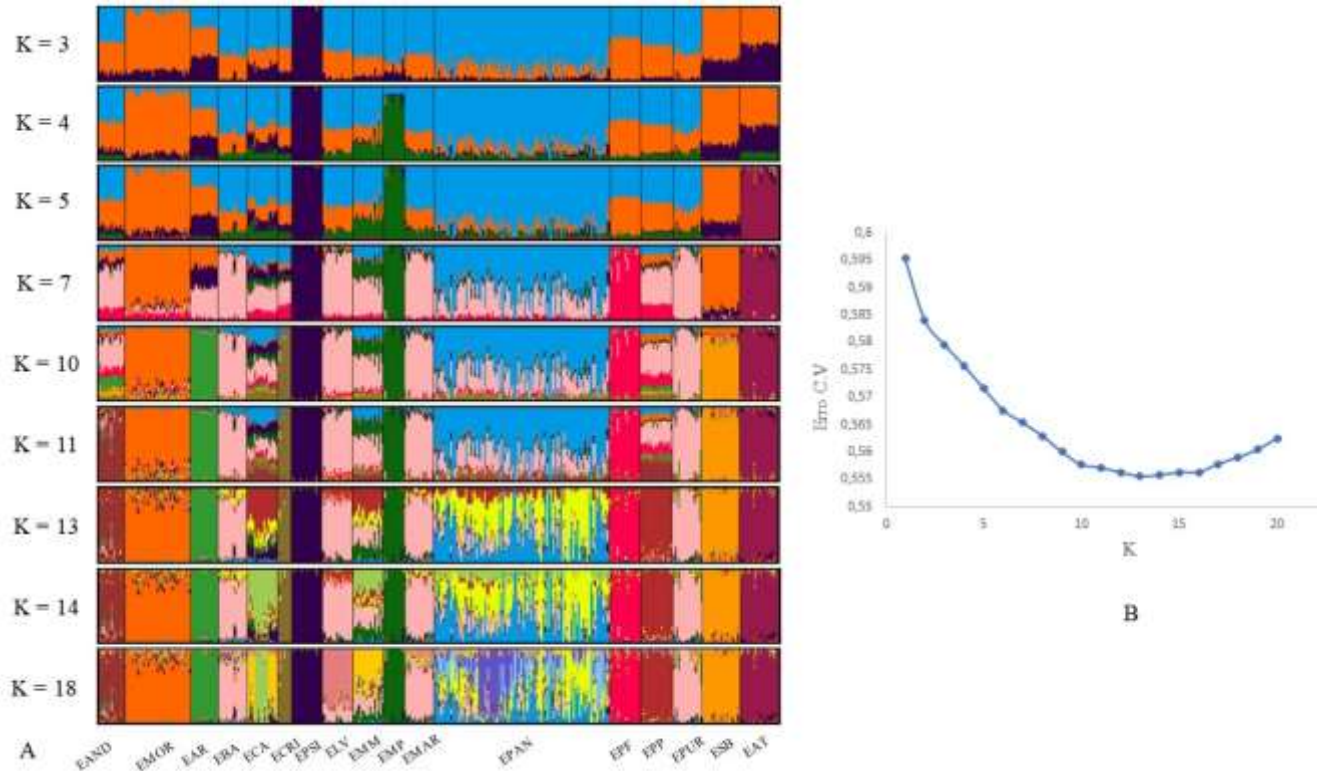


Figura 5. A) Estrutura populacional envolvendo 17 raças de equinos (8 raças naturalizadas brasileiras e 9 raças do trabalho de Petersen *et al.* (2013b) estimada pelo programa ADMIXTURE, onde K é o número de *clusters* ancestrais e variou de 2 a 20, utilizando 19.656 SNPs. EAND – Andaluz; EMOR – Morgan; EAR – Árabe; EBA – Baixadeira; ECA – Campeira; ECRI – Crioula; EPSI – Puro Sangue Inglês; ELV – Lavradeira; EMM – Mangalarga Marchador; EMP – Mangalarga Paulista; EMAR – Marajoara; EPAN – Pantaneira; EPF – Passo Fino (Porto Rico); EPP – Passo Peruano; EPUR – Puruca; ESB – *Saddlebred* Americano; EAT – *American Trotter*. **B) Gráfico do teste de validação cruzada** calculado pela média dos valores de 10 repetições para cada *cluster* (K), evidenciando que o menor valor encontrado foi para K=13.

3.2.6 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Foi realizada a AMOVA com o intuito de analisar a existência de diferenciação entre os animais. Na análise I, onde não há separação em grupos, a porcentagem de variação observada entre as populações foi de 6%. No entanto, ao separar os animais em dois grupos na análise II, a porcentagem de variação entre os grupos formados foi de 4%, enquanto a variação entre as populações dentro de cada grupo foi de aproximadamente 5%, totalizando 9% de variação. Em ambas as análises, a variação entre indivíduos dentro de cada raça se mostrou não significativa. Os valores negativos observados na Tabela 6 indicam uma ausência de estrutura genética naquele nível, onde não é possível visualizar variação. O F_{ST} global estimado foi de 0,575. Além disso, grande parte da variação genética total observada na análise I e II (~94% e 91%, respectivamente) foram atribuídas à variação dentro do indivíduo (Tabela 6).

Na análise III, a porcentagem de variação total entre as populações foi de 5,76%. Ao separar as raças naturalizadas brasileiras das iberoamericanas na análise IV, a variação total foi de 5,95%, dividida em variação entre os grupos (0,39%) e entre população dentro dos grupos (5,59%) (Tabela 6).

Tabela 6. Estrutura genética de raças de equinos analisada por Análise de Variância Molecular (AMOVA). Análise realizada no *software* Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Com exceção dos níveis destacados, todos os níveis foram significativos ($p < 0,05$). **(I e II)** Análise realizada para as 8 raças naturalizadas brasileiras + Árabe e Puro Sangue Inglês, utilizando 33.147 SNPs autossomais e 1000 permutações. **(I)** todas as raças em um único grupo; **(II)** raças separadas em dois grupos: naturalizadas brasileiras e Árabe + Puro Sangue Inglês. **(III e IV)** Análise realizada para as 8 raças naturalizadas brasileiras + 4 raças ibero-americanas do trabalho de Petersen *et al.* (2013b), utilizando 19.656 SNPs autossomais e 1000 permutações. **(III)** todas as raças em um único grupo. **(IV)** raças separadas em 2 grupos: naturalizadas brasileiras e raças ibero-americanas. * Não significativo ($p > 0,05$).

Estrutura	Fonte de Variação	G. L.	Soma dos Quadrados	Componentes de Variação	% de Variação	F _{ST}
(I) 10 populações, 1 grupo (8 brasileiras + 2 exóticas)	Entre populações	9	203317,055	352,16613	6,13	0,5758
	Entre indivíduos dentro de populações*	268*	1437153,464*	-33,11134*	-0,58*	
	Dentro indivíduos	278	1509188,500	5428,73561	94,45	
	Total	555	3149659,020	5747,79040		
(II) 10 populações, 2 grupos (8 brasileiras + 2 exóticas)	Entre grupos	1	50503,935	235,74680	3,99	
	Entre populações dentro de grupos	8	152813,120	281,90434	4,77	
	Entre indivíduos dentro de populações*	268*	1437153,464*	-33,111134*	-0,56*	
	Dentro indivíduos	278	1509188,500	5428,73561	91,81	
	Total	555	3149659,020	5913,27541		
(III) 12 populações, 1 grupo (8 brasileiras + 4 iberoamericanas)	Entre populações	11	134768,506	193,39676	5,76	0,5758
	Entre indivíduos dentro de raças*	105*	946920,002*	-19,39143*	-0,58*	
	Dentro indivíduos	313	996810,000	3184,69649	94,82	
	Total	625	2078498,508	3358,70182		
(IV) 12 populações, 2 grupos (8 brasileiras + 4 iberoamericanas)	Entre grupos	1	16801,421	12,26910	0,36	
	Entre populações dentro de grupos	10	117967,085	188,14363	5,59	

Entre indivíduos dentro de populações*	301*	946920,002*	-19,39143*	-0,58*
Dentro indivíduos	313	996810,000	3184,69649	94,62
Total	625	2078498,508	3365,71779	

4. DISCUSSÃO

4.1 Raças Brasileiras – Variabilidade Genética Intrarracial

Com relação aos cavalos brasileiros, não houve uma diferença muito grande em termos de polimorfismo entre as raças, sendo que, em alguns casos, as naturalizadas apresentaram um número maior de locos polimórficos em relação às comerciais (Tabela 3). A raça Crioula apresentou um número de marcadores polimórficos consideravelmente reduzido quando comparada às demais raças, totalizando aproximadamente metade do total de locos analisados (37.611 SNPs polimórficos em um total de 61.746 SNPs utilizados). Esse fato deve-se, provavelmente, ao viés associado ao tamanho amostral do Crioulo, raça com poucos indivíduos em relação às demais. Comparando com McCue *et al.* (2012), não houve diferença dos valores de locos polimórficos encontrados para as raças Árabe e Puro Sangue Inglês, indicando que os representantes desses dois grupos amostrados no Brasil representam uma diversidade genética de animais dessas raças similar ao encontrado em outros países.

Os maiores valores de heterozigosidade foram observados na raça Crioula, indicando alta variabilidade genética, ainda que o número de indivíduos genotipados na mesma tenha sido reduzido (Tabela 3). Algumas raças brasileiras apresentaram valores de heterozigosidade semelhantes ao Árabe, raça comercial que já passou por processo de seleção direcional (Tabela 3). Possivelmente, as raças naturalizadas brasileiras se encontram selecionadas e estabelecidas devido às Associações de Criadores existentes para algumas delas.

As raças Marajoara e Puruca apresentaram valores de $H_E = 0,323$. Cortés *et al.* (2017), com o uso de microssatélites, encontraram valores de H_E de 0,79 e 0,78 para as raças Marajoara e Puruca, respectivamente, resultados elevados em comparação aos evidenciados nesse estudo. Apesar da discrepância, os resultados encontrados pelos autores mostraram valores de H_E muito próximos uns dos outros, fato também observado no presente estudo, sendo possível inferir uma diversidade similar dentro de cada uma delas. É importante ressaltar que os autores utilizaram um maior número de animais em seu trabalho em relação ao número amostral do presente estudo, além de um marcador multialélico, fatos que podem ter influenciado na divergência entre os resultados.

A raça Mangalarga Marchador apresentou valores de H_O e H_E próximos da maioria das outras raças naturalizadas brasileiras (Tabela 3). No estudo realizado por Petersen *et al.* (2013b), foi encontrado o valor de $H_E = 0,235$ para a raça brasileira Mangalarga Paulista. Em comparação com o Mangalarga Marchador analisado nesse estudo, esses valores também foram reduzidos. Essa diferença pode ser justificada pelo histórico das duas raças, sendo o Mangalarga Paulista originário de cruzamentos entre a raça ancestral em comum entre eles e representantes de raças como Puro Sangue Inglês e Árabe, animais atualmente conhecidos pela pureza de sua composição genética e pouca interferência de outras raças, o que, historicamente, confere a eles uma diversidade genética reduzida em relação às outras (Lippi & Mortari, 2003). Cortés *et al.* (2017), utilizando marcadores microssatélites, observaram valor médio de H_E de 0,76 para a raça Mangalarga. Considerando o poder estatístico conferido pela ampla distribuição de marcadores SNPs ao longo do genoma, sugere-se que os valores obtidos nesse estudo representem com mais acurácia a diversidade dessa raça.

McCue *et al.*, (2012), utilizando o mesmo *beadchip* (*GGP EquineSNP70K*), encontraram menores valores de H_E para as raças Árabe (0,275) e Puro Sangue Inglês (0,247), em comparação aos valores de 0,338 e 0,351 encontrados para as mesmas nesse estudo, respectivamente. No trabalho realizado por Petersen *et al.* (2013b), utilizando o *EquineSNP50 Beadchip*, também foram observados valores abaixo dos encontrados nesse estudo para as mesmas raças - Árabe (0,287) e Puro Sangue Inglês (0,264). Essas diferenças sugerem uma diversidade genética disponível nesses locos levemente maior nas raças naturalizadas brasileiras e nas comerciais criadas no Brasil em relação às comerciais analisadas nesses estudos. Em comparação com a raça Mangalarga Marchador (0,321) analisada nesse estudo, esses valores também foram reduzidos. Essa diferença, possivelmente, pode ser justificada

pelo histórico das duas raças, sendo o Mangalarga Paulista originário de cruzamentos entre a raça comum entre as duas.

No trabalho realizado por Giacomoni *et al.* (2008), utilizando 10 marcadores microssatélites, foram observados valores médios de H_E de 0,739, 0,562 e 0,763 para três populações de animais da raça Pantaneira. Resultados similares (0,78) foram encontrados por Cortés *et al.* (2017), utilizando 25 marcadores microssatélites, além de valores médios de H_E de 0,76, 0,79 e 0,78 para as raças Mangalarga, Marajoara e Puruca, respectivamente. Um terceiro estudo, utilizando 12 marcadores microssatélites, realizado por Sereno (2008), apontou resultados similares (H_E média de 0,78) em animais Pantaneiros do núcleo da Fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal). Esses valores foram muito acima dos obtidos nesse estudo para a raça (0,301). Essa diferença pode estar atrelada aos tipos de marcadores utilizados, já que SNPs são marcadores bialélicos, enquanto os microssatélites são multialélicos. Além disso, há a possibilidade de viés associado ao *Beadchip*, já que ele foi desenvolvido com base em raças exóticas comerciais, e não para essas raças naturalizadas. Esse possível viés explicaria os valores não tão elevados de heterozigosidade nas raças naturalizadas brasileiras em relação aos altos valores de locos polimórficos observados. Apesar da discrepância por conta do tipo de marcador utilizado, os resultados de H_E encontrados por ambos Cortés *et al.* (2017) e no presente estudo para as raças Mangalarga, Marajoara e Puruca foram muito próximos uns dos outros. Utilizando marcadores RAPD-PCR, Egito *et al.* (2007) observaram índices elevados de diversidade genética (0,339) para a raça Pantaneira, indicando variabilidade genética elevada na raça. Esses valores foram similares, porém maiores que os encontrados nesse estudo (0,301). Um estudo de variabilidade genética de raças naturalizadas brasileiras de equinos foi realizado por Silva *et al.* (2012), utilizando 11 marcadores microssatélites, para as raças Baixadeira, Campeira, Lavradeira, Mangalarga Marchador e Pantaneira. Os resultados obtidos pelos autores foram significativamente maiores dos obtidos nessa análise, sendo os mesmos mais elevados em comparações envolvendo o Campeiro (Baixadeiro – 0,139; Lavradeiro – 0,106; Mangalarga Marchador – 0,149 e Pantaneiro – 0,131). Essa diferença possivelmente está relacionada aos tipos diferentes de marcadores utilizados nos estudos. É importante ressaltar que os autores utilizaram um número amostral consideravelmente maior (variando de 43 a 48 animais) do que os utilizados no presente estudo para as raças em questão, com exceção da Pantaneira, fato que pode ter influenciado na divergência dos resultados encontrados.

4.2 Raças Brasileiras – Variabilidade Genética Interracial

O valor relativamente elevado de F_{ST} observado entre o Campeiro e Lavradeiro em relação às demais brasileiras (Tabela 4), possivelmente, está associado aos locais de origem em extremos opostos do país, a primeira ao sul e a segunda ao norte do Brasil (Souza *et al.*, 2018; Braga, 2000). Esse fato é mais bem elucidado na PCA (Figura 1), onde é possível observar a divisão geográfica das raças brasileiras de equinos. A troca de alelos por conta da proximidade geográfica tende a ser facilitada, sendo que, teoricamente, menores distâncias físicas implicariam em uma maior proximidade genética entre duas raças em questão. Nessa análise, os animais das regiões Norte e Nordeste (Lavradeiro, Marajoara, Puruca e Baixadeiro) se agruparam, enquanto raças das regiões Sudeste e Sul (Crioula, Campeira e Mangalarga Marchador), apesar de ainda estarem segregadas por uma certa distância genética, se encontraram mais próximas umas das outras. Já a raça Pantaneira, pertencente ao Pantanal Matogrossense na região Centro-Oeste do Brasil, apresentou-se separada das demais. Analisando a distribuição da Figura 1, pode-se inferir que a base genética das raças das regiões Norte e Nordeste é a mesma, enquanto as outras possuem bases genéticas distintas.

Silva *et al.* (2012), utilizando 11 marcadores microssatélites, realizaram um estudo para as raças Baixadeira, Campeira, Lavradeira, Mangalarga Marchador e Pantaneira. Os resultados encontrados pelos autores divergiram dos apresentados nesse estudo, sendo que os valores de F_{ST} obtidos variaram de 0,106 (entre Campeiro e Lavradeiro) a 0,149 (entre Campeiro e Mangalarga Marchador). Com relação à análise de PCA, a distribuição para as raças Baixadeira, Lavradeira e Campeira encontrada pelos autores também foi diferente, sendo que cada uma delas se mostrou relativamente isolada de todas as demais. Mesmo não se agrupando no estudo mencionado, a raça que se mostrou mais próxima da Lavradeira foi a Baixadeira. Os autores observaram as raças Mangalarga Marchador e Lavradeira se posicionando em extremos opostos, sendo que no presente estudo, essas raças se agruparam relativamente próximas uma da outra. Apesar disso, Silva *et al.* (2012) observaram uma distribuição similar à encontrada no presente estudo entre o Mangalarga Marchador e o Pantaneiro. Essas diferenças, possivelmente, estão relacionadas aos tipos diferentes de marcadores utilizados nos estudos, assim como nos microssatélites selecionados (alto valor médio de H_E – 0,875) para a análise de Silva *et al.* (2012). Os autores, ainda, construíram a figura de PCA com apenas dois componentes (PCA 2D), em comparação aos três utilizados nesse estudo (PCA 3D), o que também pode ter influenciado na diferença entre os resultados.

O aumento do número amostral para essas raças em conjunto com a utilização de marcadores SNPs podem ajudar a elucidar as diferenças observadas entre os resultados de Silva *et al.* (2012) e os encontrados nas análises do presente estudo.

Na matriz de distância genética par a par, as comparações envolvendo o Crioulo foram as que apresentaram os maiores valores de F_{ST} entre as raças naturalizadas brasileiras genotipadas nesse estudo (Tabela 4). A raça Crioula foi a única que, historicamente, parece não ter se misturado com as demais raças naturalizadas brasileiras, sendo mantida isolada ao sul do país (Dowdall, 1985; Araújo, 1990). Provavelmente, os animais dessa raça trocaram alelos apenas com raças Crioulas de países próximos, como Argentina, Uruguai e Paraguai, além de seu histórico de *studbook* fechado para contribuições genéticas externas por cerca de 100 anos (Maciel *et al.* 2014). Isso torna-se evidente pelos valores elevados de F_{ST} observados, indicando algum nível de isolamento reprodutivo entre o Crioulo e as demais raças, assim como a manutenção de alelos exclusivos da mesma e, possivelmente, frequências alélicas alteradas (Bhatia *et al.*, 2013), corroborando os resultados de ADMIXTURE encontrados. Na análise de PCA (Figura 1), foi possível observar essa diversidade genética presente nos animais Crioulos indicada pelos valores de heterozigidade (Tabela 3), sendo que os mesmos apresentaram ampla distribuição, principalmente ao longo do segundo componente, responsável por 2,43% da variação. Além disso, os animais da raça se posicionaram consideravelmente distantes dos demais, corroborando a hipótese de isolamento.

De forma geral, os menores valores de F_{ST} entre as raças naturalizadas brasileiras observados na análise dizem respeito às comparações envolvendo o Pantaneiro (Tabela 4). Os resultados indicam que a raça Pantaneira apresenta variabilidade genética elevada, sendo que a mesma mostrou certa proximidade genética com praticamente todas as raças brasileiras analisadas. Esse fato também é evidenciado na análise de PCA (Figura 1), onde a raça Pantaneira apresentou a maior dispersão observada entre as raças naturalizadas brasileiras, estando distribuído praticamente ao longo do primeiro componente inteiro, responsável por 2,98% da variação. A distribuição da Figura 1 corrobora os valores de F_{ST} para o Pantaneiro e com a alta variabilidade genética da raça, além de sugerir certa miscigenação devido à proximidade com praticamente todas as demais raças brasileiras naturalizadas. A variabilidade genética presente na raça se mostrou elevada ao ponto de alguns animais se mostrarem geneticamente mais próximos de outros de raças diferentes (como da Mangalarga Marchador, Puruca, Marajoara, Campeira, Lavradeira e Baixadeira) do que de alguns dentro da própria população de Pantaneiros (Figura 1). Essa conformação

corroborar os baixos valores de F_{ST} observado entre o Pantaneiro e as outras raças naturalizadas brasileiras, o que apoia a hipótese de um possível processo de descaracterização dessa raça, já sugerida por Reis *et al.* (2008) e Silva *et al.* (2012), com microssatélites, e por Ianella *et al.* (2017), com DNA mitocondrial.

As raças Marajoara e Puruca se comportaram de forma similar nas análises e o valor de F_{ST} entre elas foi o menor observado (Tabela 4). Essa similaridade entre elas, provavelmente, está associada à ancestralidade em comum, origem em mesma região e períodos próximos de surgimento das mesmas (Teixeira, 1985; Reis *et al.*, 2008). Esses resultados corroboram a hipótese de troca de alelos entre essas raças do Norte do Brasil sugerida por Ianella *et al.* (2018), com SNPs, onde os autores encontraram os mesmos valores de F_{ST} dos observados no presente estudo, ressaltando a necessidade de estabelecimento de estratégias de manejo mais eficientes para as mesmas. Devido a esse histórico das duas raças, era esperado que elas se agrupassem mais intimamente entre si na análise de PCA do que com as demais raças, o que não foi observado (Figura 1). A raça Puruca apresentou variabilidade genética elevada, e, conseqüentemente, uma distribuição ampla, estando presente ao longo de parte do primeiro componente. A análise de PCA sugere, ainda, que os animais dentro e entre as raças Lavradeiro, Marajoara e Baixadeiro apresentam uma semelhança e proximidade genética, possivelmente devido à ausência de manejo reprodutivo adequado nessas raças, resultando em um grupamento misturado entre as três e não sendo possível distingui-las geneticamente (Figura 1). Por conta disso, a distância observada entre o Marajoara, Lavradeiro e Baixadeiro em relação ao Puruca foi praticamente a mesma.

As raças Puro Sangue Inglês e o Árabe apresentaram valores elevados de F_{ST} em suas interações (Tabela 4). Por serem animais de corrida de alto valor econômico, o histórico de controle de *pedigree* do Puro Sangue Inglês é bastante evidente. Já o Árabe, apesar de também apresentar importância, não apresenta valores econômicos tão elevados quanto o Puro Sangue Inglês no mercado brasileiro (Balieiro, 1971; Beck, 1985; Santos *et al.*, 1992; Mariante & Cavalcante, 2000; Marques, 2001). Atualmente, ambas são mantidas separadas e o inter cruzamento entre essas raças e as naturalizadas é desencorajado. No início do histórico da espécie equina era diferente, e isso é refletido nesses valores de F_{ST} . Esse fato é mais bem elucidado na Figura 2, onde as raças Puro Sangue Inglês e Árabe mostraram-se relativamente isoladas das demais, porém a Árabe se posicionou à uma distância menor das raças naturalizadas brasileiras.

O dendrograma (Figura 3) corrobora os resultados encontrados nas análises de PCA e F_{ST} , podendo-se observar a segregação entre as raças comerciais e as brasileiras.

Dentre as naturalizadas, é possível observar que as raças do Nordeste se encontram próximas umas das outras, não havendo distinção muito acentuada. Já as do Centro-Oeste, Sul e Sudeste se apresentaram mais bem delimitadas, fato que pode ter sido influenciado devido a existência das Associações de Criadores e histórico genealógico estabelecido há mais tempo.

Os baixos valores de F_{ST} observados entre a maioria das raças naturalizadas brasileiras (Tabela 4) indicam forte similaridade genética entre elas, o que também é sugerido pela análise de PCA (Figura 1), onde a maioria delas se encontram relativamente agrupadas, sendo algumas mais próximas de outras. Esse fato pode estar associado a origem das raças naturalizadas brasileiras a partir de um número reduzido de animais, o que corroboraria a similaridade genética observada. Entretanto, os resultados das duas análises apoiam a hipótese de um possível processo de descaracterização de algumas raças, já sugerida em trabalhos de outros autores com marcadores diferentes (Reis *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2012; Ianella *et al.*, 2017). Essa possível descaracterização, provavelmente, é resultante de cruzamentos indiscriminados, já que houve um agrupamento apesar de algumas possuírem origens e históricos distintos, assim como características únicas. Raças como a Crioula, Pantaneira e Puruca, por exemplo (Figura 1), possuem uma variabilidade genética elevada, fato que, através da conservação das raças naturalizadas brasileiras, pode se tornar importante aliado em programas de melhoramento de outras raças equinas mundialmente difundidas. Dito isso, as análises corroboram a necessidade de conservação dessas raças naturalizadas brasileiras, visando a conservação do patrimônio genético.

Na análise de ADMIXTURE, o Mangalarga Paulista foi o primeiro a se diferenciar dos demais, seguido pelo Passo Fino Porto Riquenho, Crioulo e Mangalarga Marchador (Figura 5). Esse fato, provavelmente, está associado ao baixo grau de miscigenação observado nas raças Crioula, Mangalarga Marchador e Mangalarga Paulista em relação às demais (como a Pantaneira, por exemplo). Algumas dessas raças apresentam, ainda, *studbooks* fechados há muitos anos para contribuições genéticas externas, o que corrobora esses resultados.

O baixo nível de miscigenação apresentado pela raça Crioula corrobora a hipótese de isolamento na região sul do Brasil levantada anteriormente. A Crioula teve seu desenvolvimento nos Pampas da América do Sul, região abrangendo países como Argentina, Uruguai e o sul do Brasil, sendo possível observar a introgressão de animais desses países na raça até os dias atuais (Maciel *et al.* 2014). Segundo o mesmo autor, a Crioula apresenta um histórico de seleção reprodutiva com *studbook* fechado por quase 100 anos, o que apoia esse distanciamento genético dela das demais. A hipótese para a baixa miscigenação sugerida

pelos resultados do Mangalarga Marchador está, possivelmente, ligada à forte associação de criadores e população fundadora no histórico da mesma. A Associação busca manter a “pureza” da raça, evitando cruzamentos com animais que não são classificados morfologicamente como Mangalarga Marchador, o que diminui o fluxo gênico e a influência de outras raças na composição genética do mesmo.

A Figura 5 auxilia na elucidação da relação das raças naturalizadas brasileiras com as exóticas do trabalho de Petersen *et al.* (2013b). Foi possível observar similaridades entre as bases genéticas das raças Puruca, Baixadeira e Marajoara, não sendo possível distingui-las geneticamente com o painel de marcadores utilizado no presente estudo. A Lavradeira, por sua vez, compartilha um grande número de alelos com essas raças e também com o Passo Peruano. Esses resultados corroboram os obtidos nas análises de F_{ST} (Tabela 4) e PCA (Figura 2) para essas raças, onde elas mostraram distâncias genéticas relativamente baixas entre si e se agruparam de forma próxima. Além disso, a análise de ADMIXTURE apoia a hipótese da presença da raça Passo Peruano na composição genética e/ou uma possível origem dessas raças brasileiras a partir dela.

A Campeira mostrou uma composição própria e, em sua maioria, também pura, sendo possível observar um nível considerável dessa estrutura na raça Mangalarga Marchador, que também mostrou certa similaridade com a composição das raças Baixadeira, Lavradeira, Marajoara e Puruca. Esses resultados corroboram o posicionamento da Campeira na análise de PCA com relação às demais raças naturalizadas brasileiras (Figura 1), onde ela mostrou certa proximidade genética, mas, ao mesmo tempo, não se misturou com o grupo formado pelas raças Baixadeira, Marajoara e Lavradeira. A Mangalarga Marchador, entretanto, apresentou uma conformação praticamente exclusiva e pura em sua maioria no valor de $K = 15$, se encontrando em uma situação similar à Campeira, ou seja, apresentando uma relativa proximidade dos citados acima, porém sem se misturar com o grupo formado por eles. A eventual diferenciação da Mangalarga Marchador das demais, possivelmente, está associada à forte associação de criadores estabelecida para a raça, que regula a entrada de contribuições genéticas externas, resultando em uma baixa miscigenação.

A estrutura genética das populações, elucidada através da análise de ADMIXTURE, condiz com os resultados obtidos nas análises de F_{ST} e PCA, confirmando a distância genética da raça Crioula das demais, a intensa miscigenação e ampla distribuição do Pantaneiro e a existência do grupo envolvendo animais Baixadeiro, Marajoara, Puruca e Lavradeiro, raças com bases genéticas de mesma origem. Não foi possível observar a diferenciação entre raças do Norte e Nordeste no presente estudo com marcadores SNPs, fato

já documentado por Silva *et al.* (2012), com marcadores microssatélites. Ianella *et al.* (2018) observaram resultados similares na análise de ADMIXTURE para as raças naturalizadas brasileiras.

A diversidade genética observada na raça Pantaneira condiz com a encontrada por Sereno *et al.* (2008), com STRs, e por Egito *et al.* (2007), com marcadores RAPD, tornando evidente, ainda, a elevada estruturação genética da raça e sendo possível mostrar que a mesma pode ser considerada diferenciada das demais, possuindo base e formação genéticas particulares. Com relação à raça Mangalarga Marchador, os resultados encontrados com SNPs nesse estudo se aproximam das conclusões obtidas por De Assis *et al.* (2009), também com STRs, que indicam que, apesar de um efeito fundador reduzido, o Mangalarga Marchador apresenta um grau de miscigenação razoável em suas populações, provavelmente devido a efeitos geográficos no estado de Minas Gerais, assim como uma variabilidade genética considerável.

Os resultados da AMOVA (Tabela 6) corroboram a hipótese de que os animais dentro das raças, tanto as naturalizadas brasileiras quanto as exóticas, são geneticamente próximos entre si devido, possivelmente, a populações fechadas e processos de seleção, já que foi observada variação significativa entre populações (raças), mas a variação entre os indivíduos dentro de cada raça se mostrou não significativa (Tabela 6). Petersen *et al.* (2013b) também observaram variação considerável entre as raças analisadas elucidada por AMOVA, além de baixa variação entre indivíduos dentro de raças (não significativa).

Silva *et al.* (2012), utilizando microssatélites, encontraram uma variação genética total de 12,37% entre as raças Campeira, Pantaneira, Lavradeira, Baixadeira, Mangalarga Marchador, Árabe e Puro Sangue Inglês. Esses resultados foram maiores do que os encontrados para as raças no presente estudo, sendo que essa diferença pode estar associada ao tipo de marcador utilizado pelos autores. Apesar disso, os resultados indicam a existência de certa variabilidade genética entre as raças estudadas.

4.3. Raças Brasileiras – Origem e Relação com Raças Exóticas

Na matriz de F_{ST} , a Mangalarga Paulista apresentou os valores mais altos nas interações com as demais raças (Tabela 4). Apesar disso, o menor valor encontrado nas comparações envolvendo ela foi com a Mangalarga Marchador, por compartilharem ancestrais em comum. Devido a diferentes pressões seletivas, demandas ambientais e

direcionamentos reprodutivos aos quais esses animais foram submetidos, eventualmente houve a diferenciação deles em Mangalarga Paulista, raça que, apesar de diversos pontos em comum com o Mangalarga Marchador, é considerada raça distinta. Além da exposição a pressões seletivas distintas e devido à separação desses animais, os cruzamentos aos quais ambas as raças foram submetidas também diferem historicamente (Beck, 1985). Os valores de distância genética entre a Mangalarga Paulista e as demais raças refletem isso, estando consideravelmente distante das demais raças, porém mais próximo do Mangalarga Marchador. Na análise de PCA, é possível observar a distância genética das raças Mangalarga Paulista, *American Trotter* e Puro Sangue Inglês, sendo que cada uma delas se mostrou isolada das demais (Figuras 5A e B). Esse fato era esperado para raças comerciais com histórico de *pedigree* rigoroso, como o *American Trotter*, Puro Sangue Inglês e Árabe, porém esperava-se que o Mangalarga Paulista se agrupasse mais próximo das demais raças naturalizadas brasileiras, em especial do Mangalarga Marchador. Petersen *et al.* (2013b) também observaram valores de F_{ST} elevados do Mangalarga Paulista com relação aos demais em seu trabalho.

Como resultado fenotípico da diferenciação, a Mangalarga Marchador adquiriu a característica pela qual a raça é mais bem conhecida: a “marcha”, dividida em “marcha batida” e “marcha picada”, tornando-o um modelo em estudos de genes associados à marcha em equinos (Fonseca *et al.*, 2017; Patterson *et al.*, 2015; Bussiman *et al.*, 2019; Santos, 2020; Manso Filho *et al.*, 2015; Andersson *et al.*, 2012; Promerová *et al.*, 2014).

As quatro raças iberoamericanas incluídas do trabalho de Petersen *et al.* (2013b) na análise de F_{ST} no presente estudo (Andaluz, Passo Peruano, Passo Fino Porto Riquenho e Morgan) apresentaram valores relativamente baixos em relação às brasileiras naturalizadas, sendo que as maiores distâncias foram com a Crioula e as menores com a Pantaneira (Tabela 4). Como mencionado anteriormente, a Crioula se mostrou relativamente isolada ao Sul do país, o que implicaria em uma maior distância geográfica dos países de origem das três raças acima, dificultando a troca de alelos entre elas e resultando em uma distância genética maior (Maciel *et al.* 2014). Já o Pantanal Matogrossense se encontra geograficamente mais próximo de países como o Peru, o que explicaria maior proximidade genética da Pantaneira devido a maior possibilidade de fluxo gênico.

A Andaluz apresentou valores de F_{ST} relativamente baixos com as raças Passo Peruano, Pantaneira, Marajoara, Baixadeiro, Puruca, Mangalarga Marchador, Lavradeira e Campeira (Tabela 4), o que pode ser explicado pela presença histórica na composição genética e uma possível origem das demais a partir dele (Marques, 2001; Marques, 2008;

Costa, 2007; Lippi & Mortari, 2003). Consequentemente, o Passo Peruano apresentou valores baixos de F_{ST} com as raças naturalizadas brasileiras acima (Tabela 4). Considerando a relação do Passo Peruano com o Andaluz e a proximidade geográfica do Peru com o Brasil, espera-se uma distância genética menor entre o Passo Peruano e as raças naturalizadas brasileiras em relação ao Andaluz. Os valores de F_{ST} sugerem possível origem do Passo Peruano a partir do Andaluz, e das raças naturalizadas brasileiras acima a partir do Passo Peruano. O Passo Fino Porto Riquenho, entretanto, não apresentou valores de F_{ST} tão baixos com a maioria das raças, estando mais próximo da Pantaneira, Marajoara, Puruca e Passo Peruano (variando de 0,067 a 0,076 – Tabela 4). Os animais das raças naturalizadas brasileiras citadas acima se encontram relativamente misturados na análise de PCA (Figura 2), apresentando, ainda, proximidade relativa das raças Passo Peruano e Passo Fino Porto Riquenho (mais da primeira do que da segunda, entretanto). Esses resultados corroboram as análises de F_{ST} e possível relação sugerida anteriormente entre essas raças.

Era esperado que a Morgan se aproximasse mais das outras raças norte americanas (*American Trotter* e *Saddlebred* Americano), porém a mesma, apesar de agrupada com elas na análise de PCA (Figura 2A), principalmente com a *American Trotter*, mostrou valores de F_{ST} mais baixos com as raças naturalizadas brasileiras (com exceção da Crioula). A distância genética sugerida pela análise de F_{ST} (Tabela 4) foi menor entre o Morgan e as raças Baixadeira, Marajoara, Pantaneira e Puruca, apesar da Campeira, Lavradeira e Mangalarga Marchador terem apresentado uma distância similar, porém um pouco maior. Esse fato, em conjunto com a relação sugerida entre essas raças brasileiras e o Andaluz, Passo Peruano e Passo Fino Porto Riquenho, coloca o Morgan também relativamente próximo a essas três raças exóticas, apesar de mais distante delas do que da maioria das raças brasileiras (Tabela 4). A partir disso, surge a hipótese de um possível envolvimento do Morgan, além do Andaluz, Passo Peruano e Passo Fino Porto Riquenho, no estabelecimento e origem das raças locais do Brasil.

Petersen *et al.* (2013b) também encontraram uma distribuição similar entre as raças Andaluz, Passo Peruano e Passo Fino Porto Riquenho na análise de PCA em seu trabalho. Entretanto, os autores observaram um agrupamento próximo do Mangalarga Paulista com relação às três raças, sendo o mesmo mais próximo do Andaluz, seguido do Passo Peruano e Passo Fino Porto Riquenho. No presente estudo, o Mangalarga Paulista ficou distante de praticamente todas as raças, com exceção de alguns indivíduos Mangalarga Marchador, como explicado anteriormente. A conformação diferente encontrada pelos autores para o Mangalarga Paulista em relação à apresentada nesse estudo pode estar associada ao

fato de os autores terem realizado a análise com apenas dois componentes principais, em comparação aos três utilizados nesse estudo. Além disso, a influência da adição das demais raças naturalizadas brasileiras na análise de PCA em relação ao estudo de Petersen *et al.* (2013b) faz com que as raças iberoamericanas se posicionem mais próximas delas, distanciando-se do Mangalarga Paulista.

O dendrograma construído baseado na distância genética de Nei permite observar a relação entre a Mangalarga Marchador e a Paulista (Figura 3). Apesar de ambas se encontrarem no mesmo clado, a Marchador se distancia da Paulista, se agrupando mais intimamente com outras raças brasileiras, como a Campeira e Lavradeira. Esse fato reforça a hipótese de origem em comum de ambas as Mangalarga, com uma posterior separação de seus ancestrais que culminou em um patrimônio genético da Paulista mais distante das demais raças naturalizadas brasileiras em relação a Marchador.

Além disso, a Figura 3 auxilia na elucidação de possíveis questões de origem de algumas raças naturalizadas brasileiras. O Andaluz e Morgan, apesar de próximos, se encontram em clados separados das raças que apresentaram valores de F_{ST} baixos com o mesmo (Pantaneiro, Baixadeiro, Campeiro, Lavradeiro, Mangalarga Marchador, Marajoara e Puruca), o que corrobora uma possível origem e presença deles na composição genética dessas raças a partir mesmos ancestrais. De forma similar, é possível observar uma origem comum entre a Passo Fino Porto Riquenho e a Passo Peruano, que se encontram no mesmo clado, sendo que o dendrograma, ainda, corrobora os valores mais baixos de F_{ST} delas com as raças brasileiras citadas acima em relação à Andaluz, estando elas mais próximas da Peruano que da Porto Riquenho.

No trabalho de Petersen *et al.* (2013b), as raças Andaluz, Mangalarga Paulista, Passo Fino Porto Riquenho e Passo Peruano se posicionaram em um mesmo clado, o que apoia a hipótese de proximidade entre elas. Diferentemente dos resultados observados no presente estudo, esse posicionamento em mesmo clado pode estar associado à quantidade e tipos de raças incluídas na análise dos autores, onde os grupos estudados diferem, no geral, significativamente entre si, culminando em um relativo agrupamento mais próximo dessas raças.

4. CONCLUSÕES

As análises dos dados genômicos das raças de equinos naturalizadas brasileiras mostram que a Crioula, a Pantaneira, a Mangalarga Marchador e a Campeira são raças com base e características genéticas distintas das demais, com destaque para a raça Crioula. Por outro lado, as raças Lavradeira, Baixadeira, Puruca e Marajoara apresentaram uma base genética em comum, o que dificulta o processo de diferenciação das mesmas. Ambas as raças comerciais (Árabe e Puro Sangue Inglês) criadas no Brasil também apresentaram alta variabilidade genética e se mostraram diferenciadas com relação às brasileiras.

De maneira geral, as raças brasileiras revelaram possuir alta diversidade genética, sendo que algumas possuem uma base genética restrita (como, por exemplo, o Mangalarga Marchador), enquanto outras apresentam uma variabilidade genética mais elevada. Com essas informações, é possível realizar o manejo reprodutivo dos rebanhos de forma adequada, visando proteger o patrimônio genético dessas raças naturalizadas brasileiras, como vem sendo feito com o Mangalarga Marchador. Além disso, é necessário se alertar para a introgressão que, aparentemente, está ocorrendo com a raça Pantaneira. Sugere-se a necessidade de um estudo com um maior número amostral para melhor determinar a existência de distinção entre as raças do Norte e Nordeste do Brasil, visando a otimização de programas de conservação para as raças naturalizadas brasileiras. A utilização de um painel mais amplo de marcadores (*Affymetrix Axiom 670k Equine Genotyping Array*) pode auxiliar na redução de possível viés associado aos marcadores selecionados em raças naturalizadas brasileiras, como a Crioula, assim como em uma maior elucidação e confirmação dos resultados obtidos nesse estudo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCCC. Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos. Disponível em: <https://www.cavalocrioulo.org.br/studbook/historia>. Acesso em: novembro/2020.

ABCCMM. Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Mangalarga Marchador. Disponível em: <http://www.abccmm.org.br/araca>. Acesso em: novembro de 2020.

Alexander, D. H., Novembre, J. & Lange, K. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. *Genome Res* **19**, 1655–1664 (2009).

Andersson, L. S., Larhammar, M., Memic, F., Wootz, H, et al. (2012). Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature* **488**: 642–646

Araújo, R. V. **Os Jesuítas dos sete povos**. Canoas: La Salle, 1990. 467p.
Mariante, A.S., Cavalcante, N. Animais do Descobrimento. Raças domésticas da história do Brasil.

Balieiro, E. S. Subsídio ao estudo do cavalo Pantaneiro. São Paulo. **Anuário Comissão Coordenadora da Criação do Cavalo Nacional**. Brasília: Ministério da Agricultura, 1971. p.59-65.

Beck, S. L. **Equinos: raças, manejo e equitação**. 2.ed. São Paulo: Editora dos Criadores, 1985. 479p.

Bhatia, G., Patterson, N., Sankararaman, S., & Price, A. L. (2013). *Estimating and interpreting FST: The impact of rare variants*. *Genome Research*, **23**(9), 1514–1521. doi:10.1101/gr.154831.113.

Binns, M. M., Boehler, D. A., Lambert, D. H. Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. **Animal Genetics**, v. 41, supl. 2, p. 154-158, 2010.

Bizarria dos Santos, W., Pimenta Schettini, G., Fonseca, M. G., Pereira, G. L., Loyola Chardulo, L. A., Rodrigues Machado Neto, O., Baldassini, W. A., Nunes de Oliveira, H., Abdallah Curi, R. Fine-scale estimation of inbreeding rates, runs of homozygosity and genome-wide heterozygosity levels in the Mangalarga Marchador horse breed. *J. Anim. Breed. Genet.* 2020.

Braga, R. M. Cavalo Lavradeiro: aspectos históricos, situação atual, desafios e possíveis soluções para sua conservação (2019). Embrapa Roraima. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. ISSN 0104 – 9046. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/201421/1/DOC-N-65-.pdf>. Acesso em: novembro/2020.

Braga, R. M. **Cavalo Lavradeiro em Roraima: aspectos históricos, ecológicos e conservação.** Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000.

Brooks, S. A., Gabreski, N., Miller, D., Brisbin, A., Brown, H. E., Streeter, C., Mezey, J., Cook, D., Antczak, D. F. Whole-genome SNP association in the horse: Identification of a deletion in Myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. **PLoS Genet.**, v. 6(4):e1000909, 2010.

Bruford, M. W. & Townsend, S. J. (2006). Mitochondrial DNA diversity in modern sheep: implications for domestication. In *Documenting Domestication: New Genetic and Archaeological Paradigms*, edited by M. A. Zeder, D. G. Bradley, E. Emshwiller and B. D. Smith. University of California Press, London. pp. 306–316.

Charlesworth, B. (2009). Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nat Rev Genet* **10**: 195–205.

Cook, D., Gallagher, P., Bailey, E. Genetics of swayback in American Saddlebred horses. **Animal Genetics**, v. 41, supl. 2, p. 64-71, 2010.

Corbin, L. J., Blott, S. C., Swinburne, J. E., Vaudin, M., Bishop, S. C., & Woolliams, J. A. (2010). *Linkage disequilibrium and historical effective population size in the Thoroughbred horse.* *Animal Genetics*, *41*, 8–15.

Cortés, O., Dunner, S., Gama, L. T., Martínez, A. M., Delgado, J. V., Ginja, C., Jiménez, L. M., Jordana, J., Luis, C., Oom, M. M., Sponenberg, D. P., Zaragoza, P., Vega-

Pla, J. L. (2017). *The legacy of Columbus in American horse populations assessed by microsatellite markers. Journal of Animal Breeding and Genetics*, (), – . doi:10.1111/jbg.12255

Cosgrove E.J., Sadeghi R., Schlamp F., Holl H.M., Moradi-Shahrbabak M., Miraei-Ashtiani S.R., Abdalla S., Shykind B., Troedsson M., Stefaniuk-Szmukier M., Prabhu A., Bucca S., Bugno-Poniewierska M., Wallner B., Malek J., Miller D. C., Clark A. G., Antczak D. F., Brooks S. A. Genome Diversity and the Origin of the Arabian Horse. *Sci Rep.* 2020 Jun 16;10(1):9702. doi: 10.1038/s41598-020-66232-1. PMID: 32546689; PMCID: PMC7298027.

Costa, M. R. Caracterização genética de eqüídeos da raça marajoara por microssatélites. Belém, UFPA. 2007. 100 p. ; il; 30 cm. (Tese apresentada à Universidade Federal do Pará/UFPA - 2007).

Costa, M. D., Mendes, L. J., Maruch, S., Ramirez, P. A., Meneses, A. C. A., Martins Neto, T., Ruas, J. R. M., & Chamone, J. M. A. (2016). Efeito da composição genética nas características de conformação em equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(6), 1629-1637. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8884>.

Costa, M. R. Caracterização genética de eqüídeos da raça marajoara por microssatélites. Belém, UFPA. 2007. 100 p.; il; 30 cm. (Tese apresentada à Universidade Federal do Pará/UFPA - 2007).

DeAssis, J. B. D. M., DeLaat, M. G. C. D., Peixoto, J. A. G., Bergmann, C. G., Fonseca and M.R.S. Carvalho (2009). Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses. *Genet. Mol. Res.* 8 (4): 1519-1524.

Desjardins, P., Conklin, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp.* 2010 Nov 22;(45):2565. doi: 10.3791/2565. PMID: 21189466; PMCID: PMC3346308.

Dos Santos, Bruna A.; Pereira, Guilherme L.; Bussiman, Fernando de O.; Paschoal, Victória R.; de Souza Júnior, Sérgio M.; Balieiro, Júlio César de C.; Chardulo, Luís Artur L.; Curi, Rogério A. (2019). *Genomic analysis of the population structure in horses of the Brazilian Mangalarga Marchador breed. Livestock Science*, 229(), 49–55. doi:10.1016/j.livsci.2019.09.010

Dowdall, R. C. (1985). *Criando Criollos*. Ed. Hemisferio Sur. S. A. Buenos Aires.

Dupuis, M. C., Zhang, Z., Druet, T., Denoix, J. M., Charlier, C., Lekeux, P., Georges, M. Results of a haplotype-based GWAS for recurrent laryngeal neuropathy in the horse. **Mammalian Genome**, v. 22, n. 9-10, p. 613-20, 2011.

Eberth, J., Swerczak, T., Bailey, E. Investigation of Dwarfism Among Miniature Horses using the Illumina Horse SNP50 Bead Chip. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 29, n. 5, p. 315, 2009.

Eding, H., Meuwissen, T. H. E. (2001). *Marker-based estimates of between and within population kinships for the conservation of genetic diversity*. 118(3), 141–159. doi:10.1046/j.1439-0388.2001.00290.x

Egito, A. A. et al. Genetic variability of Pantaneiro horse using RAPD-PCR markers. *R. Bras. Zootec.*, Viçosa, v.36, n. 4, p. 799-806, Aug. 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007000400007.

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564–567, 2010.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Situação mundial dos recursos genéticos animais para agricultura e alimentação – versão resumida (2010). Disponível em: <http://www.fao.org/3/a1260p/a1260p.pdf>.

Faria, D. A., Wilson, C., Paiva, S. *et al.* Assessing *Sus scrofa* diversity among continental United States, and Pacific islands populations using molecular markers from a gene banks collection. *Sci Rep* **9**, 3173 (2019) doi:10.1038/s41598-019-39309-9.

Faria, R. A. da S. **Estrutura populacional e parâmetros genéticos da característica classe de tempo em corridas de equinos da Raça Quarto de Milha**. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

Fariello, M. I., Boitard, S., Naya, H., SanCristobal, M. & Servin, B. Detecting signatures of selection through haplotype differentiation among hierarchically structured populations. *Genetics* **193**, 929–941 (2013).

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

Fernández, J., Bennewitz, J. (2017). Defining genetic diversity based on genomic tools. In: Oldenbroek K (ed) *Genomic management of animal genetic diversity*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 42-76.

Fonseca, M. G., Ferraz, G. C., Lage, J., Pereira, G. L., Curi, R. A. A genome-wide association study reveals differences in the genetic mechanism of control of the two gait patterns of the Brazilian Mangalarga Marchador breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, p. 64-67, 2017.

Giacomoni, E. H., Fernández-Stolz, G. P., Freitas, T. R. O. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): 261-270 (2008)

Gonçalves, R. W., Costa, M. D., Rezende, A. S. C., Rocha Júnior, V. R., Leite, J. R. A. Efeito da endogamia sobre características morfométricas em cavalos da raça Mangalarga Marchador. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, n. 2, p. 419-426, 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n2/a23v64n2.pdf>.

Gossmann, T. I., Woolfit, M., Eyre-Walker, A. (2011). Quantifying the variation in the effective population size within a genome. *Genetics* **189**: 1389–1402.

Hill, E. W., McGivney, B. A., Gu, J., Whiston, R., MacHugh, D. E. A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred race horses. **BMC Genomics**, v. 11, n. 552, p. 1-10, 2010.

Huson, D. H., Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, **Mol. Biol. Evol.**, v. 23, n.2, p.254-267, 2006.

Ianella, P., Albuquerque, M. do S. M., Paiva, S. R., Egito, A. A., Almeida, L. D., Sereno, F. T. P. S., Carvalho, L. F. R., Mariante, A. da S., McManus, C. M. (2017). *D-loop haplotype diversity in Brazilian horse breeds*. *Genetics and Molecular Biology*, 40(3), 604–609. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0166

Ianella, P., Albuquerque, M. do S. M., Caetano, A. R., Biazio, G. R., Paiva, S. R., Nepomuceno, A. R., Carvalho, L. F. R., McManus, C. M. (2018). Genetic diversity and Population Structure of locally adapted horse breeds in Brazil. *Proceedings of the World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Volume Electronic Poster Session - Challenges - Species Conservation, 60, 2018.

Illumina Inc., San Diego, CA, United States. Data Sheet: SNP Genotyping. EquineSNP50 Genotyping BeadChip (2008). Disponível em: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_equine_snp50.pdf. Acesso em: janeiro/2021.

Illumina Inc., San Diego, CA, United States. Disponível em: <https://www.illumina.com/>. Acesso em: novembro/2020.

Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A. and Mayrose, I. (2015) Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour* 15:1179–1191.

Lee, Y-S., Woo Lee, J., Kim, H. Estimating effective population size of thoroughbred horses using linkage disequilibrium and theta ($4N\mu$) value. **Livestock Science**, v. 168, p. 32-37, 2014.

Li Y. L., Liu J. X. (2018). StructureSelector: a web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*. 18:176-177. DOI: 10.1111/1755-0998.12719.

Lippi, A. S.; Mortari, N. **Studies of blood groups and protein polymorphisms in the Brazilian horse breeds Mangalarga Marchador and Mangalarga (Equus caballus)**. *Genetics and Molecular Biology*, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 431-434, 2003.

Mantel, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, v.27, n.2, p. 209-220, 1967.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo (2016).

Marques, J. R. F., Costa, M. C., Silva, A. O. A. **Banco de recursos genéticos animais**. In: *Biotechnology Ciência e Desenvolvimento*, n. 21, p. 32-39. Julho/Agosto 2001.

Maciel, F. C., Bertoli, C. D., Braccini Neto, J., Cobuci J. A., Paiva, S. R., McManus, C. M. 2014. Population structure and genealogical analysis of the Brazilian Crioula Horse. *Animal Genetic Resources*. 54:115-125.

Manso Filho, H. C., Cothran, E. G., Juras, R., Gomes Filho, M. A., et al. (2015). Alelo DMRT3 mutante em equinos de marcha batida e picada das raças Campolina e Mangalarga Marchador. *Ciência Veterinária nos Trópicos* 18: 6–11.

Marchiori, C. M. Caracterização genômica de equinos das linhagens de trabalho e de corrida da raça Quarto de Milha (2018). Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

Marchiori C.M., Pereira G.L., Maiorano A.M., Rogatto G.M., Assoni A.D., Silva J.A.I.I.V., Chardulo L.A.L. & Curi R.A. (2019) Linkage disequilibrium and population structure characterization in the cutting and racing lines of Quarter Horses bred in Brazil. *Livestock Science* 219, 45–51

Mariante, A. S., Cavalcante, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Brasília: Embrapa - Cenargen, 2000. 232p.

Marques, J. R. F., Costa, M. R., Camargo, Jr. R. N. C., Albuquerque, M. S. M., et al. (2008). **Conservação e melhoramento dos recursos genéticos animais da Amazônia brasileira**. In: Anais do Congresso Brasileiro de Zootecnia, João Pessoa.

Marques, J. R. F.; Costa, M. C.; Silva, A. O. A. **Banco de recursos genéticos animais**. In: Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, n. 21, p. 32-39. Julho/Agosto 2001.

McCue M. E., Bannasch D. L., Petersen JL, Gurr J, Bailey E, Binns MM, Distl O, Guerin G, Hasegawa T, Hill EW, Leeb T, Lindgren G, Penedo MC, Roed KH, Ryder OA, Swinburne JE, Tozaki T, Valberg SJ, Vaudin M, Lindblad-Toh K, Wade CM, Mickelson JR. (2012). A high density SNP array for the domestic horse and extant Perissodactyla: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies. *PLoS Genet.* 8(1):e1002451.

McManus, C. M., Falcão, R. A., Spritze, A., Costa, D., et al. (2005). Caracterização morfológica de equinos da raça Campeira. *Rev. Soc. Bras. Zoot.* 34: 1553-1562.

McManus, C. M., Santos, S. A., Silva, J. and Louvandini, H. (2008). Body indices for the Pantaneira horse. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 45: 362-370.

McManus, C., Santos, S. A., Dallago, B. S. L., Paiva, S. R., Martins, R. F. S., Braccini Neto, J., Marques, P. R., Abreu, U. G. P. de (2013). *Evaluation of conservation program for the Pantaneiro horse in Brazil. Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(6), 404–413. doi:10.1590/s1516-35982013000600004 Meira, C. T., Farah, M. M., Fortes, M. R. S., Moore, S. S., Pereira, G. L., Silva, J. A. II V., Mota, M. D. S., Curi, R. A. A Genome-wide association study for morphometric traits in Quarter Horse. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, ed. 8, p. 102-1031, 2014.

Meira, C. T., Pereira, I. G., Farah, M. M., Pires, A. V., Garcia, D. A., Cruz, V. A. R. Seleção de características morfofuncionais de cavalos da raça Mangalarga Marchador por meio da análise de componentes principais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.6, p.1843-1848, 2013.

Miserani, M. G., McManus, C., Santos, S. A., Silva, J. A. da, Mariante, A. da S., & Abreu, U. G. P. de. (2002). *Avaliação dos Fatores que Influem nas Medidas Lineares do Cavallo Pantaneiro. Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(1 suppl), 335–341. doi:10.1590/s1516-35982002000200007.

Mota, M. D. S., Prado R. S. A. (2005). Estudo genético da pontuação total em equinos Mangalarga. *Arch. Zootec.* 54: 25– 30.

Nei, M. (1978). Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from A Small Number of Individuals. *Genetics.* 89. 583-90.

Neogen Genomics, Lincoln, NE, United States. Disponível em: <https://genomics.neogen.com/en/>. Acesso em: novembro/2020.

Pereira, G. L., Chud, T., Bernardes, P., Venturini, G., Chardulo, L. A., Curi, R. A. Genotype Imputation and Accuracy Evaluation in Racing Quarter Horses Genotyped Using Different Commercial SNP Panels. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 58, p. 89 - 96, 2017.

Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Rendahl, A. K., Valberg, S. J., Andersson, L. S., Axelsson, J., ... McCue, M. E. (2013a). *Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds*. *PLoS Genetics*, 9(1), e1003211. doi:10.1371/journal.pgen.1003211.

Petersen J. L., Mickelson J. R., Cothran E. G., Andersson L. S., Axelsson J., et al. (2013b) Genetic Diversity in the Modern Horse Illustrated from Genome-Wide SNP Data. *PLoS ONE* 8(1): e54997. doi:10.1371/journal.pone.0054997.

Pires, D. A. F., Coelho, E. G. A., Melo, J. B., Oliveira, D. A. A., Ribeiro, M. N., Gus Cothran, E., ... Khanshour, A. (2014). *Genetic diversity and population structure in remnant subpopulations of Nordestino horse breed*. *Archivos de Zootecnia*, 63(242), 349–358. doi:10.4321/s0004-05922014000200013.

Price, A., Patterson, N., Plenge, R. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* **38**, 904–909 (2006). <https://doi.org/10.1038/ng1847>.

Promerová, M., Andersson, L. S., Juras, R., Penedo, M. C. T., et al. (2014). Worldwide frequency distribution of the “Gait keeper” mutation in the DMRT3 gene. *Anim. Genet.* 45: 274–282.

Purcell, S., Neale, B., Tood-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., et al. (2007) PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *Amer J Hum Genet* 81: 559–575.

Regatieri, I. C., Pereira, G. L., Teixeira Neto, A. R., Ferraz, G. C., Curi, R. A., Queiroz-Neto, A. Polymorphisms in MCT1, CD147, PDK4 and DMRT3 genes in Arabian and Quarter Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 48, p. 161-165, 2016.

Reis, S. P., Gonçalves, E. C., Silva, A., & Schneider, M. P. C. (2008). *Genetic variability and efficiency of DNA microsatellite markers for paternity testing in horse breeds from the Brazilian Marajó archipelago*. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 68–72. doi:10.1590/s1415-47572008000100014.

Rezende M. P. G., Souza J. C., Mota M. F., Jardim R. J. D., Ramires G. G., Silva R. M., Souza C. F. Morfometria corporal de equinos utilizados em trabalho, esporte e lazer em três municípios do Mato Grosso do Sul. *Vet. e Zootec.* 2014 dez.; 21(4): 569-583.

Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. ***Molecular Biology and Evolution***, n.4, p.406-425, 1987.

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

Santos, S. A. & Juliano, R. S. Produção de equinos para lida do gado (2013). XXIII Congresso Brasileiro de Zootecnia. Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Santos, W. B. (2020). Genome-wide scan for selection signature and estimates of levels of autozygosity in Mangalarga Marchador horses [dissertation]. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/193259>.

Schaefer, R. J., Schubert, M., Bailey, E. *et al.* Developing a 670k genotyping array to tag ~2M SNPs across 24 horse breeds. *BMC Genomics* **18**, 565 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3943-8>.

Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. Arlequin: a software for population genetics data analysis User manual ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva; Geneva: 2000.

Schöder, W., Klostermann, A., Stock, K. F., Distl, O. A genome-wide association study for quantitative trait loci of show-jumping in Hanoverian Warm blood horses. ***Animal Genetics***, v. 43, n. 4, p. 392-400, 2011.

Sereno, F. T. P. S. **Caracterización genética del caballo Pantaneiro**. Córdoba: Universidad de Córdoba, 2002. 126p. Tesis (Doctoral in Genetica Animal) - Universidad de Córdoba, 2002.

Sereno, F. T. P. de S., Sereno, J. R. B., Vega-Pla, J. L., Kelly, L., & Bermejo, J. V. D. (2008). *Genetic diversity of Brazilian Pantaneiro horse and relationships among horse breeds*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(5), 595–604. doi:10.1590/s0100-204x2008000500007.

Sereno, J. R. B., Santos, S. A., Zuccari, C. E. S. N., Mazza, M. C. M. Establishment of a breeding season and evaluation of the reproductive performance of the Pantaneiro horse in Mato Grosso do Sul, Brazil. ***Animal Genetic Resources Information***, v.21, p.43-48, 1997.

Silva, A. C. M., Paiva, S. R., Albuquerque, M. S. M., Egito, A. A., Santos, S. A., Lima, F. C., ... McManus, C. M. (2012). *Genetic variability in local Brazilian horse lines*

using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 881–890. doi:10.4238/2012.april.10.4

SNP & Variation Suite™ (Version 8.x) [Software]. Bozeman, MT: Golden Helix, Inc. Available from <http://www.goldenhelix.com>.

SNP & Variation Suite Manual v8.8.3 (2018). Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com.

Souza, A. F. de., Fonteque, J. H., Costa, D. Cavalo Campeiro: passado, presente e futuro do Marchador das Araucárias. *Rev Acad Cienc Anim*. 2018;16 (Ed Esp 2): e162102 DOI: 10.7213/1981-4178.2018.162102 eISSN: 1981- 4178.

Teixeira, J. C. O. O Cavalo; Origem e Evolução. *Cavalo Marajoara*, v..11. p.8. 1985.

Teyssèdre, S., Dupuis, M. C., Guérin, G., Schibler, L., Denoix, J. M., Elsen, J. M., Ricard, A. Genome-wide association studies for osteochondrosis in French Trotters. **Journal Animal Science**, v. 90, p. 45-53, 2012.

Toro M. A., Fernández J., Caballero A. (2008). Molecular characterization of breeds and its use in conservation. *Anim. Genet. Res.* 120 (3), 174-195.

Weir, B. S., Cockerham, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of the population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

Woolliams, J. A., Oldenbroek, K. J. (2017). Genetic diversity issues in animal populations in the genomic era. In: Oldenbroek K (ed) *Genomic management of animal genetic diversity*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 13-47.

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19(3), 395–420. doi:10.1111/j.1558-5646.1965.tb01731.x

CAPÍTULO 3: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA RAÇA PANTANEIRA

RESUMO

Dentre as espécies introduzidas inicialmente no Brasil, os equinos se destacam, devido ao seu histórico evolutivo e sua relação com o ser humano. Dentre as raças de equinas naturalizadas brasileiras, a Pantaneira chama a atenção, devido às suas características adaptativas. Com o uso de marcadores SNPs (Polimorfismos de Nucleotídeo Único), é possível gerar dados genotípicos em grande quantidade, tempo reduzido, alta taxa de repetibilidade e confiabilidade. Amostras de sangue de 116 cavalos Pantaneiros foram divididas em populações com base em seus locais de coleta e analisadas objetivando a identificação de existência e caracterização da estrutura genética dentro e entre si. Foi feita a comparação entre as populações para melhor elucidar questões de variabilidade genética e diferenciação, assim como avaliar o impacto das barreiras geográficas do Pantanal no fluxo gênico entre as populações. Utilizando dados genotípicos do *GGP Equine SNP70 BeadChip* (*Geneseek-Neogen*, 65.157 SNPs), estimamos os parâmetros básicos de diversidade, distância genética (F_{ST}), análise de componentes principais (PCA) e análise de estrutura populacional (ADMIXTURE) dos animais. Foi realizado o Teste de Mantel, visando investigar a correlação entre a distância genética e geográfica das populações. Os resultados mostraram uma alta variabilidade genética nas populações analisadas, com uma estruturação altamente miscigenada. Esses níveis elevados de miscigenação dificultam o estabelecimento de um padrão racial e, conseqüentemente, de populações dentro da raça, sendo que apenas uma população diferenciou-se das demais. Não foi observada correlação entre distância geográfica e genética nas análises, indicando que as barreiras apresentadas pelo ecossistema do Pantanal não impedem o fluxo gênico entre as populações, devido, possivelmente, à capacidade de animais da raça em atravessar esse tipo de terreno. Foram observados baixos valores de distância genética e valores similares de heterozigosidade entre as populações, indicando forte proximidade genética e baixa diferenciação entre elas. Esses resultados, em conjunto com relativa proximidade genética com as demais raças naturalizadas brasileiras, indicam uma possível ocorrência de um processo de descaracterização da raça Pantaneira.

Palavras-chave: Recursos genéticos animais; Genética de conservação; *Equus caballus*; Marcadores moleculares; Pantaneiro; SNPs; Caracterização genética; Diversidade genética; Pantanal Matogrossense

ABSTRACT

Among the species first introduced in Brazil during the time of its discovery, equines stand out because of their evolutionary history and relationship with humans. Among the Brazilian naturalized horse breeds, the Pantaneiro draws attention due to its adaptative traits. With the use of SNPs markers (Single Nucleotide Polymorphism), it is possible to generate a great amount of genotypic information in a short period of time and with a high rate of repeatability and reliability. Blood samples of 116 Pantaneiro horses were divided into six populations based on their sampling location and analyzed, aiming to identify the existence and characterize the genetic structure and composition within and between them. Populations were compared to better elucidate genetic variability and differentiation, as well as to assess the impact of Pantanal's natural geographic barriers on gene flow between populations. Data from the *GGP Equine BeadChip* (Geneseek-Neogen, 65.157 SNPs) was used to assess basic diversity parameters, genetic distance (F_{ST}), Principal Component Analysis (PCA) and population structure (ADMIXTURE) for the sampled animals. Mantel Test was also performed to investigate the correlation between the populations' genetic and geographic distances. Results showed high genetic variability in the populations, with elevated levels of admixture in their structure. These high levels of admixture make it difficult to establish a racial pattern and, consequently, populations within the breed, being that only one of the populations differentiated itself from the others. No correlation between genetic and geographic distances was observed, indicating that the environment's barriers do not hinder the gene flow between the suggested populations, probably because of their ability to cross this kind of terrain. Low genetic distance and similar heterozygosity values were observed among populations, suggesting strong genetic proximity and low differentiation between them. These results, in addition to the low genetic distances observed between this and other Brazilian naturalized breeds, indicate a possible mischaracterization process of the Pantaneiro breed.

Key words: Animal genetic resources; Conservation genetics; *Equus caballus*; Molecular markers; Pantaneiro; SNPs; Genetic characterization; Genetic diversity; Pantanal Matogrossense

1. INTRODUÇÃO

A raça de equinos Pantaneira é encontrada no Pantanal Matogrossense, localizado na região Centro-Oeste do Brasil. Esses animais são bem adaptados a esse local, possuindo características adaptativas que permitem sua ocorrência nesse ambiente, como a capacidade de aguentar marchas por períodos prolongados em áreas alagadas presentes no bioma durante a estação chuvosa (Silva *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2010). Por esse motivo, indivíduos dessa raça são muito utilizados na região como meio de transporte de trabalhadores no campo e na lida com rebanhos de bovinos (Abreu *et al.*, 2010; Mariante & Cavalcante, 2000; Silva *et al.*, 2005).

O Pantanal Matogrossense corresponde a 35% da bacia hidrográfica do rio Alto Paraguai (região central da América do Sul). O clima na região do Pantanal é quente, com invernos secos. A precipitação anual varia entre 1.000 e 1.400 mm ao ano, sendo que cerca de 80% das chuvas geralmente acontecem na época do verão (novembro a março, com grande parte de dezembro a janeiro). O terreno da região é plano, o que também contribui para a retenção de água acima da superfície do solo devido aos alagamentos provenientes do transbordamento dos rios pelas chuvas (Abreu *et al.*, 2010)

Os primeiros animais da espécie equina trazidos à essa região alagada nos estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul na época da colonização encontraram condições que permitiram sua reprodução. Essas condições, somadas à pouca (ou nenhuma) interferência humana no direcionamento de cruzamentos, deram origem à raça naturalizada brasileira que conhecemos hoje como Pantaneira. Esses animais apresentam características adaptativas

altamente especializadas para esse tipo de bioma inundado, como resultado da ação de pressões de seleção natural ao longo de mais de 200 anos, selecionando indivíduos melhor adaptados às condições ambientais da região (Serenio, 1997; Mariante & Cavalcante, 2000).

A partir do ano de 1900, houve cruzamentos do Pantaneiro com raças como Árabe, Anglo Árabe e Puro Sangue Inglês, com o objetivo de elevar o porte e melhorar a conformação dos animais da raça Pantaneira (Balieiro, 1971; Beck, 1985). Esses cruzamentos foram feitos de forma indiscriminada e, em associação com doenças como tripanossomíases e a Anemia Infecciosa Equina, foram responsáveis pelo declínio populacional da raça (Mariante & Cavalcante, 2000; Santos, 2001). Beck (1985) observou, ainda, que os melhores animais Pantaneiros passavam pelo processo de castração e eram utilizados para trabalhos no campo, enquanto a questão da paternidade era deixada para os animais que não possuíam as mesmas qualidades dos primeiros, o que também não favoreceu a raça.

A conservação e amplo uso de raças naturalizadas, como a Pantaneira, está diretamente associada à sua funcionalidade e eficiência na realização de trabalhos no campo, assim como à sua adaptação a condições ambientais severas, fatores que implicam em um retorno financeiro associado a elas (Paiva, 2005). A criação de gado no Pantanal é extensiva e realizada em grandes fazendas, sendo o cavalo Pantaneiro uma peça fundamental nessa atividade (Silva *et al.*, 2005). Assim, donos de rebanhos desse tipo possuem um grande interesse e preferência por essa raça, principalmente para movimentação do gado nessa região intensamente alagada. Em 2010, Abreu *et al.* constataram que o rebanho bovino na região do Pantanal contava com cerca de 4 milhões de cabeças, sendo a principal atividade econômica em grandes propriedades na região. Segundo os mesmos autores, a movimentação do gado para pastagem pode ser realizada de três maneiras, variando de acordo com a localização das propriedades dos fazendeiros. Em regiões onde há alagamentos causados apenas pelas chuvas, os animais são criados no pasto o ano inteiro. Em propriedades onde há passagem de rios e córregos, os alagamentos são causados pela combinação de chuvas e transbordamento, sendo necessária a movimentação dos animais para terrenos mais elevados durante épocas chuvosas e vice-versa. Alguns fazendeiros optam pela movimentação do gado para pastagem e engorda na época da seca, removendo-os das regiões mais baixas antes dos alagamentos sazonais. Sendo assim, nas alternativas onde há necessidade de movimentar animais, o cavalo Pantaneiro quase sempre é empregado pelos trabalhadores como forma de transporte e auxílio na lida.

Silva *et al.* (2005) realizaram um estudo de avaliação da frequência cardíaca e respiratória de cavalos Pantaneiros envolvidos na lida cotidiana do gado na região do Pantanal

e concluíram que esses animais são adaptados ao estresse do exercício envolvendo esses dois parâmetros. McManus *et al.* (2008) avaliaram os índices corporais de cerca de 2.200 cavalos Pantaneiros registrados na Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Pantaneiro (ABCCP) e afirmaram que, de forma geral, esses animais são considerados apropriados para lida com gado e resistentes a marchas longas. Os mesmos autores sugerem, ainda, que esses animais sofreram alterações nos últimos anos, possivelmente devido à seleção por criadores, podendo afetar sua capacidade adaptativa.

Estudos desenvolvidos pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Pantaneiro (ABCCP, criada em 1972) iniciaram a conservação desse conjunto de atributos (ecótipo) e, juntamente com programas de conservação de outras instituições, mantém diversos núcleos da raça atualmente (Mariante & Cavalcante, 2000; Santos, 2001). A partir disso, o núcleo de conservação do cavalo Pantaneiro, que se encontra na Estação Experimental Fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal - Corumbá, MS, Brasil), foi criado, em 1988, e é responsável por diversos trabalhos de caracterização genética e do sistema de criação da raça, assim como estudos sobre a sua origem (Sereno *et al.*, 2008; Santos, 1993).

A caracterização genética é o primeiro passo na conservação de raças e pode ter implicações para estratégias futuras de reprodução (Solis *et al.* 2005). Trabalhos a respeito da caracterização genética, origem e morfologia da raça Pantaneira utilizando diversos tipos de marcadores já foram publicados. Cothran *et al.* (1998), utilizando marcadores bioquímicos, observaram que uma população específica da raça Pantaneira não foi influenciada por cruzamentos recentes com outras raças. Miserani *et al.* (2002), analisando 15 medidas lineares (altura, largura e comprimento de diversas partes do corpo dos animais da raça) encontraram variações fenotípicas em diferentes locais do Pantanal. Sereno (2002), utilizando marcadores microsatélites, observou um nível elevado de diversidade dentro do núcleo da Fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal) e concluiu que a proximidade genética com animais da Pura Raça Espanhola pode indicar uma origem Ibérica da raça Pantaneira. Não existem estudos a respeito da caracterização genética e de estrutura da raça Pantaneira utilizando marcadores moleculares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), ferramenta molecular que, juntamente às técnicas de sequenciamento, vêm crescendo em uso e popularidade nos dias de hoje pela sua capacidade de geração de grande quantidade de dados e custo financeiro e de tempo reduzidos. Estudos com marcadores dessa natureza podem auxiliar na elucidação da diferenciação, estrutura e variabilidade genética com custos de tempo e financeiro reduzidos.

A raça de cavalo naturalizada brasileira Pantaneira foi avaliada visando a identificação de existência de caracterização, estrutura e diversidade genética, assim como a

distribuição da raça. Foi feita a comparação das populações de Pantaneiro visando melhor elucidar questões de variabilidade genética e diferenciação com o uso de marcadores moleculares SNPs presentes no *beadchip* comercial *Equine SNP70 BeadChip*. Além disso, o capítulo visou avaliar o impacto das barreiras geográficas presentes no Pantanal Matogrossense no fluxo gênico entre as populações propostas para a raça.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Amostras de sangue de 116 cavalos da raça Pantaneira foram coletadas de diferentes regiões dos estados Mato Grosso e Mato Grosso do Sul sendo elas: Mato Grosso, MT (Fazenda Promissão, N = 10; Poconé, N = 9; Barra do Bugres, N = 13; Cuiabá, N = 20 e Mato Grosso do Sul, MS (Nhumirim, N = 58; Campo Grande, N = 6 (Tabela 1). Os locais de coleta foram escolhidos pela grande quantidade de animais registrados e presença de núcleos de conservação de Pantaneiros e a distância geográfica entre eles foi levada em consideração. Todas as amostras de sangue foram coletadas de criadores privados/associações de criadores e núcleos de conservação da Embrapa. Após extração e envio para genotipagem, o DNA restante foi incluído no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, cadastrados adequadamente no portal Alelo Animal (http://aleloanimal.cenargen.embrapa.br/database_collaboration_page_dev). As amostras foram enviadas para *Neogen*[®] Genomics (<https://genomics.neogen.com/>) para genotipagem.

A representação geográfica dos locais de coleta das amostras e a distância física (em km) entre eles se encontram descritas na Figura 1 e Tabela 1, respectivamente.

Tabela 1. Locais de coleta, código dos locais e número de animais Pantaneiros coletados em cada local, totalizando 116 indivíduos.

Local	Código	N
Fazenda Nhumirim, MS	NH	58
Campo Grande, MS	CG	6
Fazenda Promissão, MT	PR	10
Poconé, MT	PO	9
Barra do Bugres, MT	BB	13
Cuiabá, MT	CB	20

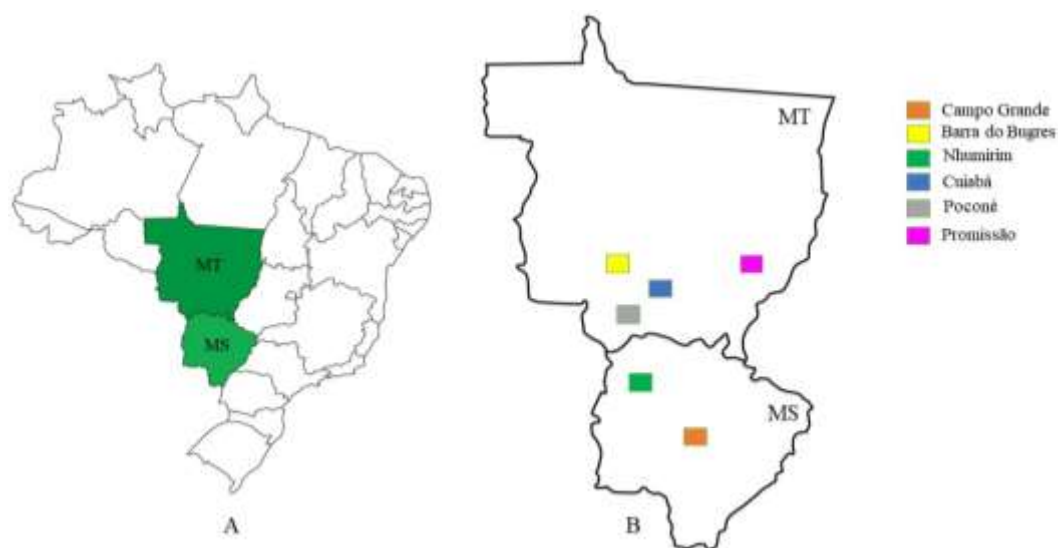


Figura 1. Localização geográfica dos locais de coleta das populações de Pantaneiro.

Figura construída utilizando o programa *Adobe Illustrator 2021* (<https://www.adobe.com/br/products/illustrator>. Adobe Inc., San Jose, CA – EUA). **A)** Estados de coleta (MT - Mato Grosso; MS – Mato Grosso do Sul). **B)** Estados ampliados com locais de coleta indicados.

Tabela 2. Distância geográfica aproximada (em km) entre os locais de coleta das populações de cavalos Pantaneiro, medida com o uso da ferramenta *online* de distância do *Google Maps* (<https://www.google.com/maps>). Os códigos das populações se encontram na Tabela 1.

Locais de Coleta	BB	CG	NH	CB	PO
CG	657				
NH	437	266			
CB	130	563	378		
PO	145	514	302	92	
PR	378	173	544	267	345

2.2 Extração e Quantificação de DNA

O DNA genômico foi obtido a partir de leucócitos presentes em amostras de sangue total. As amostras foram coletadas com o uso de tubos *vacutainer* de 10ml contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA – anticoagulante) e guardadas em ambiente refrigerado até o processamento. A etapa de processamento teve como objetivo segregar os componentes do sangue para isolamento dos leucócitos, seguindo os passos: (1) centrifugação a 3.000 RPM por 10 minutos; (2) Remoção da camada de leucócitos com o uso de uma pipeta de Pasteur e transferência para tubos *ependorf*; (3) Extração do DNA genômico desses leucócitos segundo o protocolo modificado (Anexo 1) de purificação de DNA da *Puregene* (*Gentra Puregene Blood Kit*[®]).

A quantificação do DNA foi feita de duas formas. Primeiro, através do uso de gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando o padrão de 200 ng/ul, 100 ng/ul e 50 ng/ul para comparação. As amostras também foram submetidas à análise em espectrofotômetro *NanoDrop Thermo Scientific* (*NanoDrop*TM 8000. *Thermo Fisher Scientific*, 2010. <https://www.thermofisher.com/>). O aparelho utiliza a quantidade de luz absorvida pelos ácidos nucleicos no λ de 260nm do DNA em solução, sendo que a absorção nesse comprimento de onda está diretamente relacionada com a concentração do DNA, ou seja, quanto maior a absorção, maior a concentração na solução em questão. Foi também estimada a pureza do material genético em questão, dada pela razão da quantidade de luz absorvida no λ de 260nm pela quantidade de luz absorvida por proteínas no λ de 280nm, sendo consideradas com bom teor de pureza as amostras que apresentaram valores dessa proporção (260/280) entre 1,8 e 2,0, indicando uma extração eficaz (Desjardins & Conklin, 2010).

Após os processos de extração e quantificação, o material foi armazenado a uma temperatura de -20°C até o momento de sua diluição e envio para genotipagem. O DNA restante foi incluído no BBGA (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia), cadastrados adequadamente no portal Alelo Animal (http://aleloanimal.cenargen.embrapa.br/database_collaboration_page_dev). As amostras desse grupo (Banco Brasileiro de Germoplasma Animal - BBGA) foram enviadas para *Neogen*[®] *Genomics* (<https://genomics.neogen.com/>) para genotipagem.

2.3 Genotipagem

Alíquotas de cada amostra com aproximadamente 300ng de DNA foram desidratadas à temperatura ambiente e encaminhadas em placas de 96 poços para serem genotipadas.

As amostras foram enviadas para *Neogen® Genomics* (<https://genomics.neogen.com/>) e foi utilizado o *GGP Equine 70K* com 65.157 SNPs distribuídos pelo genoma equino para a genotipagem.

O controle de qualidade foi realizado com o uso do *software SNP & Variation Suite v8* (*Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com*), removendo (a) amostras que apresentaram mais de 10% de dados faltantes (*call rate* < 0,90); (b) marcadores relacionados a cromossomos sexuais; (c) marcadores que apresentaram mais de 1% de dados faltantes (*call rate* < 0,99); (d) marcadores que apresentaram MAF inferior a 5% (MAF < 0,05) e (e) marcadores que se encontraram fora do EHW ($p < 0,001$). Além disso, foi aplicado um filtro de DL, visando remover (f) marcadores com um valor de $r^2 > 0,4$ em uma janela de intervalo de 50 SNPs. Com o objetivo de remover (g) animais com alto nível de relacionamento entre si, foi calculada uma matriz genômica de parentesco. Devido ao número amostral desigual entre as populações de Pantaneiro utilizadas no estudo, um animal de cada par com valores de parentesco genético de 80% (0,8) ou mais foi removido.

2.4 Análise de Diversidade Genética

Visando avaliar a variabilidade genética das populações de Pantaneiro, parâmetros básicos de diversidade como: média de *call rate*; Heterozigosidade Observada (Weir & Cockerham, 1983) e Esperada (Nei, 1978) - H_O e H_E respectivamente; média do número de alelos e número de marcadores polimórficos foram calculados com o uso dos softwares *SNP & Variation Suite v8* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com) e Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

A distância entre as populações de Pantaneiros foi avaliada através de uma matriz de F_{ST} par a par (27.930 SNPs com 2000 permutações e $p < 0,05$), com o uso do software Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Essa distância, assim como a relação entre as populações de Pantaneiro, também foi avaliada por meio de Análise de Componentes Principais (PCA), a qual utiliza o método EIGENSTRAT (Price *et al.*, 2006). Os cálculos foram feitos com auxílio do software *SNP & Variation Suite v8* (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com) e para as 6 populações de Pantaneiro com o uso de 27.930 SNPs.

Foram construídos gráficos 3D com o uso do programa SigmaPlot13 (<https://systatsoftware.com/products/sigmaplot/>) para ilustrar os resultados obtidos na análise de PCA, sendo que cada eixo do gráfico representa a porcentagem da variação genética explicada.

2.5 Análise de Estrutura Genética de Populações

A análise de estrutura populacional foi realizada com o uso do software ADMIXTURE 1.2.2 (Alexander *et al.*, 2009), estimando a ancestralidade dos indivíduos com o uso de modelo de máxima verossimilhança. Foi feita a caracterização genética dos indivíduos a partir das frequências alélicas juntamente com a ancestralidade estimada e partindo de um número hipotético de *clusters* (K), sendo, então, calculada a probabilidade de cada indivíduo (ou a proporção genômica de cada um deles) ser designado a determinado K. Essa análise foi feita em apenas um nível, utilizando as seis populações predefinidas de animais Pantaneiros. Foram utilizados 27.930 SNPs e 10 repetições para cada *cluster*, variando de $K = 2$ a 12.

Um teste de validação cruzada foi realizado para estimar o valor ideal de K a ser utilizado. Esse teste foi feito através da construção de um gráfico de dispersão utilizando o

valor médio dos erros de validação cruzada das iterações rodadas em cada K, sendo o K mais indicado aquele que apresentou o menor valor de erro de validação cruzada, ou seja, o menor valor da média das 10 iterações (Alexander *et al.*, 2009). Os dados gerados foram exportados e as projeções gráficas foram feitas com o uso da ferramenta *online StructureSelector* (Li & Liu, 2018).

2.6 Análise de Correlação entre Distâncias Genética e Geográfica (Teste de Mantel)

Com o objetivo de verificar a existência de correlação entre a distância geográfica dos locais onde as amostras foram coletadas e a distância genética entre os animais das populações analisadas nesse estudo, foi realizado um Teste de Mantel no *software* Arlequin 2000 v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010), utilizando os resultados de F_{ST} encontrados para as populações, uma matriz de distância geográfica construída a partir dos valores descritos na Tabela 2 e 2000 repetições.

3. RESULTADOS

3.1 Genotipagem por SNPs e Amostragem

Não foram eliminadas amostras com a aplicação do primeiro filtro, já que todas apresentaram *call rate* acima de 90% ($> 0,9$).

A análise de grau de parentesco foi realizada utilizando 116 amostras e 27.930 SNPs. A partir disso, foi construída uma matriz de relacionamento genômico, onde dois animais apresentaram grau de parentesco maior do que o limite estabelecido ($> 0,8$). Após a aplicação dos controles de qualidade relativos à amostragem, o número total de animais utilizado foi reduzido de 116 para 114.

A análise de parâmetros genéticos básicos de diversidade foi realizada para cada população de Pantaneiro de forma individual, com 61.746 SNPs, sendo removidos marcadores ainda não mapeados no genoma equino ou associados a cromossomos sexuais.

3.2 Diversidade e Estrutura Genética de Populações

3.2.1 Parâmetros Básicos de Diversidade

Os parâmetros genéticos básicos de diversidade foram calculados e os resultados se encontram descritos na Tabela 3.

As populações com maior número de locos polimórficos (Nhumirim e Cuiabá) foram as que apresentaram os menores valores de heterozigosidade ($H_O = 0,311$ e $0,307$; $H_E = 0,328$ e $0,323$, respectivamente). De maneira inversa, os maiores valores de H_O e H_E foram

observados nas populações com o menor número de locos polimórficos (Promissão – 0,378 e 0,356; Campo Grande – 0,379 e 0,376). Apesar disso, as populações apresentaram, no geral, valores similares de heteroziguidade.

Houve variação no número médio de alelos entre as populações, sendo que o maior valor foi para a Nhumirim (1,90) e o menor para a Campo Grande (1,72). Os resultados foram similares entre as populações Campo Grande (1,72) e Promissão (1,73) e entre a Barra do Bugres (1,79), Poconé (1,80) e Cuiabá (1,85).

Tabela 3. Parâmetros genéticos básicos das populações de Pantaneiro genotipadas com o *GGP Equine 70K*, com um total de 61.746 SNPs.

População	N	Nº Locos Polimórficos	Call Rate	Nº Médio de Alelos	H _o Média*	H _e Média*
Nhumirim	58	55.250	0,97	1,90	0,311	0,307
Campo Grande	6	45.389	0,98	1,72	0,379	0,376
Promissão	10	45.226	0,97	1,73	0,378	0,356
Poconé	9	49.718	0,97	1,80	0,351	0,349
Barra do Bugres	13	49.229	0,97	1,79	0,331	0,334
Cuiabá	20	51.547	0,96	1,85	0,328	0,323

*H_o – Heteroziguidade Média Observada; H_e – Heteroziguidade Média Esperada; Nº Alelos – Número médio de Alelos

3.2.2 Distância Genética (Matriz de F_{ST} par a par)

Todos os valores de F_{ST} encontrados foram significativos (Tabela 4). O maior resultado encontrado foi na comparação entre as populações Barra do Bugres e Promissão (F_{ST} = 0,056), sendo os valores mais altos seguintes associados às interações das duas com as demais. O menor valor observado foi entre as populações Nhumirim e Campo Grande (F_{ST} = 0,008).

O Teste de Mantel realizado com os valores de F_{ST} (Tabela 4) e distâncias geográficas entre os locais de coleta (Tabela 2) não indicou correlação entre as distâncias genética e geográfica nas populações de Pantaneiro analisadas.

Tabela 4. Matriz par a par de F_{ST} em 6 populações de equinos da raça Pantaneira utilizando 27.930 SNPs. Matriz estimada com 2000 permutações e p < 0,05. Todas as estimativas par a par foram significativas (p < 0,05). BB – Barra do Bugres; CG – Campo Grande; NH – Nhumirim; CB – Cuiabá; PO – Poconé; PR – Promissão.

Raça	BB	CG	NH	CB	PO
CG	0,029				
NH	0,028	0,008			
CB	0,032	0,017	0,015		
PO	0,026	0,010	0,010	0,010	
PR	0,056	0,032	0,031	0,034	0,015

*Todas as estimativas par a par foram significativas ($p < 0,05$)

3.2.3 Análise de Componentes Principais (PCA)

Na análise de PCA, os componentes 1, 2 e 3 representaram, respectivamente, 1,87, 1,48 e 1,47% da variação genética presente entre as populações. De maneira geral, houve intensa sobreposição entre as populações, sendo possível observar certo distanciamento apenas de alguns animais dos grupos Nhumirim, Campo Grande e Promissão.

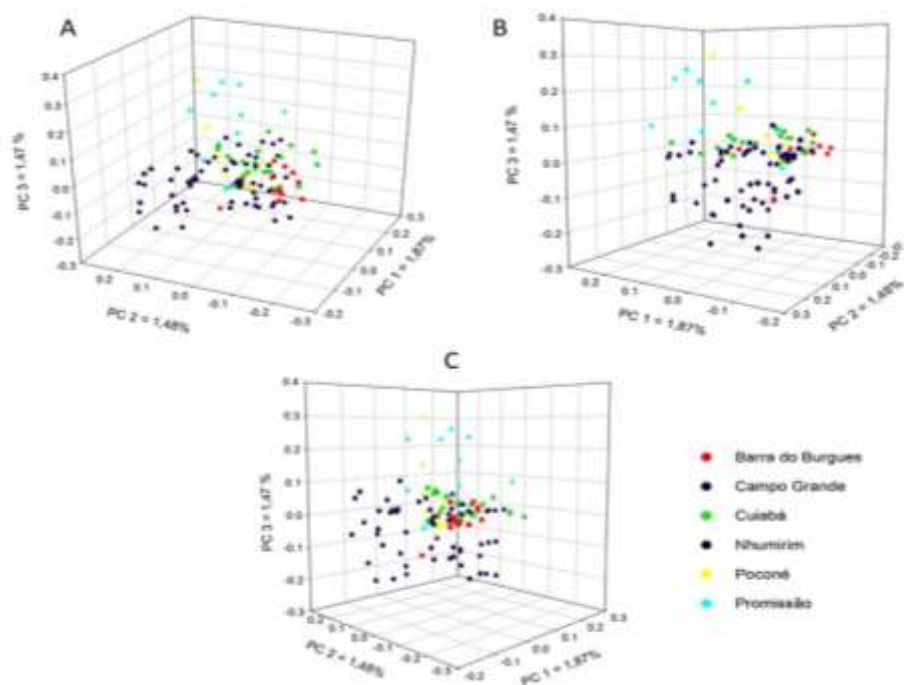


Figura 2. Estrutura populacional envolvendo 6 populações de equinos da raça Pantaneira relevada por Análise de Componentes Principais (PCA). O gráfico 3D representa os três primeiros componentes explicando 1,87; 1,48 e 1,47% da variação genética

entre as populações, respectivamente. Foram utilizados 27.930 SNPs. **A) B) e C)** diferentes ângulos do gráfico 3D.

3.2.4 Análise de Estrutura Genética de Populações (ADMIXTURE)

Em $K = 2$ (Figura 3), não é possível observar nenhuma estruturação clara entre as populações. Em $K = 3$, a adição de um novo *cluster* fez com que a Barra do Bugres (BB) se destacasse das demais por conta da relativa pureza da composição genética dos animais. Foi observado, ainda, pouca quantidade dessa composição genética na população Promissão (PR) em relação às demais. Em $K = 4$, a BB se manteve relativamente pura, sendo que as demais populações mostraram grau elevado de miscigenação. Nesse nível, a nova componente genética, no geral, encontra-se mais presente na população Nhumirim (NH) em relação às outras, apesar de alguns indivíduos da mesma não terem apresentado essa componente. Em $K = 5$, a nova componente também se mostrou mais intensa na população NH. Em $K = 7$, duas novas estruturas podem ser observadas praticamente em todas as populações, sendo uma delas mais presente na Cuiabá (CB) e a outra na PR. Esse fato continua a ser evidenciado nos níveis seguintes ($K = 9$ e 11), não sendo possível, com a exceção da BB, observar estruturação e contribuição genética clara nas populações. Apesar disso, é possível identificar uma maior parcela de determinada composição genética nas populações CB e PR. As populações de Campo Grande (CG), NH e Poconé (PO) foram as que apresentaram miscigenação mais elevada, apesar de todas possuírem algum grau de mistura.

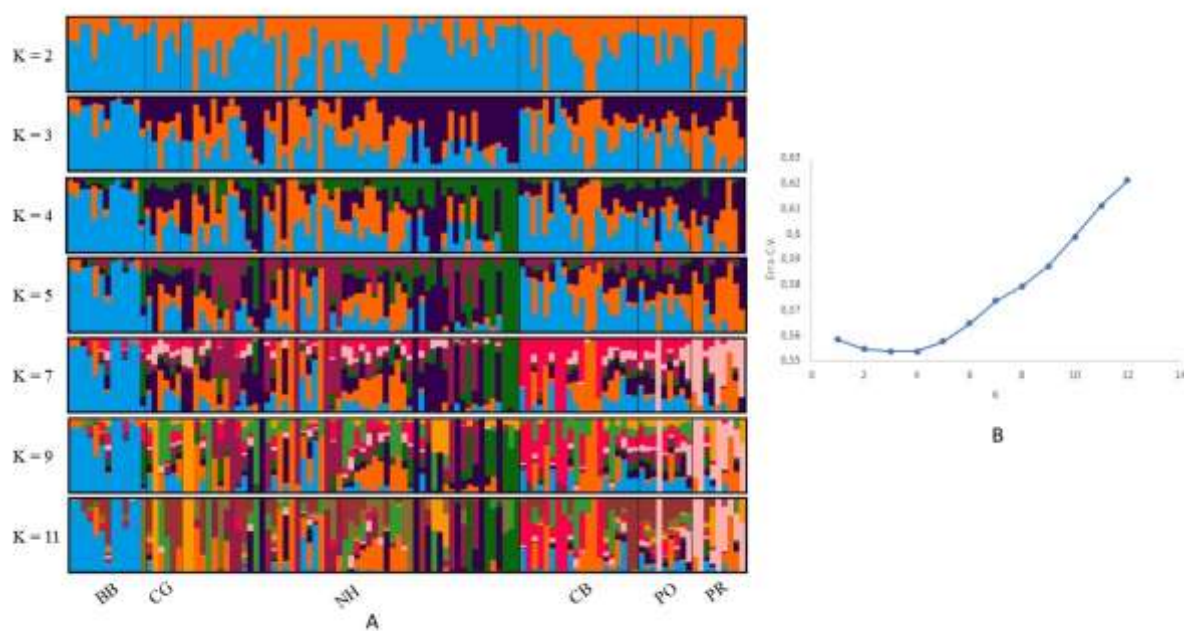


Figura 3. A) Estrutura populacional envolvendo 6 populações de equinos da raça Pantaneira, estimada pelo programa ADMIXTURE, onde K é o número de clusters ancestrais e variou de 2 a 12, utilizando 27.930 SNPs. BB – Barra do Bugres; CG – Campo Grande; NH – Nhumirim; CB – Cuiabá; PO – Poconé; PR – Promissão. **B) Gráfico do teste de validação cruzada** calculado pela média dos valores de 10 repetições para cada *cluster* (K), evidenciando que o menor valor encontrado foi para K = 4.

4. DISCUSSÃO

4.1 Variabilidade Genética Intrapopulacional

A variação do número de marcadores polimórficos observada na análise dos parâmetros básicos (Tabela 3) pode estar associada ao manejo das fazendas nesses locais, e conseqüentemente, resultar em quantidades de alelos (assim como alelos em si) diferentes sendo fixados nas populações. Todas as populações apresentaram valores de heterozigosidade similares entre si. Esse fato indica a existência de fluxo gênico entre as populações, já que o número de SNPs polimórficos não está, necessariamente, refletindo as taxas de heterozigosidade observada nos resultados. É importante ressaltar que a diferença no tamanho amostral das populações pode ser um viés, já que foram observados mais locos polimórficos nas populações com maior número de indivíduos.

Giacomoni *et al.* (2008) realizaram um estudo, utilizando 10 marcadores microssatélites, onde observaram valores médios de $H_E = 0,739$, $0,562$ e $0,763$ em três populações de equinos da raça Pantaneira (Ipiranga, Nova Esperança e Promissão, respectivamente), valores elevados aos encontrados no presente estudo com marcadores SNPs. De forma similar, Cortés *et al.* (2017), utilizando 25 marcadores microssatélites, encontraram um resultado de $H_E = 0,78$ para animais da raça. Valores similares ($H_E = 0,78$) também foram encontrados por Sereno *et al.* (2008), utilizando 12 marcadores microssatélites, para animais da raça no núcleo de conservação da Fazenda Nhumirim (Embrapa Pantanal). A discrepância entre os resultados, provavelmente, se encontra associada aos tipos diferentes de marcadores utilizados, sendo os microssatélites multialélicos e os SNPs bialélicos. Com o uso de marcadores RAPD-PCR, também bialélicos, Egito *et al.* (2007) observaram uma média de $H_E = 0,339$ para animais Pantaneiros, valor que se aproxima dos observados para as populações da raça nesse estudo, com marcadores SNPs.

4.2 Variabilidade Genética Interpopulacional

Apesar de significativos, foram observados valores baixos de F_{ST} (Tabela 4). Essa baixa distância genética sugere a presença de fluxo gênico entre as populações, o que indica que as barreiras naturais características do ecossistema do Pantanal (principalmente terrenos alagados) não conferem isolamento populacional entre os animais, já que a raça é conhecida por suas características adaptativas relacionadas à travessia e resistência a esse tipo de terreno, além de movimentação com parte do corpo submerso (Ribeiro *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2008). Essa hipótese é reforçada pelos resultados da análise de PCA (Figura 2), onde não é possível observar segregação clara entre as populações, indicando uma ausência de estruturação. O Teste de Mantel não indicou correlação entre as distâncias geográfica e genética (F_{ST}) nas populações, sendo que algumas que apresentaram valores de F_{ST} mais baixos entre si se encontram fisicamente mais distantes do que outras com valores mais altos. Isso indica que não há um isolamento reprodutivo por distância entre as populações analisadas, corroborando com a hipótese de que o terreno do Pantanal não impede a troca de fluxo gênico entre elas.

Giacomoni *et al.* (2008), com microssatélites, também observaram distâncias genéticas baixas entre três populações da raça Pantaneira, com valores de F_{ST} variando de 0,008 a 0,064, similares aos encontrados no presente estudo. Esses resultados corroboram a ausência de diferenciação genética observada entre as populações da raça. Os autores encontraram, ainda, baixos valores de endogamia nessas populações. Em conjunto com as características adaptativas da raça que permitem o fluxo gênico entre animais de populações distintas, eles sugerem que a variação nos valores de F_{ST} podem estar associadas ao manejo reprodutivo local das fazendas. Baixos valores de endogamia na raça também foram constatados nos estudos de Cortés *et al.* (2017). McManus *et al.* (2013) observaram variabilidade genética considerável entre fazendas de animais da raça, porém baixa entre municípios do Pantanal, assim como baixos valores de endogamia, o que também corrobora a hipótese acima.

4.3 Estrutura Genética de Populações (ADMIXTURE)

A análise de estrutura genética de populações (ADMIXTURE), em conjunto com o teste de validação cruzada realizado para identificação do número ideal de *clusters* (K)

(Figura 3), sugerem a existência de 4 populações subestruturadas. Entretanto, para o valor de $K = 4$, a única população indicada contendo um maior número de animais com alguma estruturação “pura” foi a Barra do Bugres. Apesar disso, o componente genético majoritário nessa população também pode ser observado nas demais, não sendo, assim, exclusivo da Barra do Bugres, o que corrobora com a hipótese de existência de fluxo gênico entre as populações. Além disso, a nova componente genética adicionada em $K = 4$ encontra-se mais acentuada na Nhumirim. Nesse nível, as demais populações se encontram relativamente miscigenadas. Não foi possível observar 4 populações subestruturadas em $K = 4$, ficando mais evidente a contribuição genética de apenas dois grupos com estrutura mais clara (Barra do Bugres e Nhumirim).

Com a adição de mais níveis ($K = 7$), foi possível observar certa diferenciação em duas populações (Cuiabá e Promissão). Essas componentes estão presentes em praticamente todas as demais populações, o que também apoia a existência de troca de alelos entre elas. Em $K = 9$ e 11 , esse fato continua a ser acentuado, podendo ser observadas três estruturas genéticas maiores nas populações sugeridas: Barra do Bugres (composição relativamente pura), Cuiabá e Promissão (grandes parcelas puras, porém com miscigenação). Nesses níveis, as demais populações (Campo Grande, Nhumirim e Poconé) apresentaram alto grau de miscigenação. Além disso, foram observadas componentes praticamente exclusivas na Nhumirim nesses níveis.

Dito isso, a presença de altos níveis de miscigenação nas populações corrobora a hipótese de que as barreiras geográficas do ecossistema do Pantanal (principalmente os alagamentos sazonais) não impedem, de fato, a ocorrência de fluxo gênico entre as populações, fator positivo em se tratando da variabilidade genética da raça.

Sereno *et al.* (2008), utilizando marcadores microssatélites, também observaram alta miscigenação na composição genética de animais da raça Pantaneira, o que corrobora os resultados de alta diversidade genética encontrados no presente estudo, assim como com a hipótese de ausência de estruturação genética, possivelmente, devido à capacidade de animais da raça em vencer as barreiras geográficas impostas pelos terrenos alagados do Pantanal.

Levantamos a hipótese de que a seleção dos animais da raça Pantaneira realizada pelos criadores pode estar utilizando características morfológicas como critério, ao invés da localização geográfica dos animais. Essa hipótese explicaria o surgimento de novas subpopulações de Pantaneiros com alelos favoráveis para seleções baseadas no cruzamento de animais com características de interesse de determinados produtores. É possível, ainda, que a

raça Pantaneira se encontre em processo de descaracterização, devido a cruzamentos indiscriminados com outras raças que não foram amostradas no presente trabalho, como indicado pela presença de contribuições genéticas que não estão presentes nas demais raças brasileiras naturalizadas analisadas. Apesar disso, o Pantaneiro apresenta alelos suficientemente distintos para ser estabelecido como uma raça distinta das demais localmente adaptadas amostradas nesse estudo. Não foi possível, entretanto, determinar a causa da subestruturação e miscigenação da raça Pantaneira.

5. CONCLUSÕES

O conjunto de amostras de cavalos Pantaneiros avaliados no presente estudo apresentou elevada variabilidade genética e baixa estruturação em subpopulações. As barreiras geográficas apresentadas pelo ecossistema do Pantanal não impedem o fluxo gênico entre as populações, devido, possivelmente, à capacidade desses animais em atravessar esse tipo de terreno alagado. Apenas a população da Barra do Bugres diferenciou-se das demais. Não foi observada correlação entre distância geográfica e genética nas populações analisadas. As populações propostas no estudo apresentam-se miscigenadas, com baixos valores de F_{ST} e alta sobreposição no gráfico da análise de PCA. Entre as hipóteses para explicar esses resultados, podemos citar a descaracterização genética da raça Pantaneira, na qual a mesma pode estar sendo cruzada indiscriminadamente com outras raças (aumento da variabilidade e miscigenação); ou formação de subpopulações baseado em cruzamentos específicos realizados pelos produtores visando fixação de alelos de interesse econômico (como diferenças morfológicas, por exemplo).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, U. G. P., McManus, C., Santos, S. A. Cattle ranching, conservation and transhumance in the Brazilian Pantanal. (2010). *Pastoralism* Vol. 1 No 1.

Balieiro, E. S. Subsídio ao estudo do cavalo Pantaneiro. São Paulo. Anuário Comissão Coordenadora da Criação do Cavalo Nacional. Brasília: Ministério da Agricultura, 1971. p.59-65.

Beck, S. L. Equinos: raças, manejo e equitação. 2.ed. São Paulo: Editora dos Criadores, 1985. 479p.

Chieffi, A. 1950. Criemos Bons Equídeos. 2. ed. Ministério da Agricultura, Serviço de Informação Agrícola. Rio de Janeiro. pp: 9-42.

Cortés, O., Dunner, S., Gama, L. T., Martínez, A. M., Delgado, J. V., Ginja, C., Jiménez, L. M., Jordana, J., Luis, C., Oom, M. M., Sponenberg, D. P., Zaragoza, P., Vega-Pla, J. L. (2017). *The legacy of Columbus in American horse populations assessed by microsatellite markers. Journal of Animal Breeding and Genetics*, (), – . doi:10.1111/jbg.12255

Cothran, E. G., Santos, S. A., Mazza, M. C. M. et al. Genetics of the Pantaneiro horse of the Pantanal region of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.3, p.343349, 1998.

Desjardins, P., Conklin, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp*. 2010 Nov 22;(45):2565. doi: 10.3791/2565. PMID: 21189466; PMCID: PMC3346308.

Egito, A. A. et al. Genetic variability of Pantaneiro horse using RAPD-PCR markers. R. Bras. Zootec., Viçosa, v.36, n. 4, p. 799-806, Aug. 2007. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982007000400007.

Fernández, J., Bennewitz, J. (2017) Defining genetic diversity based on genomic tools. In: Oldenbroek K (ed) Genomic management of animal genetic diversity. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 42-76.

Giacomoni, E. H., Fernández-Stolz, G. P., Freitas, T. R. O. Genetic diversity in the Pantaneiro horse breed assessed using microsatellite DNA markers. Genetics and Molecular Research 7 (1): 261-270 (2008)

Goulart, J. A., 1964. O cavalo na formação do Brasil. Editora Letras e Artes, Rio de Janeiro, 249p.

Hermesdorff, G. E., 1956. Zootecnia Especial. Tomo 1. Equídeos, Rio de Janeiro, 626p.

Li Y. L., Liu J. X. (2018). StructureSelector: a web based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources*. 18:176-177. DOI: 10.1111/1755-0998.12719.

Silva, L. A. C. da, Santos, S. A., Silva, R. A. S., McManus, C., Petzold, H. Adaptação do Cavalo Pantaneiro ao Estresse da Lida Diária de Gado no Pantanal, Brasil. (2005). Arquivos de zootecnia vol. 54, núm. 206-207, p. 510.

Torres, A. P., e W.R. Jardim, 1977. Criação do cavalo e de outros equídeos. 3. ed. Nobel, São Paulo. 654p.

Mariante, A. S., Cavalcante, N. **Animais do descobrimento**: raças domésticas da história do Brasil. Brasília: Embrapa - Cenargen, 2000. 232p.

McManus, C., Santos, S. A., Dallago, B. S. L., Paiva, S. R., Martins, R. F. S., Braccini Neto, J., Marques, P. R., Abreu, U. G. P. de (2013). *Evaluation of conservation program for the Pantaneiro horse in Brazil*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(6), 404–413. doi:10.1590/s1516-35982013000600004

Miserani, M. G., McManus, C., Santos, S. A., Silva, J. A. da, Mariante, A. da S., & Abreu, U. G. P. de. (2002). *Avaliação dos Fatores que Influem nas Medidas Lineares do Cavalo Pantaneiro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(1 suppl), 335–341. doi:10.1590/s1516-35982002000200007.

Nei, M. (1978). Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from A Small Number of Individuals. *Genetics*. 89. 583-90.

Paiva, S. R., Universidade Federal de Viçosa, Dezembro de 2005. Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares. Tese de doutorado.

Price, A., Patterson, N., Plenge, R. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* **38**, 904–909 (2006). <https://doi.org/10.1038/ng1847>.

Ribeiro, C. R., Fagliari, J. J., Galera, P. D., Oliveira, A. R. Hematological profile of healthy Pantaneiro horses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* [online]. 2008, vol.60, n.2, pp.492-495. ISSN 1678-4162. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000200033>.

Santos, S. A. Avaliação e Conservação do Cavalo Pantaneiro no Pantanal Mato-Grossense, In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.287-308.

Santos, S. A., Abreu, U. G. P., Comastri Filho, J. A., Sorares, R. J. Caracterização e conservação do cavalo Pantaneiro (2008). Embrapa Pantanal. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/812962/1/FOL134.pdf>.

Santos, S. A., McManus, C. M., Mariante, A. S. et al. A review of Conservation and Management of the Pantaneiro horse in the Brazilian Pantanal. **Animal Genetic Resources Information**, v.31, p.75-86, 2001.

Sereno, J. R. B., Santos, S. A., Zuccari, C. E. S. N., Mazza, M. C. M. Establishment of a breeding season and evaluation of the reproductive performance of the Pantaneiro horse in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Animal Genetic Resources Information**, v.21, p.43-48, 1997.

Sereno, F. T. P. de S., Sereno, J. R. B., Vega-Pla, J. L., Kelly, L., & Bermejo, J. V. D. (2008). *Genetic diversity of Brazilian Pantaneiro horse and relationships among horse breeds. Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43(5), 595–604.

SNP & Variation Suite™ (Version 8.x) [Software]. Bozeman, MT: Golden Helix, Inc. Available from <http://www.goldenhelix.com>.

Solis, A., Jugo, B. M., Mériaux, J. C. et al. Genetic diversity within and among four south European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: implications for conservation. **Journal Heredity**, v.96, n.6, p.670-678, 2005.

Weir, B. S., Cockerham, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of the population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358–1370, 1984.

Woolliams J. A., Oldenbroek, K. J. (2017) Genetic diversity issues in animal populations in the genomic era. In: Oldenbroek, K. (ed) Genomic management of animal genetic diversity. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, pp 13-47.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo: Extração de DNA de Sangue Total ou Células Brancas (Nitrogênio Líquido) com o Kit

Protocol: DNA Purification from frozen Whole Blood or White Cells (Liquid Nitrogen) with Pure Gene Kit (with adaptations from the original)

- 1) Pré-aquecer o banho maria a 37°C e incubadora adicional a 55°C;
 - a. Gelo ou água fria são sugeridos para armazenar as amostras caso haja algum atraso antes de iniciar
- 2) Rotular previamente os microtubos de 2,0 mL a serem utilizados;
- 3) Preparar o banho de gelo (ou água fria) a ser usado na etapa de precipitação proteica;
- 4) Descongelar amostras a 37°C por 2 min;
- 5) Aliquotar 400 uL do sangue total nos microtubos rotulados com a identificação dos animais;
- 6) Adicionar 1,0 mL de ddH₂O aos microtubos e agitar as amostras no vórtex para homogeneizar a mistura;
- 7) Centrifugar por 10 min a 14.000 rpm para formar *pellets* de células;
- 8) Remover o sobrenadante com pipeta ou derramando com cuidado para não derrubar os *pellets*;
- 9) Pipetar 1,5 mL de *RBC Lysis Solution* em cada tubo;
- 10) Agitar vigorosamente no vortex para ressuspender o *pellet*;

- 11) Incubar à temperatura ambiente por 10 min
- 12) Centrifugar por 10 min a 14.000 rpm para formar *pellets* de células;
- 13) Repetir passos 9 a 12 até que o sobrenadante atinja um tom rosa claro (caso necessário);
 - a. Geralmente necessário 2 a 3 lavagens com *RBC*.
- 14) Remover o sobrenadante com pipeta ou derramando com cuidado para não derrubar os *pellets*;
- 15) Pipetar 300 uL de *RBC Lysis Solution*;
- 16) Pipetar 500 uL de *Cell Lysis Solution*;
- 17) Adicionar 7 uL de Proteinase K (20ng/uL);
- 18) Lisar as células agitando vigorosamente por 20s no vórtex;
- 19) Incubar a 55°C por 2h ou de um dia para o outro;
- 20) Incubar amostras no gelo por 5min;
- 21) Pipetar 225 uL de *Protein Precipitation Solution* e agitar no vórtex vigorosamente por 20s;
- 22) Centrifugar por 8 min a 14.000 rpm para formar *pellets* de proteínas;
- 23) Pipetar 600 uL em 2 novos microtubos rotulados de 1.5 mL cada;
 - a. Cuidado para não incluir partículas do *pellet* de proteína ao pipetar
- 24) Adicionar 1 mL de isopropanol 100%;
- 25) Misturar as amostras invertendo gentilmente 50 vezes e incubar a -20°C por 1h;
 - a. Fios brancos ou grumos tendem a aparecer
 - b. É possível pausar o procedimento deixando as amostras incubadas a -20°C
- 26) Centrifugar por 20 min a 14.000 rpm para concentrar o DNA em pequenos *pellets* brancos;
- 27) Descartar sobrenadante e repousar tubos em superfície com papel limpo absorvente;
- 28) Adicionar 1 mL de etanol 70% e inverter os tubos diversas vezes para lavar o *pellet* de DNA;
- 29) Centrifugar a 14.000 rpm por 8 min a 10°C;
- 30) Descartar o etanol com cuidado. Os *pellets* formados podem se soltar. Inverter e drenar quaisquer resquícios líquidos em uma superfície com papel absorvente, deixando secar de 1 a 2 horas;
- 31) Adicionar 50 uL de *DNA Hydration Solution*
- 32) Reidratar o DNA incubando amostras por 30 min a 55°C;

33) Armazenar o DNA a 4°C. Para armazenamento de longa duração, armazenar a -20°C ou -80°C