



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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA CRIOLA
LAGEANA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE
ENRIQUECIMENTO DO BANCO BRASILEIRO DE GERMOPLASMA
ANIMAL**

DAÍZA ORTH

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE
2022**



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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA CRIOLA
LAGEANA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE
ENRIQUECIMENTO DO BANCO BRASILEIRO DE GERMOPLASMA
ANIMAL**

DAIZA ORTH

**ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE
RODRIGUES CAETANO**

**CO-ORIENTADOR: Dra. PATRÍCIA
IANELLA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 261/2022

**BRASÍLIA/DF
NOVEMBRO DE
2022**

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA CRIOULA
LAGEANA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE
ENRIQUECIMENTO DO BANCO BRASILEIRO DE GERMOPLASMA ANIMAL**

DAIZA ORTH

**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.**

APROVADA POR:

**ALEXANDRE RODRIGUES CAETANO, Doutor (Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia) (ORIENTADOR)**

**CONCEPTA MARGARET MCMANUS PIMENTEL, Doutora (Universidade de
Brasília) (EXAMINADOR INTERNO)**

**GERALDO MAGELA CORTES CARVALHO, Doutor (Embrapa Meio-Norte)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 01 DE NOVEMBRO DE 2022

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ORTH D. **Caracterização genética de bovinos da raça crioula lageana para determinação de estratégias de enriquecimento do banco brasileiro de germoplasma animal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2022, 56 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 a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

ORTH, Daiza. **Caracterização genética de bovinos da raça crioula lageana para determinação de estratégias de enriquecimento do banco brasileiro de germoplasma animal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2022. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2022.

1.Banco de germoplasma 2. Diversidade Genética 3. Conservação 4. Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Marisa e Afonso, por tudo que me proporcionaram para que fosse possível eu chegar aqui. Vocês são meus exemplos de amor e dedicação!

Ao meu irmão Daniel, sua esposa Elisabete e minhas sobrinhas Ana Lara e Ana Helena, que alegam imensamente a minha vida.

Ao meu marido José Henrique, pela paciência, apoio e amor! Você foi essencial por essa realização na minha vida, obrigada por tudo!

Aos meus amigos e colegas da Embrapa Aline, Fernanda, Kaífer, Nayelle e Noeliton por tornarem os dias de trabalho mais alegres e por toda ajuda que me deram. Não existem doces suficientes para agradecer-los!

Aos meus orientadores Dra. Patrícia Ianella e Dr. Alexandre Caetano, obrigada pela oportunidade, confiança, pelos ensinamentos, pelo tempo e paciência que me dedicaram. Vocês são exemplos de profissionais sérios e dedicados que buscam entregar o melhor de si.

Também quero agradecer a todas as pessoas envolvidas, produtores e pesquisadores que acreditaram no potencial e na conservação da raça Crioula Lageana. Sou imensamente grata pela oportunidade de contribuir com esse projeto.

Ademais, agradeço a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais da Universidade de Brasília e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela oportunidade de realização desse Mestrado. Que instituições de educação e pesquisa continuem sendo valorizadas, pois é através delas que uma sociedade justa é possível.

“A cada descoberta nova da ciência é uma porta pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela” - Albert Einstein

Sumário

CAPÍTULO 1	iv
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. A conservação e caracterização dos recursos genéticos	4
3.2. A história e formação da raça bovina Crioula Lageana	7
3.3. A caracterização da raça bovina Crioula Lageana	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
CAPÍTULO 2	20
1. INTRODUCTION	23
2. MATERIAL AND METHODS.....	25
2.1. Animal sampling and DNA extraction	25
2.2. SNP genotyping and Quality Control	25
2.3 Genetic Diversity and Effective Population Size (Ne) Estimates	26
2.4 Population Genetic Structure.....	26
2.5 Admixture analysis.....	26
3. RESULTS.....	28
3.1 Genetic diversity.....	28
3.1 Population Structure	31
3.5 Admixture analysis.....	32
4. DISCUSSION	35
5. REFERENCES	39
CAPÍTULO 3	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
SUPPLEMENTARY MATERIAL	44

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO DO BANCO BRASILEIRO DE GERMOPLASMA ANIMAL

RESUMO

A Crioula Lageana (CLAG) é uma raça taurina brasileira tradicionalmente criada nas regiões dos Campos de Cima da Serra nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. O presente estudo teve por objetivo analisar a diversidade genética e a estrutura populacional da raça para fornecer subsídios para a elaboração de estratégias para a conservação da raça, e o enriquecimento da coleção de amostras do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA). Amostras previamente armazenadas no BBGA, no Banco de DNA (BDNA) da Embrapa, e coletadas em oito fazendas localizadas na região de Lages (Santa Catarina), foram genotipadas com diferentes painéis de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) contendo entre 50K e 777K marcadores. As estimativas de heterozigosidade média esperada ($H_E = 0,373$) e observada ($H_O = 0,382$) obtidas sugerem a presença de altos níveis de variabilidade genética na raça. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que apenas 2,11% da variação genética observada pode ser atribuída a diferenças entre as diferentes populações analisadas. As estimativas de F_{ST} par-a-par obtidas variaram entre 0,002 e 0,056, corroborando que o grau de diferenciação entre as populações é baixo. As análises de estrutura de população evidenciaram subestruturações entre as populações estudadas, que puderam ser associadas com a presença/ausência de chifres nos animais, além de outros fatores. As estimativas obtidas para o tamanho efetivo populacional (N_e) das amostras do BBGA e do conjunto de amostras das oito fazendas foram 6 e 22, respectivamente, revelando que o N_e da raça está muito abaixo do recomendado pela FAO para conservação de populações de animais domésticos. Análises de estrutura e *admixture* de população comparando CLAG com seis outras raças de bovinos taurinos e zebuínos rotineiramente criadas na região revelaram evidências de possíveis introgressões com animais de origem índica. Os resultados obtidos apresentaram sólidos *insights* sobre a diversidade e estrutura genética da raça Brasileira CLAG e oferecem subsídios para o estabelecimento de estratégias eficazes de manejo genético para rebanhos de produção, e para o enriquecimento do banco de germoplasma BBGA e a conservação desta raça.

Palavras-Chaves: Conservação de Recursos Genéticos Animais, Diversidade Genética de Animais Domésticos, Bovinos Localmente Adaptados, Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs).

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE CRIOULO LAGEANO BREED TO DETERMINE ENRICHMENT STRATEGIES FOR THE BRAZILIAN ANIMAL GERMOPLASM BANK

ABSTRACT

The Crioulo Lageano (CLAG) is a Brazilian taurine breed traditionally raised in the regions of Campos de Cima da Serra in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The present study aimed to analyze the genetic diversity and population structure of the breed to provide subsidies for the development of strategies for the conservation of the breed, and the enrichment of the sample collection of the Brazilian Animal Germoplasm Bank (BBGA). Samples previously stored at BBGA, at Embrapa's DNA Bank (BDNA), and collected at eight farms located in the region of Lages (Santa Catarina, Brazil), were genotyped with different panels of SNP markers containing between 50K and 777K markers. Obtained estimates of average expected ($H_E = 0.373$) and observed ($H_O = 0.382$) heterozygosities suggest the presence of high levels of genetic variability in the breed. Molecular analysis of variance (AMOVA) revealed that only 2.11% of the observed genetic variation can be attributed to differences between the different populations analyzed. Obtained pairwise F_{ST} estimates varied between 0.002 and 0.056, corroborating that the degree of differentiation between populations is low. Population structure analyzes showed substructures between the studied populations, which could be related to the presence/absence of horns in the animals, in addition to other factors. The estimates obtained for the effective population size (N_e) of the BBGA samples and the set of samples from the eight farms were 6 and 22, respectively, revealing that the N_e of the breed is far below that recommended by FAO for conservation of domestic animal populations. Population structure and admixture analyzes comparing CLAG with six other taurine and zebu cattle breeds routinely raised in the region revealed evidence of possible introgressions with animals of indicine origin. Obtained results provided solid insights into the diversity and genetic structure of the Brazilian CLGA breed and offer subsidies for the establishment of effective genetic management strategies for production herds, and for the enrichment of the BBGA germplasm bank and the conservation of this breed.

KEYWORDS: Conservation of Animal Genetic Resources, Genetic Diversity of Domestic Animals, Locally Adapted Bovine Breeds, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

Os Bancos de Germoplasma Animal constituem um dos principais componentes na conservação de Recursos Genéticos Animais (RGAn). A efetividade dos bancos de germoplasma está amplamente associada ao uso dos recursos genéticos nele depositados e ao conhecimento da diversidade genética do material neles conservados (Blackburn, *et al.*, 2019). A diversidade dos RGAn é vital para a longevidade e sustentabilidade dos sistemas de produção e para que populações (raças, linhagens, etc.) possam responder aos processos de seleção natural e artificial para características de produção, os quais visam gerar aumentos de produtividade, de resistência/tolerância a parasitas e a doenças específicas, em condições climáticas e em sistemas produtivos variados e dinâmicos (Losos, 2010; Hoffmann, 2013).

Os bovinos foram introduzidos nas Américas durante o período de colonização, e no Brasil, bovinos originários principalmente da península Ibérica foram trazidos pelos colonizadores portugueses e espanhóis (Martinez *et al.*, 2012). Esses animais foram submetidos à seleção natural e artificial ao longo dos últimos 500 anos nos mais diversos ambientes, dando origem às diversas raças bovinas brasileiras adaptadas às características singulares das regiões em que se estabeleceram (Mariante e Egito, 2002). Tais raças adaptadas são de extrema importância pois apresentam níveis de diversidade genética superiores aos observados em raças comerciais (Hanotte e Jianlin, 2005; Campos *et al.*, 2017).

No entanto, estudos apontam que a diversidade genética nas espécies domesticadas de interesse para a pecuária tem diminuído rapidamente em nível global (Tisdell, 2003, Melka *et al.*, 2013; Krupa *et al.*, 2015, Kadlecik *et al.*, 2016). De acordo com dados da FAO, 12,70% das raças bovinas locais no mundo já foram extintas, e o maior número de raças em risco de extinção pertence ao grupo taurino (*Bos taurus*) (FAO-DAD-IS, 2022a). A extinção de qualquer raça é considerada uma perda irreversível de recursos genéticos e as raças com pequenos tamanhos populacionais, normalmente observados em raças localmente adaptadas, apresentam risco mais elevado de extinção (Biscarini *et al.*, 2015).

Os fatores econômicos são normalmente elementos muito significativos para a perda de raças localmente adaptadas, já que estas tendem a apresentar índices de produtividade menores que as raças comerciais (Biscarini *et al.*, 2015). Portanto, estratégias bem-sucedidas para a conservação dos RGAn geralmente devem incluir mecanismos para agregar valor de mercado aos produtos derivados dessas raças, como o registro de Indicação Geográfica (IG) (MAPA, 2021), assim como incluir atividades de caracterização, gestão, intercâmbio e

melhoramento genético dentro e entre rebanhos, considerando características que contribuam para aumentar sua produtividade nos respectivos ambientes e sistemas produtivos aos quais estão adaptados (Hiemstra *et al.*, 2006; FAO, 2007; Biscarini *et al.*, 2015).

No ano de 1983, a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologias incluiu a conservação de Recursos Genéticos Animais (RGA) como um de seus programas prioritários com o objetivo de evitar perdas do material genético das raças brasileiras. As estratégias de conservação de recursos genéticos estabelecidas possibilitam armazenar germoplasma que pode ser utilizado em demandas atuais ou futuras nos diversos sistemas de produção utilizados no Brasil (Mariante *et al.*, 2011; Paiva, *et al.*, 2014).

Dentro desse cenário, o bovino Crioulo Lageano, uma raça brasileira adaptada às regiões de Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul e ao Planalto Catarinense, conta atualmente com um plantel de aproximadamente 1.400 animais e está categorizada na lista da FAO como uma raça local em risco de extinção (FAO-DAD-IS, 2022b).

Essa raça apresenta grande potencial de mercado de carne a ser explorado (Mitterer-Daltoé *et al.*, 2012), podendo ser usada em cruzamentos com raças zebuínas e taurinas especializadas para a produção de carne de qualidade (Carvalho *et al.*, 2022). Além disso, trata-se de uma raça de dupla aptidão, podendo contribuir com pecuária leiteira com produtos diferenciados, como o queijo artesanal serrano com indicação geográfica (Carvalho, 2009; Pereira, 2018; SEBRAE, 2022; INPI, 2020). A raça apresenta também características únicas como tolerância a estresses climáticos (Castanheiro, 2011; Barbosa, 2017; Souto *et al.*, 2021) e resistência a enfermidades e a ectoparasitas (Cardoso *et al.*, 2014).

Os trabalhos realizados pela Embrapa de caracterização genética *in situ*, em rebanhos dos Núcleos de Conservação e rebanhos privados (Egito *et al.*, 2007; Paiva *et al.*, 2011; Silva, *et al.*, 2012), associados a estudos do germoplasma depositado *ex situ* no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), vêm contribuindo para geração de conhecimento sobre a diversidade genética da raça e a diversidade depositada no banco. No entanto, esforços mais amplos são necessários para direcionar a coleta de germoplasma (sêmen e embriões) e garantir uma ampla e eficiente amostragem de cada população, diminuindo custos e aumentando a eficiência dos programas de conservação dos RGA.

No contexto apresentado, o objetivo desse trabalho, foi de analisar e caracterizar amostras de germoplasma do bovino Crioulo Lageano armazenado no BBGA (*ex situ*) e comparar com a diversidade genética destes animais com rebanhos (*in situ*) de criadores associados à ABCCL, a fim de subsidiar o estabelecimento de estratégias eficientes para o enriquecimento do banco genético.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar a diversidade genética do germoplasma da raça bovina brasileira Crioula Lageana, por meio de chips de genotipagem de *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) de média densidade.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar estudos de caracterização genética das amostras de germoplasma BBGA e comparar a diversidade genética destes animais com rebanhos de bovinos da raça Crioula Lageana;
- Identificar amostras contidas no BBGA que eventualmente possuam elevado nível de miscigenação e reduzida certificação racial, para subsequente descarte;
- Prover subsídios para a elaboração de estratégias de enriquecimento para o Banco de Germoplasma da Embrapa.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A conservação e caracterização dos recursos genéticos

A conservação dos recursos genéticos animais (RGA) é uma necessidade globalmente reconhecida. O aumento populacional das últimas décadas, os desafios do setor pecuário em minimizar e mitigar os impactos ambientais negativos causados pelo segmento, e a crescente preocupação com a sustentabilidade ambiental jogaram luz sobre a necessidade de conservar recursos genéticos locais (Blackburn, 2007).

O desenvolvimento e a introdução em larga escala de técnicas de reprodução artificial, como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV), associadas a processos de avaliação e melhoramento genético, proporcionaram grandes avanços na produtividade de animais de interesse zootécnico a partir da década de 1950 (Barbosa *et al.*, 2008). Por outro lado, a concentração de uso baseado em raças comerciais específicas e redução no tamanho efetivo populacional (N_e) dessas raças (Wright, 1931), resultou na extinção de muitas raças localmente adaptadas e na erosão da variabilidade genética dos animais de interesse zootécnico.

No início dos anos 60, as comunidades científicas e agricultores reconheceram a necessidade de tomar medidas para abordar a conservação dos recursos genéticos (FAO, 1998). Durante a Conferência das Nações Unidas sobre o meio ambiente, no ano de 1972 em Estocolmo, reconheceu-se que a conservação é de extrema importância para qualquer programa de uso de recursos genéticos (FAO, 1972). Em 1975 apresentou-se uma lista das raças de animais com risco de extinção e, em 1980, foi realizada a primeira Consulta Técnica Global sobre Recursos Genéticos (FAO, 1984).

No ano de 2007 ocorreu a primeira Conferência Técnica Internacional sobre os Recursos Genéticos Animais para Agricultura e Alimentação, realizada em Interlaken na Suíça. Tal conferência resultou na geração do Plano de Ação Mundial para os Recursos Genéticos Animais, que incluiu 23 Prioridades Estratégicas destinadas a promover o manejo racional desses recursos vitais. No âmbito de tais estratégias, a conferência aprovou a Declaração de Interlaken, que firmou o compromisso dos países signatários em implantar um Plano de Ação Mundial e em garantir que a biodiversidade animal seja utilizada para a promoção da segurança alimentar e que continue disponível para as futuras gerações (FAO, 2007).

A conservação dos RGA é globalmente importante e, por meio de orientações dadas pela FAO, muitos países possuem bancos genéticos, também chamados bancos de

germoplasma, que buscam conservar seus recursos genéticos de raças comerciais e raras. Os Estados Unidos da América (EUA), por exemplo, apresentam um dos maiores reservatórios de seus recursos genéticos animais conservados (Paiva *et al.*, 2014; Blackburn *et al.*, 2019). A coleta e enriquecimento dos bancos busca alcançar um número mínimo de amostras de germoplasma necessárias para reconstituir uma raça em 150% com um tamanho populacional efetivo de 50 (FAO, 2012).

Os bancos de germoplasmas constituem um importante elemento da conservação de RGA e podem ser úteis para uma infinidade de papéis, atendendo assim às necessidades de curto e longo prazo das comunidades de pesquisa e mercado agropecuário. O acesso a diversidade genética contribui para melhorias na pecuária, permitindo aumento da produção de leite, carne e eficiência reprodutiva. Ademais, a perda da diversidade genética pode levar a um declínio dos recursos genéticos. Portanto, os bancos genéticos possibilitam armazenar esses importantes recursos para serem usados no futuro e garante a conservação de variabilidade genética existente (Blackburn, *et al.*, 2019).

Desde 1998 a Embrapa em parceria com universidades e empresas estaduais de pesquisa, realizam análises moleculares para embasar decisões estratégicas quanto à inclusão de novas raça no programa de conservação de recursos genéticos. O Programa de Conservação de Recursos Genéticos Animais da Embrapa está organizado em: (a) Núcleos de Conservação - animais vivos mantidos nos habitats em que as raças se adaptaram originalmente (*in situ*), e (b) Banco Genético / Banco de Germoplasma, responsável pela criopreservação de sêmen, embriões e ovócitos (*ex situ*) (Egito *et al.*, 2002). As coleções *ex situ* podem incorporar diferentes materiais biológicos e fornecer uma ampla variedade de serviços (fornecimento de germoplasma, DNA e informações) (Paiva *et al.*, 2014).

Estudos da diversidade genética de raças bovinas adaptadas localmente vem sendo realizados em vários países para compreender a estruturas genética dessas raças e quais são prioritárias para serem conservadas (Canãs-Álvarez *et al.*, 2015; Chen 2018; Browett *et al.*, 2018; Mastrangelo *et al.*, 2018; Peripolli *et al.*, 2020; Gamarra *et al.*, 2020; Senczuk *et al.*, 2020) bem como quais animais devem ser usados na montagem de coleções básicas e na seleção de animais com potencial fenotípico e genético para otimizar características de produção (Paiva *et al.*, 2016).

No Brasil, a Embrapa, além das atividades essenciais para a manutenção dos rebanhos conservados, realiza trabalhos de caracterização genética, tanto de rebanhos dos Núcleos de Conservação *in vivo* como de rebanhos privados (Paiva *et al.*, 2011; 2016; Silva *et al.*, 2012). Os dados genéticos dos animais provenientes dos núcleos de conservação de

fazendas de parceiros e das amostras depositadas nos bancos são comparados para direcionar as amostragens de sêmen e embriões para conservação *ex situ*, evitando que sejam armazenadas amostras redundantes e maximizando a variabilidade das amostras conservadas (Egito & Mariante, 2002; Mariante *et al.*, 2011).

Por meio das informações obtidas com a caracterização genética é possível tomar decisões mais assertivas de quais animais devem ser usados na montagem de coleções básicas e na seleção de animais com potencial fenotípico e genético para otimizar características de produção (Paiva *et al.*, 2016).

As ferramentas de genética molecular oferecem uma ampla gama de técnicas para a análise da variabilidade genética de recursos genéticos de interesse produtivo, permitindo inferências sobre os processos de domesticação, adaptação e a história das espécies dos animais de produção, fornecendo também informações essenciais para as decisões sobre sua conservação (Ajmone-Marsan *et al.*, 2010).

Avanços tecnológicos observados nas últimas décadas vêm contribuindo com o uso de metodologias de excelente desempenho e precisão a custos mais acessíveis (Bruford *et al.*, 2015). A caracterização e genotipagem com marcadores *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) alterou a velocidade e a forma como os dados genômicos e a caracterização molecular pode ser feita. O desenvolvimento de ferramentas para a análise de DNA que tem ocorrido nas últimas décadas aumentou a capacidade de caracterizar a variação dentro e entre raças, contribuindo para o estabelecimento de prioridades de conservação (Toro *et al.*, 2009; Eusebi *et al.*, 2019).

Vários parâmetros estatísticos são usados para estimar a diversidade genética, como por exemplo: heterozigosidade observada e esperada; corridas de homozigose (runs of homozygosity - ROH); estatísticas de Wright's F (F_{IT} , F_{IS} , F_{ST}); desequilíbrio de ligação (LD) e tamanho efetivo da população (N_e) (Al-mamun *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Eusebi, *et al.*, 2020; Bolaji *et al.*, 2021). A heterozigosidade mede a variação genética dentro de uma população (Nei, 1973) e as estatísticas de Wright's F são utilizados para estimar a diversidade genética dentro e entre populações (Wright, 1931).

De modo geral a estratégia de gestão para manter essa diversidade é baseada na diminuição da ancestralidade e da endogamia, sendo tal abordagem de fundamental importância na genética da conservação (Eusebi *et al.*, 2019). As estratégias de controle da endogamia podem incluir a seleção de indivíduos que representam a diversidade populacional (Heslot *et al.*, 2013; Meuwissen, 1997) e da análise de contribuição ótima - baseada em informações moleculares - que permite uma melhor identificação dos animais que mais contribuem para a

diversidade genética da população (Toro *et al.*, 2013).

Os animais selecionados podem utilizar o sequenciamento completo do genoma (WGS) para identificar alelos específicos, ou alelos raros, associados a características de interesse na pecuária, a fim de preservá-los (Eusebi *et al.*, 2019; Peripolli *et al.*, 2020). Novas tecnologias como Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) fornecem informações genéticas completas dos loci neutros e regiões codificantes dos indivíduos; assim, processos seletivos ou adaptativos podem ser estimados com mais precisão (Eusebi *et al.*, 2019).

Perspectivas futuras para análises de enriquecimento das coleções dos bancos podem ainda incluir a genética da paisagem (Blackburn *et al.*, 2019). A genética da paisagem fornece uma base para a avaliação de mudanças na estrutura genética de populações afetadas por condições ambientais (Manel, 2013). Ademais, novas tecnologias como o CRISPR-09 podem ampliar a contribuição e utilização dos bancos de germoplasmas uma vez que variantes de interesse podem ser identificadas e inseridas nas populações (Tan *et al.*, 2013; Blackburn, 2018; Jenko *et al.*, 2015;), assim como permitir a introdução da diversidade genética (Shen *et al.*, 2017).

3.2. A história e formação da raça bovina Crioula Lageana

O Crioulo Lageano é uma raça brasileira taurina adaptada localmente aos Campos de Cima da Serra no Rio Grande do Sul e do Planalto Catarinense. A formação dessa raça é resultado da seleção natural de quatro séculos no Planalto Sul-brasileiro a partir de animais miscigenados oriundos de diferentes raças ibéricas (Portuguesas e Espanholas) trazidas às Américas pelos colonizadores (Primo, 1992; 2004; Ginja, 2009; Ginja *et al.*, 2019).

Os primeiros lotes de gado bovino chegaram ao Brasil pouco mais de 30 anos após o descobrimento por Pedro Álvares Cabral. Entre 1533 e 1534, D. Ana Pimentel, esposa e procuradora do donatário Martim Afonso de Sousa, encomendou o primeiro lote de gado, procedente da ilha da Madeira, e levadas para a Capitania de São Vicente e outros dois pontos de entrada foram pela Bahia e por Pernambuco e nesses locais formaram os primeiros núcleos de criadores de gado. A partir daí o gado foi então sendo introduzido e espalhado para o interior do Brasil (Primo, 2004).

De acordo com Araújo (1990), a introdução de bovinos no Rio Grande do Sul foi realizada pelos jesuítas com o propósito de abastecer os povos das Missões. A primeira introdução ocorreu na Capitania del Rei (Rio Grande do Sul) em 1634 pelo Jesuíta Boliviano Cristóvão Mendonza, fundando a primeira estância sul-rio-grandense missioneira. Juntamente

com outro jesuíta, Pedro Romero, adquiriram de um rico Fazendeiro português Manuel Cabral de Alpoim, cerca de 1500 bovinos, e dividiu 90 animais para cada redução (Primo, 2004).

Por volta de 1700, os missionários em busca de terras seguras da invasão dos bandeirantes, ocuparam a região os Campos de Cima da Serra e transferiram uma grande quantidade de gado vacum para essa região, que ficou então conhecida como Vacaria del Pinãr. Essa região apresentava boa pastagem e água e possibilitou que os animais se multiplicassem e assim suprissem as necessidades das reduções jesuítas (Araújo, 1990).

Há também relatos de expedições espanholas e dos bandeirantes, que ao passarem com suas tropas na região do Planalto Catarinense contribuía com animais que se extraviavam das tropas ao embrenharem-se nas matas. Esses bovinos, afastados da domesticação, assumiam a uma condição feral, ficando conhecidos como “gado alçado” ou xucros, e estes, cruzavam -se com os animais da região (Araújo, 1990).

Por volta de 1730, os lagunistas descobriram a Vacaria del Pinãr com abundância de gado, abriram caminho por ásperos bosques e serras, e levaram uma grande quantidade de animais junto com suas tropas, o que quase causou a dizimação dos rebanhos da região. Porém em 1768, houve uma reintrodução de animais, trazidos pelos pioneiros que se assentaram na região de Lages/SC. Nessa época, as fazendas não eram cercadas e os animais ficavam isolados apenas pelos obstáculos naturais, possibilitando que bovinos de diferentes raças cruzassem (Martins, 2021).

A miscigenação entre as diferentes raças, somada aos processos de seleção natural com pouca interferência humana possibilitaram que essa população se adaptasse plenamente às condições de clima e pastagens da região (Mariante & Cavalcante, 2000). Portanto, o gado crioulo sul brasileiro é descendente dos primeiros bovinos introduzidos na região de São Vicente e cruzados com bovinos provenientes do Uruguai e Paraguai-Vicentino (Primo, 2004).

Esses animais conhecidos como bovinos Crioulos passaram posteriormente a ser chamados de “Crioulo Lageano”, pois a maioria do rebanho hoje encontra-se na região de Lages/SC. Essa raça alcançou uma grande importância no sul do país, tanto no contexto histórico quanto econômico entre 1869 e 1891, sendo o esteio da região por várias décadas (Mariante & Cavalcante, 2000).

Nos anos de 1980, a raça de bovinos Crioula Lageana chegou a ter aproximadamente 500 animais e isso fez com que a FAO os colocasse na lista de animais em risco de extinção (FAO, 1995). Diante desse cenário a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, a Universidade de Brasília e a Universidade Federal de Santa Catarina, em

colaboração com alguns criadores particulares, uniram esforços para proteger e conservar a raça.

A preservação da raça foi até então possível devido à percepção dos criadores da região quanto ao potencial genético desses animais. Em 2003 foi fundada a Associação Brasileira de Criadores da Raça Crioula Lageana (ABCCL) e hoje conta com mais de vinte sócios entre os estados de Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Martins, 2021). Após cinco anos da fundação da associação a raça bovina Crioula Lageana foi reconhecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Portaria 1048, publicada e editada pelo MAPA no dia 31 de outubro de 2008.

Atualmente a população do gado Crioulo Lageano é constituída por aproximadamente 1400 animais, e o plantel está distribuído em nove principais fazendas: A Fazenda Aurora, Fazenda Igrejinha, Fazenda Canoas, Fazenda Santa Rita do Passo da Telha, Fazenda Cadeia, Fazenda Bom Jesus do Herval, Fazenda Califórnia, Fazenda Horonata e a Fazenda Grande (ABCCL, 2021).

3.3. A caracterização da raça bovina Crioula Lageana

A diversidade genética observada nos bovinos localmente adaptados das Américas demonstra que a formação dessas raças se deu primordialmente pela influência do gado ibérico oriundos de Portugal e do sul da Espanha (Martinez *et al.*, 2012). De modo geral, observou-se que na composição das raças bovinas localmente adaptadas da América do Sul houve uma influência de 60% das raças taurinas ibéricas e uma pequena influência de outras raças taurinas europeias, raças africanas e raças zebuínas (Serrano *et al.*, 2004; Ginja *et al.*, 2009; Ginja *et al.*, 2019).

Em estudo realizado por Serrano (2004) sobre a diversidade e a estrutura da população das raças bovinas brasileiras localmente adaptadas demonstrou que, quando comparada à outras raças brasileiras, a raça Crioula Lageana compõe um grupo genético único, atestando a singularidade de sua população e a importância da conservação dessa raça.

A raça apresenta dimorfismo sexual, em que as fêmeas caracterizam-se por uma largura da garupa maior, devido à necessidade da passagem do bezerro ao nascer. A altura, largura e comprimento da garupa continuaram a aumentar entre 7,9,11 anos respectivamente. Tal característica possivelmente é devido ao fato de a raça não ter sido submetida a seleção artificial, como as raças comerciais, sendo a seleção e adaptação ao planalto catarinense os únicos condicionantes responsáveis pela biometria e dimensões da raça (Pezzini *et al.*, 2018).

Barbosa (2014) observou que as fêmeas desta raça apresentam bom crescimento nos primeiros dois anos de idade e adquirem a maturidade corporal a cerca de 27 meses, demonstrando bom desempenho produtivo, considerando que sua criação é realizada extensivamente e de forma natural. De acordo com estudo realizado Giacominio (2010) sobre a idade à puberdade novilhas da raça Crioula Lageana após a desmama a raça possui potencial de precocidade quando recebe alimentação adequada (Barbosa, 2017 e Souto *et al.*, 2021).

Os touros Crioulo Lageanos atingem a puberdade, em média, aos 14 meses de idade, oscilando de 12 a 18 meses (Souto *et al.*, 2017). Adicionalmente Cardoso (2009) observou que o período de maior aumento de Circunferência Escrotal (CE) ocorre entre 18 e 24 meses de idade, apontando que no caso da raça Crioula Lageana, os touros alcançam a maturidade sexual nessa faixa etária. A presença da variabilidade na precocidade dá indícios de que a raça tem bom potencial para melhoramento genético (Souto *et al.*, 2017).

A Crioula Lageana possui duas variedades a aspada (Figura 1, A e B), e a mocha (Figura 1, C). Os machos aspados possuem chifres longos, que se prolongam no sentido horizontal para as laterais, até se curvarem para frente e para cima, como uma espécie de gancho. As fêmeas, por sua vez, dispõem de chifres mais delicados com a porção distal elevada e as pontas voltadas para trás (Camargo & Martins, 2005). O manejo reprodutivo é realizado de forma separada entre as variedades, ou seja, os cruzamentos são realizados entre touros mochos com vacas mochas e touros aspados com vacas aspadas.

Com relação à coloração da pelagem, a raça apresenta grande variedade (Figura 2), com aproximadamente 40 tipos diferentes. Entre as mais comuns encontram-se a Africana Vermelha, Africana Preta, Baio, Preto, Jaguané, Oveiro Vermelho, Osco, Vermelho, Brasino, Churriado Salino, Nila, Berrenda em Preto ou Vermelho e Moura (Carvalho, 2019).

A raça Crioula Lageana é adaptada à região subtropical do Brasil, com condições climáticas específicas, alta altitude, temperaturas que variam de mais de 30°C no verão e menos de 0°C no inverno. Foi verificada nessa raça uma variação de animais de pelos longos e curtos, permitindo que esses animais sejam mais adaptados ao frio ou ao calor, respectivamente. A característica desse pelo e a variação de cores encontradas na raça Crioula Lageana provavelmente favorecem perdas de calor por condução, convecção e radiação, sendo que estes podem ser mecanismos termorreguladores relevantes para a raça (Souto *et al.*, 2021).

De acordo com estudo realizado por Souto (2021), com testes para avaliar a regulação térmica observou que touros CLAG podem sofrer estresse por calor, porém menos pronunciados que outra raça taurina, resultados esses que corroboram estudo realizado por Bianchini (2006), que observou que a raça é a menos adaptada ao clima do Centro-Oeste.

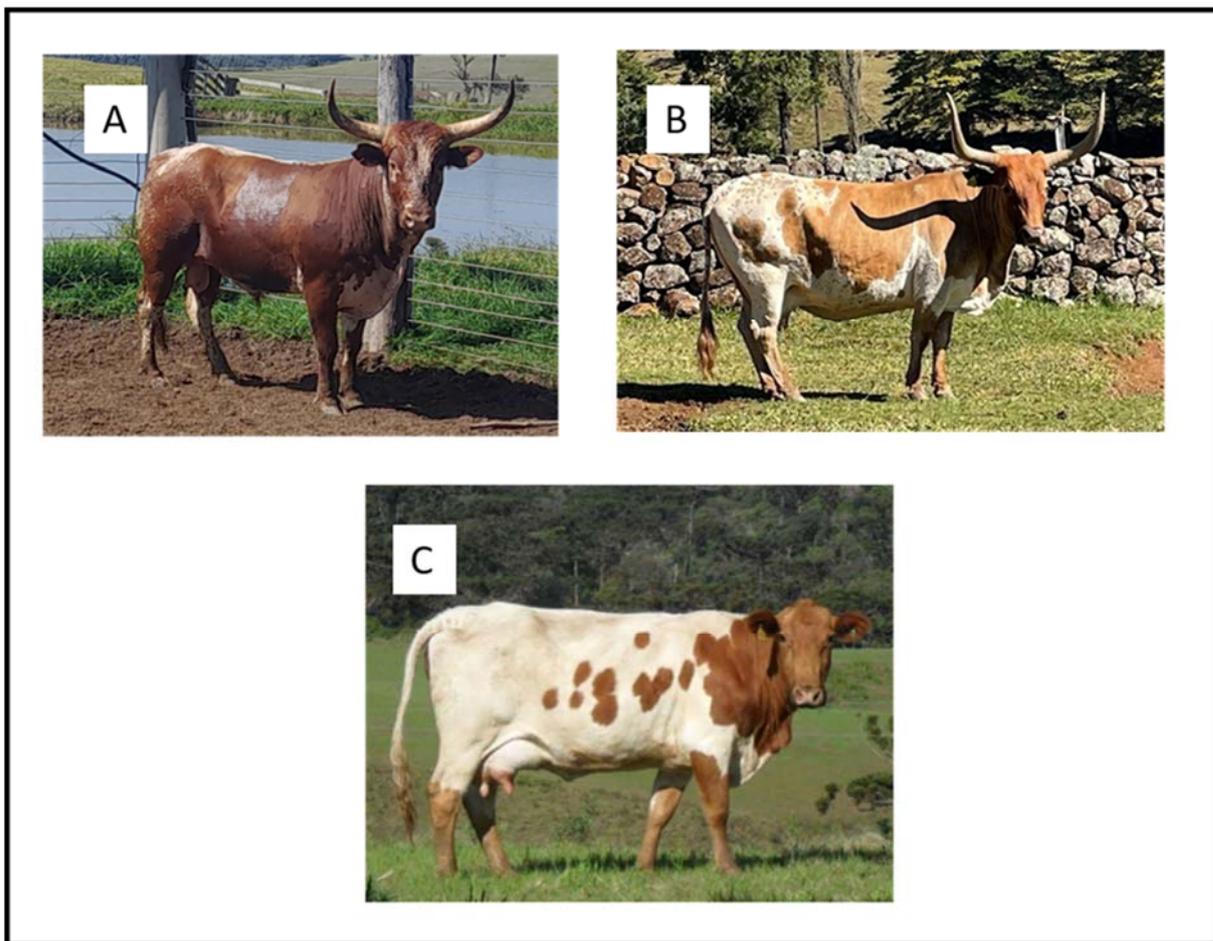


Figura 1 – A: Macho Aspada; B: Fêmeas Aspada e C: Fêmea Mocha.

Fonte A e B: Acervo pessoal cedida por Alexandre Floriani.; **C:** <https://www.rededobem.net/raca-crioulo-lageana/galeria-de-fotos>



Figura 2 – Rebanho Crioulo Lageano

Fonte: Acervo pessoal cedida por Alexandre Floriani.

O estresse por calor também é um fator importante na determinação dos ambientes de produção. As raças de alto rendimento geralmente não apresentam boa resistência ao estresse térmico e necessitam de ambientes adaptados às suas necessidades. Quando animais não adaptados são introduzidos a sistemas de produção sem a infraestrutura de apoio que os acompanha - e o fornecimento de insumos externos é precário - esses animais ficam mais vulneráveis aos efeitos diretos e indiretos das mudanças climáticas (Zwald et al., 2003).

Estudos indicaram que uma mutação no cromossomo bovino 20, em bovinos *Bos taurus*, produz uma característica de um pelo muito curto e com menor densidade de folículos conhecido como *Slick Hair*, a características desse pelo fornece tolerância em climas tropicais e subtropicais aos bovinos taurinos localmente adaptados (Mariasegaram et al., 2007). Porto-Neto (2018), observou que existe uma variação das mutações nesse gene que leva a essa característica, e foram observadas nas raças taurinas localmente adaptadas descendentes do gado crioulo espanhol. Estudos relatam uma frequência alélica de 16% do *Slick Hair* na raça Crioula Lageana, sugerindo que a raça apresenta potencial para seleção dessa característica (Peripolli et al., 2020; Faza et al. 2021).

Vale ressaltar ainda, quando comparada a outras raças taurinas, dentro do sistema de produção na qual a raça está adaptada, ela apresenta maior resistência a infestações por bernes e carrapatos (Cardoso et al., 2014). Adicionalmente, a adaptação da raça permite que essa seja criada nos sistemas de pastagens naturais da região do Planalto Catarinense, reduzindo assim o custo de produção. O que também contribui para sistemas produtivos mais sustentáveis (Camargo & Martins, 2005; Ribeiro et al., 1993).

O CLAG demonstra menor rendimento de carcaça em relação a outras raças taurinas (Veiga, 2011). Porém, quando comparada à raça Nelore (Zebuína), apresenta características de carcaça, proporções de cortes, composição química e textura que a indicam como uma candidata a oferecer um produto diferenciado (Mitterer- Daltoé et al., 2010).

Trabalhos de pesquisa demonstram inúmeras vantagens na exploração da raça Crioulo Lageano, nas condições de criação extensivas do Planalto Sul-brasileiro, não só como raça pura, mas também em cruzamentos (Spritze et al., 1999; 2003). A CLAG, em cruzamento com raças zebuínas e taurinas especializadas, pode ser utilizado para a produção de carne de qualidade (Afonso, et al., 2020; Carvalho et al., 2022). Isso demonstra o potencial da raça para a consolidação dentro da cadeia produtiva da carne e, como consequência, uma contribuição para a conservação desse importante recurso genético.

Sendo considerada uma raça de dupla aptidão contribui também com pecuária leiteira local. Os produtos derivados lácteos, como o queijo artesanal serrano, apresentam selo

de indicação geográfica, que contribuí para agregar valor aos produtos (Carvalho, 2009; Pereira, 2018; SEBRAE, 2022; INPI, 2020).

Além do mais Pereira (2018) identificou que na raça CLAG o alelo A2 encontra-se em uma frequência bastante superior à do alelo A1. A beta-caseína A2 é menos nociva à saúde humana, portanto, representa um diferencial para a indústria de leite (Kay *et al.*, 2021). Além disso, o uso de raças locais na conservação e melhoramento genético podem ser integrados à moderna indústria de gado leiteiro, contribuindo para evitar mais perdas genéticas de diversidade nas populações de gado leiteiro (Singh *et al.*, 2014; Gutierrez-Reinoso *et al.*, 2021; Brito *et al.*, 2021).

Diante desse cenário descrito, a utilização da raça Crioula Lageana tanto como raça pura ou em cruzamentos, surge como alternativa viável para maximizar a produção e a produtividade, sem aumentar custos e contribuindo para a sustentabilidade dentro do sistema produtivo, ao qual está adaptada. Com efeito, as características da raça justificam a importância de sua conservação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, T. M., CARVALHO, G. M. C., HADLICH, J. C., RODRIGUES, V. D. S., BARROS, D. A., VASCONCELOS, A. B. D., & IGARASI, M. S. Use of crosses for sustainability in livestock farming in the Brazilian Meio-Norte region. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 49, 2020.
- AJMONE-MARSAN, P.; GARCIA, J. F.; LENSTRA, J. A. On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. **Evolutionary Anthropology**, v. 19, n. 4, p. 148–157, 2010.
- ALBUQUERQUE, M.; EGITO, A.; MARIANTE, A. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51, n. 193, p. 7, 2002.
- AL-MAMUN, H. A., A CLARK, S., KWAN, P., & GONDRO, C. Genome-wide linkage disequilibrium and genetic diversity in five populations of Australian domestic sheep. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, n. 1, p. 1-14, 2015.
- ARAÚJO, R. V. **Os jesuítas dos 7 povos**. Porto Alegre: La Salle, 1990. 467 p.
- BARBOSA, E. A., EGITO, A. A., MARTINS, V. M. V., MARTINS, E., SILVA, J. P., & RAMOS, A. F. Caracterização da curva de crescimento de fêmeas Crioulas Lageanas criadas em condições naturais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1281–1286, 2014.
- BARBOSA, Eleonora Araujo. Características fisiológicas e seminais de touros de raças localmente adaptadas mantidas com e sem sombreamento. 2017.
- BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. Embrapa Pecuária Sudeste-Documents (INFOTECA-E), 2008.
- BIANCHINI, E., MCMANUS, C., LUCCI, C. M., FERNANDES, M. C. B., PRESCOTT, E., MARIANTE, A. D. S., & EGITO, A. A. D. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1443–1448, 2006.
- BISCARINI, F., NICOLAZZI, E. L., STELLA, A., BOETTCHER, P. J., & GANDINI, G. Challenges and opportunities in genetic improvement of local livestock breeds. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. JAN, p. 1–16, 2015.
- BLACKBURN, H. D. Biobanking genetic material for agricultural animal species. **Annual review of animal biosciences**, v. 6, p. 69-82, 2018.
- BLACKBURN, H. D. Integrating policies for the management of animal genetic resources with demand for livestock products and environmental sustainability. **Animal Genetic Resources Information**, v. 41, p. 53–64, 2007.
- BLACKBURN, Harvey D.; WILSON, Carrie S.; KREHBIEL, Bethany. Conservation and Utilization of Livestock Genetic Diversity in the United States of America through Gene Banking. **Diversity**, v. 11, n. 12, p. 244, 2019.
- BROWETT, Sam et al. Genomic characterisation of the indigenous Irish Kerry cattle breed. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 51, 2018.
- BRUFORD, M. W., GINJA, C., HOFFMANN, I., JOOST, S., OROZCO-TERWENGEL, P., ALBERTO, F. J., & ZHAN, X. Prospects and challenges for the conservation of farm animal genomic resources, 2015-2025. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 314, 2015.
- CAMARGO, M. A. R.; MARTINS, V. M. V. Raça bovina Crioula Lageana, um patrimônio genético. **Hora Vet**, v. 24, n. 143, p. 61-64, 2005.
- CAMPOS, B. M., DO CARMO, A. S., DO EGITO, A. A., DA MARIANTE, A. S., DO ALBUQUERQUE, M. S. M., DE GOUVEIA, J. J. S., ... & CARNEIRO, P. L. S. Genetic diversity, population structure, and correlations between locally adapted zebu and taurine breeds in Brazil using SNP markers. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 8, p. 1677–1684, 2017.

- CARDOSO, C. P., MARTINS, E., MARTINS, V. M. V., & JÚNIOR, A. D. P. M. Biometria testicular de touros da raça Crioula Lageana. **Agropecuária Catarinense**, v. 22, n. 3, p. 53-58, 2009.
- CARDOSO, C. P., SILVA, B. F., GONÇALVES, D. S., TAGLIARI, N. J., SAITO, M. E., & AMARANTE, A. F. Resistência contra ectoparasitas em bovinos da raça Crioula Lageana e meio-sangue Angus avaliada em condições naturais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 141-146, 2014.
- CARVALHO, G. M. C. Aspectos técnicos e científicos para a produção genéticos brasileiros a produção de bovinos compostos, tropicalmente adaptados, com o uso de recursos genéticos brasileiros. **Embrapa Meio-Norte**, n. 1, p. 1–21, 2019.
- CARVALHO, G. M. C., AZEVEDO, D., LIMA NETO, A. F., DE ARAUJO NETO, R. B., MONTEIRO, F. D. C., TEIXEIRA NETO, M. L., ... & RAMOS, A. F. Considerações técnicas sobre a produção de bovinos compostos, tropicalmente adaptados, com o uso da raça Crioulo Lageano. 2022.
- CARVALHO, V., MARTINS, V. M. V., RAMOS, A. F., MARTINS, E., MARIANTE, A. D. S., ALBUQUERQUE, M., ... & DO EGITO, A. A. Frequência alélica de genes candidatos relacionados à características produtivas na raça bovina brasileira Crioula Lageana visando sua inserção no mercado consumidor. In: **Simposio iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoogenéticos**, 10., 2009.
- CHEN, N., CAI, Y., CHEN, Q., LI, R., WANG, K., HUANG, Y., ... & LEI, C. Whole-genome resequencing reveals world-wide ancestry and adaptive introgression events of domesticated cattle in East Asia. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-13, 2018.
- CNA, 2021. Confederação Nacional da Agricultura. Disponível em: <<https://www.cnabrazil.org.br/cna/panorama-do-agro>>. Acesso em: 17/01/2022.
- EGITO, A. A., PAIVA, S. R., ALBUQUERQUE, M. D. S. M., MARIANTE, A. S., ALMEIDA, L. D., CASTRO, S. R., & GRATTAPAGLIA, D. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC Genetics**, v. 8, p. 1–14, 2007.
- EGITO, Andréa Alves do. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em Microssatélites e Haplótipos de DNA Mitocondrial: subsídios para a conservação**. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, UNB, Brasília, 2007.
- EPAGRI, 2021. Disponível em: <https://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepapublicacoes/Numeros_Agropecuaria_Catarinense_maio_2021_site.pdf>. Acesso em: 17/01/2022.
- EUSEBI, P. G., MARTINEZ, A., & CORTES, O. Genomic tools for effective conservation of livestock breed diversity. **Diversity**, v. 12, n. 1, p. 8, 2019.
- FAO - Animal Genetic Resources Information, Roma, 1984. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/q7426t/q7426t.pdf>>. Acesso em: 14/09/2021.
- FAO - COMMISSION ON GENETIC RESOURCES FOR FOOD AND AGRICULTURE ASSESSMENTS. Global plan of action for animal genetic resources and the Interlaken declaration. *World's Poultry Science Journal*, p. 286, Rome, Italy, 2007.
- FAO - DAD-IS, 2002a: Disponível em: < <https://www.fao.org/dad-is/risk-status-of-animal-genetic-resources/en/> >. Acesso em: 10/02/2022.
- FAO - DAD-IS, 2002b: Disponível em: <<https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/en/>> Acesso em: 10/02/2022.
- FAO - Food and Agriculture Organization. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans: management of small populations at risk. **Food and Agricultural Organization**, p. 215, 1998.

- FAO - Food and Agriculture Organization. Cryoconservation of Animal Genetic Resources; FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12; FAO: Rome, Italy, 2012.
- FAO - Report of the United Nations Conference on the Human Environment: Stockholm, 5-16 June 1972. Disponível em: < <https://digitallibrary.un.org/record/523249>>. Acesso em: 14/09/2021.
- FAZA, D. R. L. R., PEREIRA, H. P., EGITO, A. A., TORRES JÚNIOR, R. A. A., KIM, E. S., SONSTEGARD, T. S., ... & MACHADO, M. A. Desenvolvimento de protocolo de tetra-primer ARMS-PCR para genotipagem do SNP 39136666 do receptor da prolactina e avaliação desse SNP em raças bovinas brasileiras localmente adaptadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, p. 534-538, 2021.
- GAMARRA, D., TANIGUCHI, M., ALDAI, N., ARAKAWA, A., LOPEZ-OCEJA, A., & DE PANCORBO, M. M. Genetic characterization of the local pirenaica cattle for parentage and traceability purposes. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1584, 2020.
- GIACOMINI, K., MARTINS, V. M. V., MARTINS, E., CARDOSO, C. P., KLUGE, G., & LISBOA, S. R. Puberdade em novilhas da raça crioula lageana. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 1, p. 70-75, 2010.
- GINJA, C., GAMA, L. T., CORTÉS, O., BURRIEL, I. M., VEGA-PLA, J. L., PENEDO, C., ... & MARTINEZ, A. The genetic ancestry of American Creole cattle inferred from uniparental and autosomal genetic markers. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.
- GINJA, C., TELO DA GAMA, L., & PENEDO, M. C. T. Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 2, p. 148-157, 2009.
- HANOTTE, O., & JIANLIN, H. Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making. **The role of biotechnology**, p. 131-136, 2005.
- HESLOT, N., RUTKOSKI, J., POLAND, J., JANNINK, J. L., & SORRELLS, M. E. Impact of marker ascertainment bias on genomic selection accuracy and estimates of genetic diversity. **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. e74612, 2013.
- HIEMSTRA, S. J., DRUCKER, A. G., TVEDT, M. W., LOUWAARS, N., OLDENBROEK, J. K., AWGICHEW, K., DA SILVA MARIANTE, A. Exchange, use and conservation of animal genetic resources: policy and regulatory options. **Centre for Genetic Resources, the Netherlands (CGN)**, 2006
- HOFFMANN, Irene. Adaptation to climate change—exploring the potential of locally adapted breeds. **Animal**, v. 7, n. s2, p. 346-362, 2013.
- INPI: Disponível em <https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/arquivos/certificados-de-ig/assinado_certificado_br412017000006-3_campos-de-cima-da-serra.pdf>
- JENKO, J., GORJANC, G., CLEVELAND, M. A., VARSHNEY, R. K., WHITELAW, C. B. A., WOOLLIAMS, J. A., & HICKEY, J. M. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, n. 1, p. 1-14, 2015.
- KADLEČÍK, O., PAVLÍK, I., MORAVČÍKOVÁ, N., & KASARDA, R. Inbreeding and genetic diversity loss of four cattle beef breeds in Slovakia. **Acta fytotechnica et zootechnica**, v. 19, n. 2, p. 59-63, 2016.
- KAY, S. I. S., DELGADO, S., MITTAL, J., ESHRAGHI, R. S., MITTAL, R., & ESHRAGHI, A. A. Beneficial effects of milk having a2 β -casein protein: myth or reality? **The Journal of nutrition**, v. 151, n. 5, p. 1061-1072, 2021.
- KRUPA, E.; ŽÁKOVÁ, E.; KRUPOVÁ, Z. Evaluation of inbreeding and genetic variability of five pig breeds in Czech Republic. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 1, p. 25, 2015.
- LOSOS, Jonathan B. **The Princeton guide to evolution**. Princeton University Press, 2017.

- MANEL, Stéphanie; HOLDEREGGER, Rolf. Ten years of landscape genetics. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 10, p. 614-621, 2013.
- MAPA. Disponível em < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/selos-brasileiros-vaio-identificar-de-forma-unificada-produtos-com-indicacao-geografica> > Acessado em 10/02/2022.
- MARIANTE, A. D. S., ALBUQUERQUE, M., EGITO, A. A., PAIVA, S. R., & CASTRO, S. T. R. Conservação de raças brasileiras ameaçadas de extinção e a importância de sua inserção em sistemas de produção. **Agrociencia-Sitio en Reparación**, v. 9, n. 1-2, p. 459-464, 2005.
- MARIANTE, A. D. S., DO SM ALBUQUERQUE, M., EGITO, A. A., MCMANUS, C., LOPES, M. A., & PAIVA, S. Present status of the conservation of livestock genetic resources in Brazil. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 204-212, 2009.
- MARIANTE, A. da S.; ALBUQUERQUE, M.; RAMOS, A. F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 2, p. 64-68, 2011.
- MARIANTE, A. da S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Embrapa-Assessoria de Comunicação Social: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.
- MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: Result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 223-235, 2002.
- MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; EGITO, A. A. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de zootecnia**, v. 51, n. 193, p. 7, 2002.
- MARIASEGARAM, M., CHASE JR, C. C., CHAPARRO, J. X., OLSON, T. A., BRENNEMAN, R. A., & NIEDZ, R. P. The slick hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. **Animal Genetics**, v. 38, n. 1, p. 54-59, 2007.
- MARTÍNEZ, A. M., GAMA, L. T., CAÑÓN, J., GINJA, C., DELGADO, J. V., DUNNER, S., ... & ZARAGOZA, P. Genetic footprints of Iberian cattle in America 500 years after the arrival of Columbus. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49066, 2012.
- MARTINS, V. M. V. Crioulo Lageano: as qualidades de um rústico. **Editora Autografia**, 2021.
- MASTRANGELO, S., CIANI, E., AJMONE MARSAN, P., BAGNATO, A., BATTAGLINI, L., BOZZI, R., ... & PILLA, F. Conservation status and historical relatedness of Italian cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2018.
- MCMANUS, C., CASTANHEIRA, M., PAIVA, S. R., LOUVANDINI, H., FIORAVANTI, M. C. S., PALUDO, G. R., ... & CORRÊA, P. S. Use of multivariate analyses for determining heat tolerance in Brazilian cattle. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 3, p. 623-630, 2011.
- MCMANUS, C., PRESCOTT, E., PALUDO, G. R., BIANCHINI, E., LOUVANDINI, H., & MARIANTE, A. S. Heat tolerance in naturalized Brazilian cattle breeds. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 256-264, 2009
- MCMANUS, Concepta; SEIXAS, L. A Raça Crioula Lageana. **INCT: Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira**, 2010.
- MELKA, M. G., STACHOWICZ, K., MIGLIOR, F., & SCHENKEL, F. S. Analyses of genetic diversity in five Canadian dairy breeds using pedigree data. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 130, n. 6, p. 476-486, 2013.
- MEUWISSEN, T. H. E. Maximizing the response of selection with a predefined rate of inbreeding. **Journal of animal science**, v. 75, n. 4, p. 934-940, 1997.
- MITTERER-DALTOÉ, M. L., PETRY, F. C., WILLE, D. F., TREPTOW, R. O., MARTINS, V. M., & QUEIROZ, M. I. Chemical and sensory characteristics of meat from

- Nellore and Crioulo Lageano breeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2092–2100, 2012.
- NEI, Masatoshi. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.
- OREL, Vitezslav. **Genetic prehistory in selective breeding: A prelude to Mendel**. Oxford University Press, 2001.
- PAIM, P. Universidade De Brasília (UnB). **Ferramentas Genômicas Aplicadas À Conservação E Uso De Recursos Genéticos Animais**. Tese De Doutorado Em Ciências Animais Brasília/Df dezembro. 2018.
- PAIVA, S. R., FACÓ, O., FARIA, D. A., LACERDA, T., BARRETTO, G. B., CARNEIRO, P. L., ... & MCMANUS, C. Molecular and pedigree analysis applied to conservation of animal genetic resources: the case of Brazilian Somali hair sheep. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, n. 7, p. 1449-1457, 2011.
- PAIVA, S. R.; MCMANUS, C.; BLACKBURN, H. Conservation of animal genetic resources: the next decade. In: **Proceedings of the 10th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production**, Vancouver, BC, Canada. p. 17-22, 2014.
- PEREIRA, Tuane Capella et al. **Identificação dos alelos A1 e A2 para o gene da beta-caseína na raça Crioula Lageana**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- PERIPOLLI, E., REIMER, C., HA, N. T., GEIBEL, J., MACHADO, M. A., PANETTO, J. C. D. C., ... & DA SILVA, M. V. G. B. Genome-wide detection of signatures of selection in indicine and Brazilian locally adapted taurine cattle breeds using whole-genome resequencing data. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2020.
- PERTOLDI, C., PURFIELD, D. C., BERG, P., JENSEN, T. H., BACH, O. S., VINGBORG, R., & KRISTENSEN, T. N. Genetic characterization of a herd of the endangered Danish Jutland cattle. **Journal of Animal Science**, v. 92, n. 6, p. 2372–2376, 2014.
- PEZZINI, T. G., MARIANTE, A. S., MARTINS, E., PAIVA, S., RÔLO, J., SEIXAS, L., & MCMANUS, C. Biometric evaluation of Brazilian Crioula Lageana cattle. **Archivos de Zootecnia**, v. 67, n. 260, p. 604–608, 2018.
- PORTO-NETO, L. R., BICKHART, D. M., LANDAETA-HERNANDEZ, A. J., UTSUNOMIYA, Y. T., PAGAN, M., JIMENEZ, E., ... & SONSTEGARD, T. S. Convergent evolution of slick coat in cattle through truncation mutations in the prolactin receptor. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 57, 2018.
- PRIMO, A. El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. **Archivos de zootecnia**, v. 41, n. 154, p. 13, 1992.
- PRIMO, Armando Teixeira. **América: conquista e colonização: a fantástica história dos conquistadores ibéricos e seus animais na era dos descobrimentos**. Editora: Movimento, 2004, 183pag
- PRYCE, J. E., HAILE-MARIAM, M., GODDARD, M. E., & HAYES, B. J. Identification of genomic regions associated with inbreeding depression in Holstein and Jersey dairy cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 46, n. 1, p. 1-14, 2014.
- RIBEIRO, J. Gado Crioulo Lageano, uma alternativa sustentada para as pastagens naturais do Planalto Catarinense. **Simpósio da 30ª Reunião Anual da SBZ. Anais. Rio de Janeiro**, 1993.
- SCRAGGS, E., ZANELLA, R., WOJTOWICZ, A., TAYLOR, J. F., GASKINS, C. T., REEVES, J. J., ... & NEIBERGS, H. L. Estimation of inbreeding and effective population size of full□blood wagyu cattle registered with the American Wagyu Cattle Association. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 131, n. 1, p. 3-10, 2014.
- SEBRAE. Disponível em: < <https://datasebrae.com.br/ig-campos-de-cima-da-serra/> >. Acesso em: 17/01/2022.

- SENCZUK, G., MASTRANGELO, S., CIANI, E., BATTAGLINI, L., CENDRON, F., CIAMPOLINI, R., ... & CASSANDRO, M. The genetic heritage of Alpine local cattle breeds using genomic SNP data. **Genetics Selection Evolution**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2020
- SERRANO, G. M., EGITO, A. A. D., MCMANUS, C., & MARIANTE, A. D. S.L. Genetic diversity and population structure of Brazilian native bovine breeds. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 543-549, 2004.
- SHEN, L., HUA, Y., FU, Y., LI, J., LIU, Q., JIAO, X., WANG, K. Rapid generation of genetic diversity by multiplex CRISPR/Cas9 genome editing in rice. **Science China Life Sciences**, v. 60, n. 5, p. 506-515, 2017.
- SILVA, M.C, DE M VETTORI, J., DE SOUZA, K. M., MILETTI, L. C., VOGEL, C. I. G., LIMA, A. L. F., & FONTEQUE, J. H. High prevalence of *Anaplasma marginale* in the Crioula Lageana cattle. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 06, p. 623-630, 2020.
- SILVA, M.C.; BOAVENTURA, V. M.; FIORAVANTI, M. C. S. História do povoamento bovino no Brasil Central. **Revista UFG**, v. 13, n. 13, 2012.
- SOUTO, P. L. G., BARBOSA, E. A., MARTINS, E., MARTINS, V. M. V., HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K., PIMENTEL, C. M. M., & RAMOS, A. F. Influence of season and external morphology on thermal comfort and physiological responses in bulls from two breeds adapted to a subtropical climate. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 22, 2021.
- SOUTO, P. L. G., MCMANUS, C., ZAGO, F. C., MARTINS, E., FONTEQUE, J. H., DO EGITO, A. A., & RAMOS, A. F. Reproductive characteristics of Crioulo Lageano breed bulls (*Bos taurus*) at puberty. **Animal Reproduction (AR)**, v. 14, n. 4, p. 1034-1042, 2018.
- SPRITZE, Á.L, EGITO, A. A. D., MARIANTE, A. D. S., & MCMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1157–1164, 2003.
- SPRITZE, Á.L.; SERRANO, G. M. S.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Consanguinidade e intervalo entre partos da raça Crioulo Lageano. In: **Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe - SIRGEALC**, 2, Brasília, 1999.
- 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.
- TAN, W., CARLSON, D. F., LANCTO, C. A., GARBE, J. R., WEBSTER, D. A., HACKETT, P. B., & FAHRENKRUG, S. C. Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 41, p. 16526-16531, 2013.
- TISDELL, C. Socioeconomic causes of loss of animal genetic diversity: **Analysis and assessment. Ecological Economics**, v. 45, n. 3, p. 365–376, 2003.
- TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 174-195, 2009.
- VEIGA, T. F. Raça Crioula Lageana [dissertação]: estudo de Características de carcaça e relação entre morfologia e Intervalo entre partos. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Agroecossistemas - Florianópolis, SC, 2011.
- WRIGHT, Sewall. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97, 1931.
- ZWALD, N. R., WEIGEL, K. A., FIKSE, W. F., & REKAYA, R. Identification of factors that cause genotype by environment interaction between herds of Holstein cattle in seventeen countries. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 3, p. 1009-1018, 2003.

CAPÍTULO 2

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE CRIOULO LAGEANO BREED TO DETERMINE ENRICHMENT STRATEGIES OF THE BRAZILIAN ANIMAL GERMOPLASM BANK

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA PARA DETERMINAÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE ENRIQUECIMENTO DO BANCO BRASILEIRO DE GERMOPLASMA ANIMAL

RESUMO

A Crioula Lageana (CLAG) é uma raça taurina brasileira tradicionalmente criada nas regiões dos Campos de Cima da Serra nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. O presente estudo teve por objetivo analisar a diversidade genética e a estrutura populacional da raça para fornecer subsídios para a elaboração de estratégias para a conservação da raça, e o enriquecimento da coleção de amostras do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA). Amostras previamente armazenadas no BBGA, no Banco de DNA (BDNA) da Embrapa, e coletadas em oito fazendas localizadas na região de Lages (Santa Catarina), foram genotipadas com diferentes painéis de marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) contendo entre 50K e 777K marcadores. As estimativas de heterozigosidade média esperada ($H_E = 0,373$) e observada ($H_O = 0,382$) obtidas sugerem a presença de altos níveis de variabilidade genética na raça. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que apenas 2,11% da variação genética observada pode ser atribuída a diferenças entre as diferentes populações analisadas. As estimativas de F_{ST} par-a-par obtidas variaram entre 0,002 e 0,056, corroborando que o grau de diferenciação entre as populações é baixo. As análises de estrutura de população evidenciaram subestruturações entre as populações estudadas, que puderam ser associadas com a presença/ausência de chifres nos animais, além de outros fatores. As estimativas obtidas para o tamanho efetivo populacional (N_e) das amostras do BBGA e do conjunto de amostras das oito fazendas foram 6 e 22, respectivamente, revelando que o N_e da raça está muito abaixo do recomendado pela FAO para conservação de populações de animais domésticos. Análises de estrutura e *admixture* de população comparando CLAG com seis outras raças de bovinos taurinos e zebuínos rotineiramente criadas na região revelaram evidências de possíveis introgressões com animais de origem índica. Os resultados obtidos apresentaram sólidos *insights* sobre a diversidade e estrutura genética da raça Brasileira CLAG e oferecem subsídios para o estabelecimento de estratégias eficazes de manejo genético para rebanhos de produção, e para o enriquecimento do banco de germoplasma BBGA e a conservação desta raça.

Palavras-Chaves: Conservação de Recursos Genéticos Animais, Diversidade Genética de Animais Domésticos, Bovinos Localmente Adaptados, Polimorfismos de nucleotídeo único.

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE CRIOULO LAGEANO BREED TO DETERMINE ENRICHMENT STRATEGIES FOR THE BRAZILIAN ANIMAL GERMOPLOASM BANK

ABSTRACT

The Crioulo Lageano (CLAG) is a Brazilian taurine breed traditionally raised in the regions of Campos de Cima da Serra in the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. The present study aimed to analyze the genetic diversity and population structure of the breed to provide subsidies for the development of strategies for the conservation of the breed, and the enrichment of the sample collection of the Brazilian Animal Germoplasm Bank (BBGA). Samples previously stored at BBGA, at Embrapa's DNA Bank (BDNA), and collected at eight farms located in the region of Lages (Santa Catarina, Brazil), were genotyped with different panels of SNP markers containing between 50K and 777K markers. Obtained estimates of average expected ($H_E = 0.373$) and observed ($H_O = 0.382$) heterozygosities suggest the presence of high levels of genetic variability in the breed. Molecular analysis of variance (AMOVA) revealed that only 2.11% of the observed genetic variation can be attributed to differences between the different populations analyzed. Obtained pairwise F_{ST} estimates varied between 0.002 and 0.056, corroborating that the degree of differentiation between populations is low. Population structure analyzes showed substructures between the studied populations, which could be related to the presence/absence of horns in the animals, in addition to other factors. The estimates obtained for the effective population size (N_e) of the BBGA samples and the set of samples from the eight farms were 6 and 22, respectively, revealing that the N_e of the breed is far below that recommended by FAO for conservation of domestic animal populations. Population structure and admixture analyzes comparing CLAG with six other taurine and zebu cattle breeds routinely raised in the region revealed evidence of possible introgressions with animals of indicine origin. Obtained results provided solid insights into the diversity and genetic structure of the Brazilian CLGA breed and offer subsidies for the establishment of effective genetic management strategies for production herds, and for the enrichment of the BBGA germplasm bank and the conservation of this breed.

KEYWORDS: Conservation of Animal Genetic Resources, Genetic Diversity of Domestic Animals, Locally Adapted Bovine Breeds, Single Nucleotide Polymorphisms.

1. INTRODUCTION

Crioulo Lageano (CLAG) is a Brazilian taurine breed traditionally raised in the Campos de Cima da Serra region in Rio Grande do Sul State, and Santa Catarina State plateau (Mariante & Cavalcante, 2000). The breed was formed from crosses of different Iberian breeds which were brought to the Americas by Portuguese and Spanish colonizers (Primo, 1992; 2004; Ginja *et al.*, 2009; Ginja *et al.*, 2019), followed by over four centuries of selection mostly for type and production traits with little pedigree control or any formal breeding programs or structured genetic evaluations (Mariante & Cavalcante, 2000).

Between the 1980s and the beginning of the 2000s, the total CLAG census reached 500 animals (Mariante & Trovo, 1989; Spritze *et al.*, 2003). Currently, there are approximately 1,400 animals in the breed, which places it in the rank of a local breed in risk of extinction considering the Food and Agriculture Organization (FAO) guidelines (FAO-DAD-IS). Joint efforts between Embrapa, the University of Brasilia and the Federal University of Santa Catarina were established in the early part of this century to conserve the breed (Spritze *et al.*, 1999; 2003; Pezzini *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2014; Rosa *et al.*, 2017; Souto *et al.*, 2018;). The Brazilian Association the Crioulo Lageano Breeders (ABCCL) was founded in 2003, and the breed was recognized by the Brazilian Agriculture, Livestock and Supply Ministry (MAPA) in 2008.

The CLAG breed has a historical importance to the economy of its region of origin. As a dual-purpose breed adapted to low-input production systems in high altitude native fields in a subtropical climate, it is less vulnerable to seasonal climatic variations (Souto *et al.*, 2021), while having higher resistance to ticks (*Rhipicephalus microplus*) and botflies (*Oestridae*) in comparison to other taurine breeds (Cardoso *et al.*, 2014). Certified dairy products from CLAG milk, such as the Serrano cheese, have obtained geographical indication (GI) certification (SEBRAE, 2022; INPI, 2020), while CLAG beef has high potential for commercialization as a GI certified product (Mitterer-Daltoé *et al.*, 2012). Altogether, these achievements have positively contributed to adding value to locally produced beef and dairy products and consequently to the conservation of the breed.

The conservation of animal genetic resources provides opportunities for establishment of strategies for dealing with the future changes and adaptations in livestock production systems, contributing to sustainable development of agriculture and animal

production activities (Toro *et al.*, 2009). Genetic resource management and conservation of livestock populations on farm (*in situ*) and in gene banks (*ex situ*) are essential to maintain genetic diversity and structure while avoiding extinction, especially of small locally adapted breeds. However, conservation programs usually focus efforts to cryopreserve germplasm (i.e., semen and embryos), as opposed to maintaining live animals, to lower direct and indirect costs and operational demands on infrastructure and labor (Bolaji *et al.*, 2021). Gene bank collections also provide safeguards against emerging diseases, political instability, and natural disasters (Van Breukelen *et al.*, 2019).

Efficient management practices are important to identify and prioritize which animals should be sampled and conserved in gene banks. Appropriate strategies should conserve sample sets encompassing the genetic diversity within the respective breeds (Smith, 1984), with effective population sizes (N_e) of at least 50, to therefore ensure proper reconstitution of a breed when necessary. Identification of key animals for germplasm sampling can be achieved using pedigree analysis, however, genomic analyses with Single Nucleotide Polymorphism (SNP) panels of varying densities provide more accurate information for evaluation of current gene bank collections and identification of candidate animals for new sample collections (Bolaji *et al.*, 2021).

Currently available genomic tools provide a broad spectrum of techniques to assess the genetic variability of genetic resources relevant to production purposes and also contribute to the understanding of processes associated with domestication, adaptation and breed history, while providing valuable information for establishment of conservation strategies (Ajmone-Marsan *et al.*, 2010; Eusebi *et al.*, 2019; Bolaji *et al.*, 2021).

The Brazilian Animal Germoplasm Bank (BBGA) is operated by Embrapa Genetics Resources and Biotechnology and currently encompasses a collection of over 121.000 germplasm units from 889 animals of different species (buffalo, cow, donkey, goat, horse, sheep and aquatic species, with a special focus on Brazilian breeds and native species (Embrapa – Alelo Animal). The objective of this study was to characterize CLAG germplasm samples from BBGA and to compare the observed diversity and genetic structure of these animals with CLAG samples from ABCCL associated herds, to provide insights for establishing efficient germplasm sampling and conservation strategies for enrichment of this important gene bank.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animal sampling and DNA extraction

Table 1 lists origins of all sampled animals. A total of 25 samples was derived from the Brazilian Animal Germplasm Bank (BBGA, Embrapa – Alelo Animal), while 43 samples were obtained from Embrapa’s DNA Bank (BDNA). The remaining 452 analyzed samples were obtained from eight different farms registered in the Brazilian Association of Crioulo Lageano Cattle Breeders (ABCCL).

Table 1. Crioulo Lageano sample origins.

POP	MALE	FEMALE	Total
BBGA	25	0	25
BDNA	43	0	43
F1	5	54	59
F2	25	50	75
F3	2	22	24
F4	19	111	130
F5	1	8	9
F6	11	18	29
F7	0	85	85
F8	6	35	41
TOTAL	137	383	520

DNA was extracted either from bull semen straws, blood samples collected with tubes with Ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) or with FTA cards, using different methods according to sample type. DNA quality and quantity were evaluated by electrophoresis in 1% agarose gels and by spectrophotometry with a NanoDrop™ 8000.

2.2. SNP genotyping and Quality Control

DNA samples from farms (n = 452) were genotyped with the Bovine GGP 100K BeadChip, while samples from BBGA (n = 25) were genotyped with the Illumina Bovine SNP50 and samples from BDNA (n = 43) with the Illumina Bovine HD BeadChip (777SNPs), BeadChips. Datasets were merged with SNP &Variation Suite v8.x (SVS. Golden Helix. Bozeman. MT. USA) and autosomal SNPs which were common to all datasets were retained for further processing.

The merged dataset was filtered based on call rate both per SNP and per sample (Call Rate ≥ 0.90). Additional SNPs were eliminated based on Minor Allele Frequency (MAF ≤ 0.05), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE $p < 0.01$) and Linkage Disequilibrium (LD - markers with r^2 values < 0.5 in a 50 SNP sliding window). Identity-by-Descent (IBD) analyses were performed between sample pairs to estimate kinship relationships and inbreeding levels and to also identify and eliminate duplicated samples (Purcell *et al.* 2007).

2.3 Genetic Diversity and Effective Population Size (N_e) Estimates

Genetic variation within breed was quantified by calculating expected (H_E) and observed heterozygosity (H_O), and Fisher's Fixation Index (F_{IS}) with Arlequin v. 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005). To assess the genetic differentiation among populations, pairwise F_{ST} estimates were obtained according to Weir and Cockerham (1984) with Arlequin v. 3.5. An UPGMA tree was constructed based on pairwise F_{ST} estimates between the ten studies populations with MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021).

Analyses of molecular variance (AMOVA) were performed with Arlequin v. 3.5. Contemporary effective population size (N_e) estimates were obtained for BBGA and a group formed with all remaining samples using NeEstimator v.2.01 (Do *et al.*, 2014), considering estimates of Linkage Disequilibrium (LD), using different criteria for excluding rare alleles (MAF ≤ 0.05 , 0.02 or 0.01).

2.4 Population Genetic Structure

Principal Component Analysis (PCA) was performed with quality-controlled datasets using SVS (Price, 2006). Population structure analyses were performed using ADMIXTURE 1.3 software (Alexander *et al.*, 2009). Cross-validation procedure (6-fold) was used to estimate prediction errors for each number of clusters (from 2 to 6), and the best K value was obtained with the CLUMPAK pipeline (Kopelman *et al.*, 2015) with the Evanno method (2005).

2.5 Admixture analysis

The CLAG quality-controlled dataset was merged with additional reference data from six breeds which are commonly raised in small and commercial farms in the region (Angus – ANG: $n = 42$; Charolais – CHA: $n = 20$; Gyr – GYR: $n = 27$; Hereford – HFD: $n = 35$; Nelore

– NEL: $n = 31$; Simmental – SIM: $n = 30$). These additional data were obtained from the WIDDE database (Sempéré *et al.* 2015). Datasets were merged with SVS and autosomal SNPs common to all datasets were retained for further analysis. The resulting merged dataset was filtered based on call rate both per SNP and per sample (Call Rate ≥ 0.90), Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE $p < 0.001$) and Linkage Disequilibrium (LD - markers with r^2 values < 0.5 in a 50 SNP sliding window). The merged quality-controlled dataset was submitted to PCA, Admixture and F_{ST} analysis as described before.

3. RESULTS

3.1 Genetic diversity

The resulting dataset following data quality control procedures contained 12.961 SNPs and 492 CLAG samples. Mean expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity and estimated Fisher Fixation Indexes (F_{IS}) for each population are shown in Table 2. Mean population H_O varied from 0.376 (F3 and F7) to 0.4 (F8). Overall H_O mean considering all sampled populations was 0.381. Estimated inbreeding levels were low across all studied populations, ranging from -0.008 (BBGA) to -0.114 (F5).

Table 2. Mean expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosities and estimated Fisher Fixation Indexes (F_{IS}) for all Crioulo Lageano tested populations.

Population	<i>n</i>	H_O	H_E	F_{IS}
BBGA	20	0.381	0.378	-0.00886
BDNA	38	0.390	0.386	-0.01650
F1	59	0.399	0.394	-0.01479
F2	70	0.380	0.375	-0.01496
F3	21	0.376	0.363	-0.04056
F4	128	0.378	0.373	-0.01981
F5	9	0.381	0.343	-0.11408
F6	29	0.381	0.375	-0.01910
F7	77	0.376	0.370	-0.01623
F8	41	0.400	0.392	-0.02327
Total	492	0.3819	0.3733	-0.01976

n: number of animals

Pairwise F_{ST} estimates between all populations ranged from 0.002 to 0.056. The smallest pairwise F_{ST} estimate was observed between F6 and F7, while the largest was observed between F2 and F5. Populations F1 and F5 showed the highest F_{ST} values in comparison with BBGA (Table 3).

Table 3. Pairwise F_{ST} estimates between 10 Crioulo Lageano populations.

	BBGA	BDNA	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
BBGA										
BDNA	0.012									
F1	0.029	0.009								
F2	0.017	0.012	0.019							
F3	0.021	0.020	0.038	0.024						
F4	0.018	0.015	0.027	0.022	0.030					
F5	0.044	0.039	0.054	0.055	0.046	0.049				
F6	0.022	0.017	0.025	0.022	0.034	0.003	0.050			
F7	0.022	0.018	0.030	0.026	0.036	0.005	0.048	0.002		
F8	0.026	0.012	0.006	0.024	0.037	0.025	0.042	0.023	0.026	

All pairwise estimates were significant ($p > 0.05$)

The UPGMA tree (Figure 1) constructed with pairwise F_{ST} estimates shows that BBGA and BDNA samples are within a cluster which also contains F1, F2 and F8. F4, F6 and F7 form a different cluster while F3 and F5 remained as single branches.

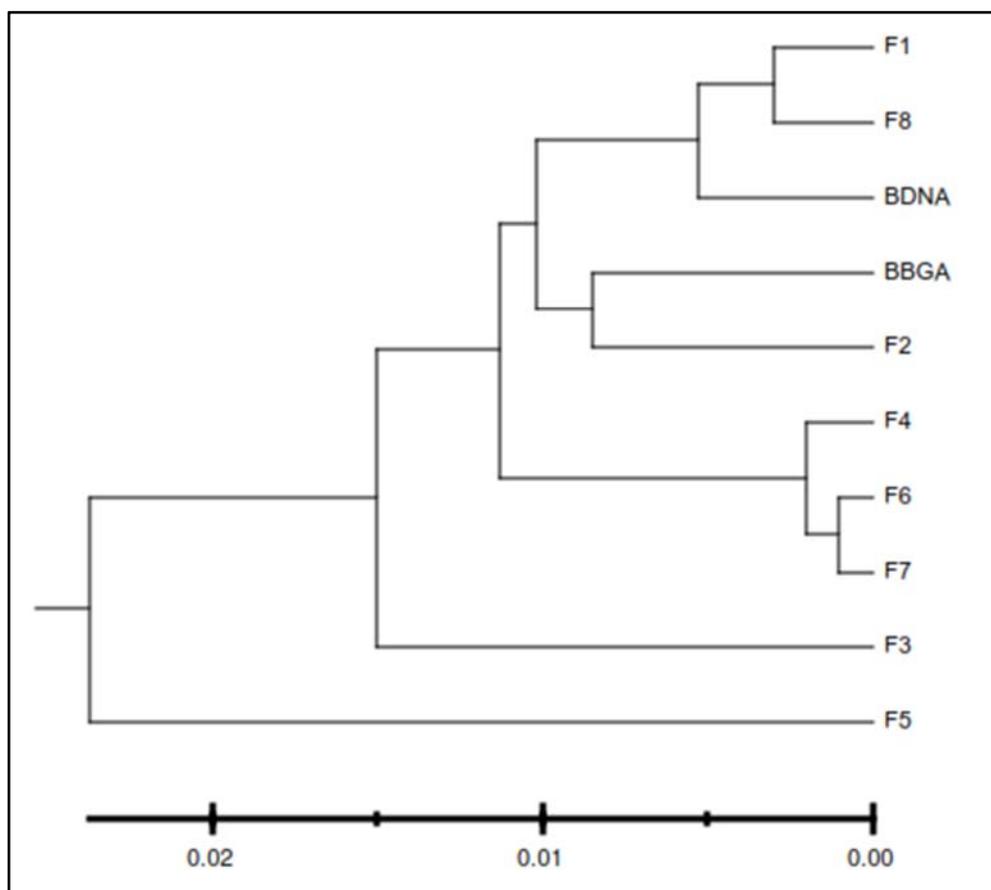


Figure 1: UPGMA tree based on pairwise F_{ST} estimates between the ten studied Crioulo Lageano populations

AMOVA results revealed that 2.11% of the overall observed variation can be attributed among populations, while 99.82% of the overall variation was observed within individuals (Table 4).

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) of the Crioulo Lageano populations.

Source of Variation	d.f	Variance Components	Percentage of variation
Among populations	9	5,178.96	2.11
Among individuals within population	481	-47,469.44	-1.93
Within individuals	491	244,947.15	99.82
Total	918	245,379.16	

Estimated effective population sizes (N_e) for BBGA and a group formed with all sampled animals from farms (CLAG) for different MAF critical values of 0.05, 0.02 and 0.01 are shown in Table 5. BDNA samples were not used to estimate N_e .

Table 5. The effective population size (N_e) with 95% confidence interval.

	CLAG			BBGA		
<i>n</i>	435			19		
MAF	0.050	0.020	0.010	0.050	0.020	0.010
Ne	21.5	21.5	21.5	6.0	2.5	2.5

CLAG: group of all animals from farms; n : number of animals; MAF: critical Minor Allele Frequency value for elimination of SNP markers; N_e : Effective population size.

3.1 Population Structure

Figure 2A shows PCA results using the final quality-controlled dataset, where PCA1 and PCA2 accounted for 7.56% and 5.42% of observed variation, respectively. Germplasm samples from BBGA show overlap with all studied sample groups, while animals with distinct genomic profiles can be observed within all sampled farms.

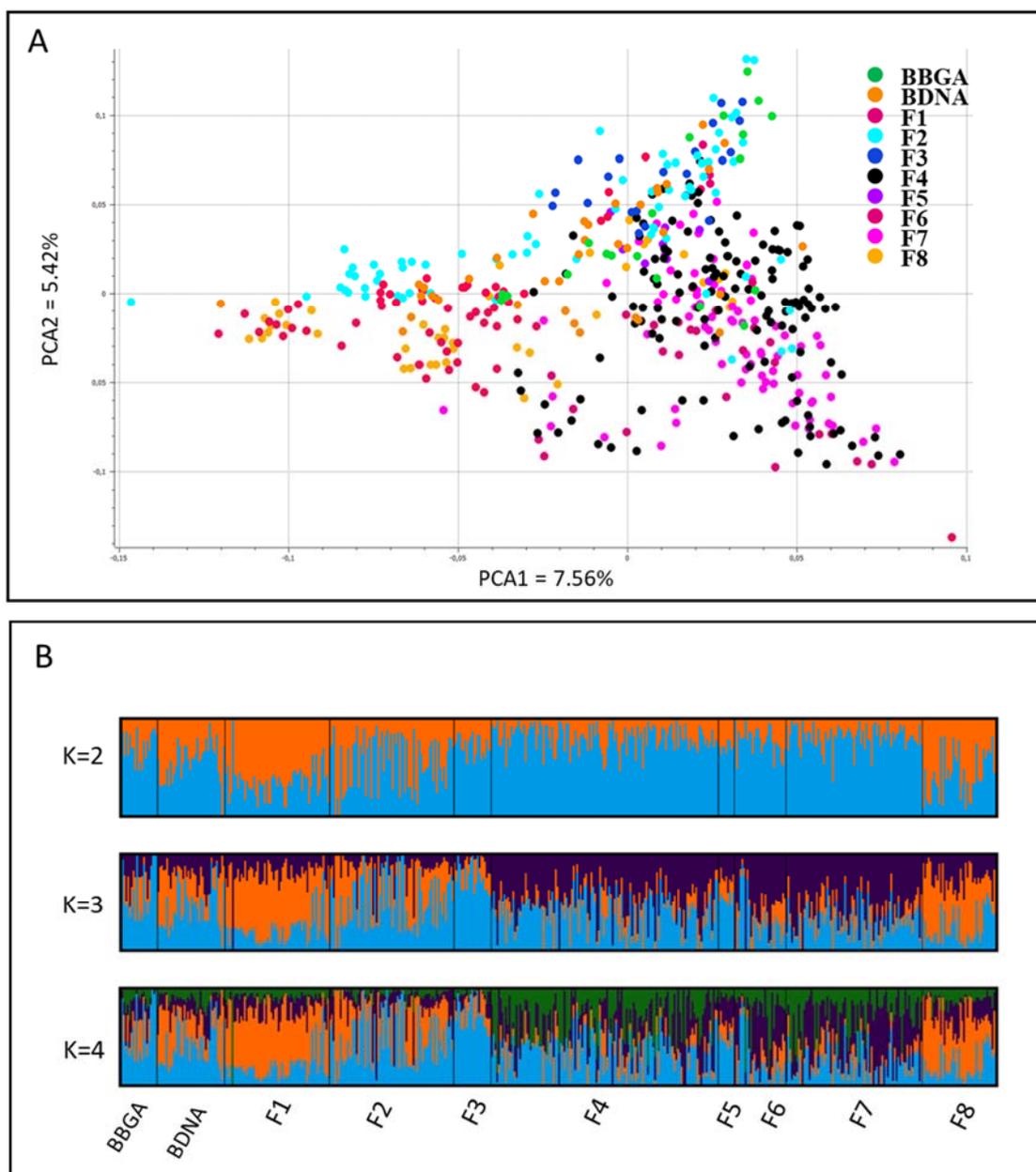


Figure 2 Population structure observed of all studied Crioulo Lageano populations (A) Projection of all individuals considering the top two estimated principal components using PCA - Farms (F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8), Brazilian Animal Germplasm Bank (BBGA) and Embrapa's DNA Bank (BDNA). (B) Structure plots for K 2 to 4. Each animal is represented by a vertical line divided into K clusters, where length of the colored segment represents the estimated proportion of membership to a particular cluster. Black lines separate individual populations.

Figure 2B shows results from ADMIXTURE analysis for K=2 to 4. At K=2, there is a differentiation between population F1, F2, F8 and population F4, F5, F6 and F7. At K=3, this differentiation between the population is more evident. At K=4, F3 and F5 population differ from the other populations by forming substructures. F1 and F8 have similar structures. At K=4, BBGA and BDNA show similarities in structure with other populations, suggesting they contain most of the genetic variability observed within the breed. Additional figures up to K=6 are shown in supplementary material Figure 2.1. The most appropriate number of clusters was estimated to be 3, considering the method proposed by Evanno (2005) (Supplementary material Figure 2.2).

3.5 Admixture analysis

The resulting dataset considering data from CLAG and six additional breeds contained 7.494 SNPs and 698 samples. PCA results obtained with quality-controlled data from all CLAG samples and reference samples from additional breeds (ANG, CHA, GYR, HFD, NEL and SIM) are shown in Figure 3A, where PCA1 and PCA2 accounted for 27.44% and 11.89% of the observed variation, respectively. A clear separation between taurine cattle and indicine cattle can be observed, while no CLAG samples were observed to overlap with any of the other breed clusters.

Figure 3B shows ADMIXTURE results considering all studied breeds showing the same pattern found in PCA. At K=2, a clear separation between taurine cattle (ANG, CHA, HFD and SIM) and indicine cattle (NEL and GYR) can be observed. Optimal genomic clustering was observed with K=7 (Supplementary material Figure 3.2) for the seven analyzed populations, where NEL and GIR (*Bos indicus*) animals form a common homogeneous group. ANG (*Bos taurus*) is the most homogeneous group and differs from other taurine breeds. CLAG appear to be highly admixed, with varying contributions from the other breeds. Additional results are shown in Supplementary Material Figure 3.1

F_{ST} estimates between seven breeds are shown in Table 6. Taurine breeds (ANG, CHA, HDF and SIM) show values between 0.347 and 0.354 in relation to indicine breeds (NEL and GYR, respectively). The greatest difference between CLAG and taurine breeds was observed with ANG (0.115), while the smallest difference was with CHA (0.072). Genetic distance between NEL and GYR and CLAG were 0.168 and 0.162, respectively.

Table 6. Pairwise F_{ST} estimates between all studied breeds.

	CLAG	ANG	CHA	GYR	HFD	NEL
CLAG						
ANG	0.115					
CHA	0.072	0.096				
GYR	0.162	0.339	0.341			
HFD	0.097	0.109	0.078	0.335		
NEL	0.168	0.350	0.354	0.073	0.347	
SIM	0.084	0.107	0.053	0.330	0.084	0.342

Crioulo Lageano – CLAG; Angus – ANG; Charolais – CHA; Gyr – GIR; Hereford – HFD; Nelore – NE; Simmental – SIM. All pairwise estimates were significant ($p > 0,05$)

Table 7 shows the estimated proportions of each breed in the seven most likely inferred clusters, revealing that 11% of CLAG can be assigned to cluster 2, which contains 99% of NEL and GYR.

Table 7. Proportion of estimated composition for each studied breed considering each of seven clusters inferred in ADMIXTURE analysis

	1	2	3	4	5	6	7	n
CLAG	0.286	0.110	0.157	0.029	0.208	0.175	0.035	513
ANG	0.004	0.001	0.026	0.934	0.012	0.006	0.017	42
CHA	0.010	0.000	0.482	0.106	0.216	0.016	0.169	20
GYR	0.000	0.999	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	26
HFD	0.020	0.002	0.125	0.050	0.064	0.006	0.732	35
NEL	0.001	0.999	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	31
SIM	0.004	0.005	0.498	0.068	0.236	0.003	0.185	30

Crioulo Lageano – CLAG; Angus – ANG; Charolais – CHA; Gyr – GYR; Hereford – HFD; Nelore – NEL; Simmental – SIM. Inferred clusters: 1 (Blue), 2 (Orange), 3 (Purple), 4 (Green), 5 (Plun Color), 6 (Light pink), 7 (Red); *n*: number of animals.

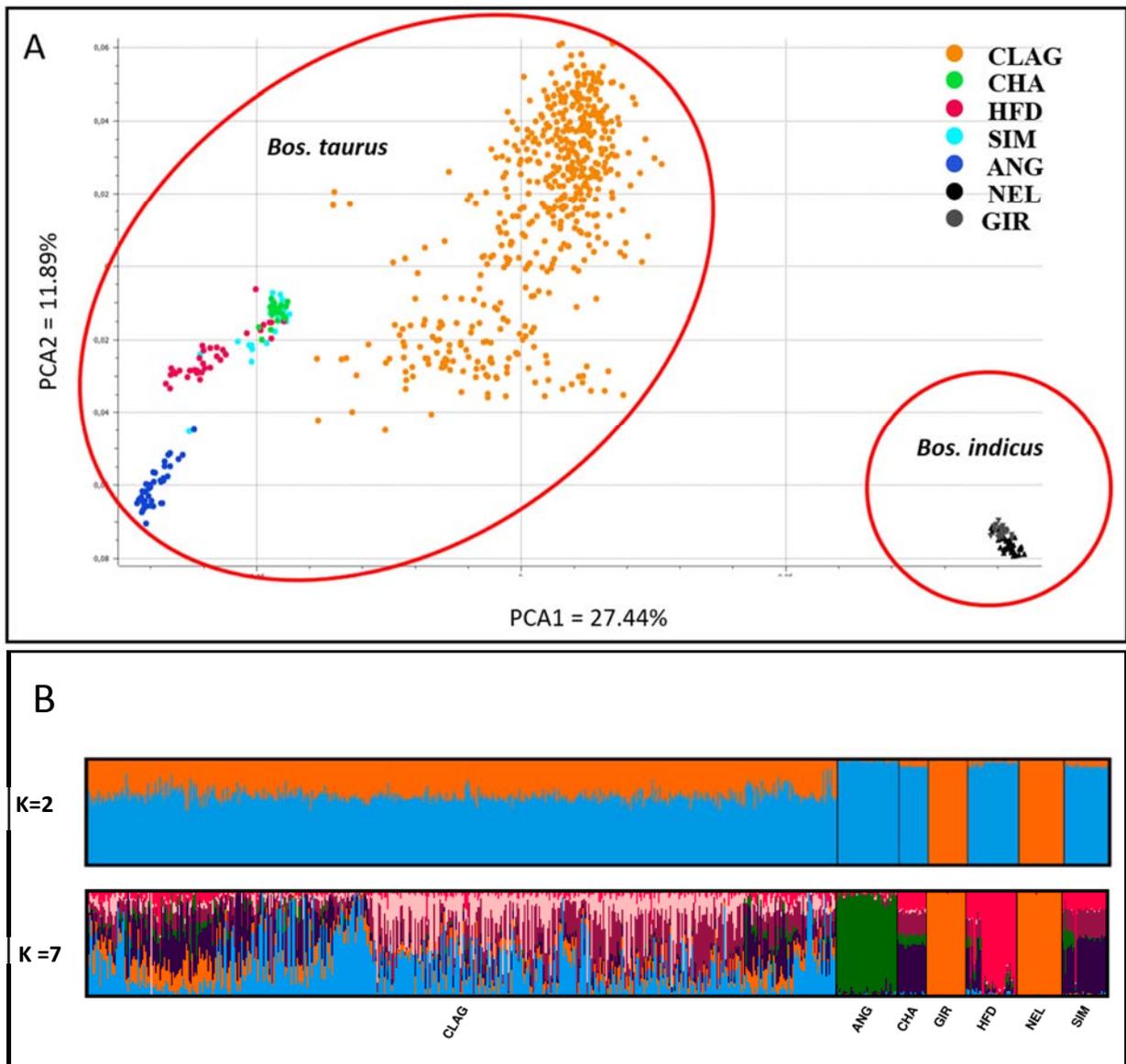


Figure 3 Genetic structure observed for Crioulo Lageano and six reference breeds, where PCA1 and PCA2 accounted for 27.44% and 11.89% of the observed variation, respectively. (A) PCA plot of all individuals from seven breeds considering the top two estimated principal components. The circles indicate separation between *Bos taurus* from *Bos indicus*. (B) Structured plots for K=2 and k=7. Breed codes: Crioulo Lageano (CLAG), Angus (ANG), Charolais (CHA), Gyr (GYR), Hereford (HFD), Nelore (NEL) and Simmental (SIM). Each animal is represented by a vertical line divided into K clusters, where length of the colored segment represents the estimated proportion of membership to a particular cluster. Black lines separate individual populations.

4. DISCUSSION

Analysis of the genetic diversity and structure of different CLAG populations was performed using genomic data from germplasm samples collected in 1980's and 90's and stored in the BBGA and BDNA, in comparison with contemporary samples collected in eight different farms. The analysis was focused on understanding the breed's genetic structure in these two time points and if genetic diversity of the CLAG breed is represented within the BBGA gene bank. Obtained results generated critical information to support the establishment of future germplasm sampling and conservation strategies, as well as to help guide on-farm genetic management and improvement programs for the breed.

Knowledge about the genetic diversity and population structure of livestock species has been very important for management, sustainable use and conservation of available genetic resources from both commercial and locally adapted breeds (Groeneveld *et al.*, 2010; Makina *et al.*, 2014). The successful establishment and maintenance of functional and effective gene banks is highly dependent on thorough genetic analysis of collected germplasm samples, to ultimately reflect the available genetic structure and variability of genetic resources of interest. Observed genetic variability and structure within and between sampled populations allows gene bank managers and potential users to understand and optimize uses of germplasm collections for multiple roles and applications, thereby supplying solutions for short-, -mid and long-term goals for food production across different environments, production systems and market demands (Blackburn *et al.*, 2018).

A solid overall picture of the CLAG genetic diversity and population structure was obtained, considering different approaches and analyses. The average observed heterozygosity for all analyzed samples ($H_o = 0.381$) suggests high levels of genetic diversity are currently present in the breed, which are comparable with similar observations in other cattle breeds (Dash *et al.*, 2018, Mastrangelo *et al.*, 2018, Karimi *et al.*, 2016). The range of observed heterozygosity (from 0.376 in F3 and F7 to 0.400 in F8) suggests similar levels of diversity are present in all analyzed populations. Heterozygosity levels observed in BBGA (0.381) and BDNA (0.390) were similar to contemporary herds, suggesting overall genetic diversity within the breed has been conserved over the last 3-4 decades. Negative F_{IS} estimates were obtained for all studied populations, reflecting higher observed heterozygosities than expected. Increased heterozygosity levels may be a consequence of current breeding systems used in all herds, which maximize the use of bull sires from different herds, which has also been previously suggested by Sermayagin (2018) in a study of Russian cattle.

AMOVA results showed that only 2.11% of the observed genetic variation is due to differences among populations. The low level of differentiation among populations was also corroborated by observed pairwise F_{ST} estimates, which ranged from 0.002 (between F6 and F7) and 0.055 (between F2 and F5). Admixture analysis estimated the best K to be 3 (Supplementary material Figure 2.2), where two clusters differentiating F1, F2, F3 and F8 from F4, F5, F6 and F7 can be observed, suggesting a sub-structuring process is underway within the breed. This result is also corroborated by observed PCA and F_{ST} values between these populations. Observed results are consistent with the separation of CLAG into two subgroups, which are also associated with presence/absence of horns. BBGA, F4, F5, F6 and F7 are composed of horned animals, while the remaining populations are mainly comprised of polled animals.

Known records about individual herd histories further corroborate overall observed results about the genetic structure and distance between sampled populations. F1 and F8 showed the smallest pairwise estimated F_{ST} (0.006), which is consistent with the farms' history. F1 (polled) and F7 (horned) herds were established from animals derived from F8 (polled). F_{ST} values observed between horned populations F4 and F6 (0.003), F4 and F7 (0.005) and F6 and F7 (0.002) also corroborate the history of these farms (Table 3 and Figure 1), as F4 and F7 animals were derived from F6. F5 showed the highest F_{ST} estimates across all the other studied groups (Table 3 and Figure 1). However, this population had a small sample size ($n = 9$), which may have biased the analysis, inflating the observed estimates. FAO guidelines for genetic analysis of local breeds suggest a minimal sample size of 25 (Oldenbroak, 2007). Nevertheless, the high estimated pairwise F_{ST} values for farm F5 is in agreement with the history of this herd, as ABCCL herd book records and personal communications with the farm's management show that this farm does not usually exchange germplasm with the other registered farms.

The F2 population is the closest to the BBGA, which is consistent with the high numbers of semen samples from this herd known to be stored in BBGA. These results represent examples of priority groups for germplasm collection for future enrichment of BBGA, and illustrate how guided sampling may contribute to conservation of genetic resources.

The effectiveness of conservation strategies for locally adapted breeds is especially dependent on precise management of available germplasm to avoid inbreeding and maintain minimal effective population sizes (N_e) along generations. Maintaining acceptable N_e is key for genetic conservation activities, as it provides a solid parameter for accessing risks of extinction of endangered populations (Meuwissen, 1997). N_e tells the history of the population,

accounting for inbreeding and genetic drift events, and provides the prospects for the sustainability of the population if the current effective size is maintained along future generations (Wang *et al.*, 2016). According to several studies and FAO recommendations, N_e of at least 50 individuals are needed to reduce the rate of inbreeding to less than 1% per generation, and therefore ensure the long-term survival of a breed, maintaining acceptable levels of genetic variability over generations (Blackburn, 2018).

Pezzini (2018) carried out a pedigree-based study considering historical ABCCL herdbook records to estimate N_e for CLAG to be 29. In the present study, N_e considering all CLAG samples was estimated to be 21 and varied between 3 and 6 for BBGA, considering different MAF cutoffs. Differing results from these studies can be explained by the different methodologies used, but nonetheless indicate that N_e for CLAG is below FAO guidelines for long-term conservation of domestic animal populations.

Observed N_e estimates are within expected levels, considering the overall CLAG herd size and past known population bottlenecks (Mariante & Trovo, 1989; Spritze *et al.*, 2003). Even though CLAG estimated N_e is below FAO recommended levels, observed high levels of genetic diversity and low levels of inbreeding are indicative that adequate management strategies are being practiced, helping therefore to maintain this breed with lower risks of extinction. Different strategies such as the inclusion of additional herds into management strategies, which would expand the use of maximum numbers of registered CLAG bull sires across herds, may help increase N_e for future generations, and should also consider banking germplasm samples for enrichment of BBGA.

Ex-situ conservation programs usually focus efforts to cryopreserve germoplasm (i.e., semen and embryos), as opposed to maintaining live animals, to lower direct and indirect costs and operational demands on infrastructure and labor (Bolaji *et al.*, 2021). Current germoplasm stored at BBGA has an estimated N_e of six (6), clearly showing that further germplasm sampling is urgently needed to reflect the breed's estimated N_e for production herds. Current results provide information for designing strategies, setting priorities for conservation and selecting individuals for composition of germplasm bank.

Additional conservation priorities can be taken into consideration for selecting individuals for germaplasm banking, such as unique variants for specific traits of interest in a particular breed, which may include adaptive and production traits, measured physically or with the use of molecular genetic markers (Bolaji *et al.*, 2021). Slick hair is a coat genetic variant shown to provide major advantages for maintaining normal core temperatures during heat stress, which is an important attribute for cattle in in tropical and subtropical climates

(Mariasegaram *et al.*, 2007). Previous studies reported an allelic frequency of 16% of Slick Hair in the CLAG breed (Peripolli *et al.*, 2020; Faza *et al.*, 2021), suggesting that the breed has the potential for selection of this trait, which may affect further use of the breed in additional regions of Brazil and in other tropical and subtropical countries. Slick hair genotyping data may therefore be considered for selecting bull sires for breeding and semen collection and banking and should be considered in overall genetic management of the breed.

Past admixture events should be carefully considered when selecting individuals for germplasm banking (Freeman *et al.*, 2004; Manel *et al.*, 2005). Crossbreeding with commercial breeds is a common practice used in livestock industry to improve productivity, while benefiting from adaptive characteristics of locally adapted breeds (Leroy *et al.*, 2016). However, this practice has the potential to cause loss of breed-specific characteristics and can speed up breed extinction processes (Taberlet *et al.*, 2008; Woolliams *et al.*, 1994), especially when poor record-keeping procedures are observed. Spritze (2003) suggested that CLAG has suffered introgressions from other breeds, including Nelore (*Bos indicus*), which was further reasoned by Peripolli *et al.* (2020) who observed CLAG samples with 23% of indicine ancestry.

The current population structure and genetic relationship analyses with different CLAG populations and additional samples from multiple breeds commonly used for beef production in the region where CLAG samples were collected, revealed that the analyzed CLAG samples have an average of 11% of a genetic cluster which is of indicine origin (Cluster 2 - Figure 3 and Table 7). Previous studies have also reported indicine introgression in locally adapted taurine breeds in Brazil (Egito *et al.*, 2002; 2007; Mariante *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2017; Serrano *et al.*, 2005), highlighting that the introduction of exotic breeds at the end of the 19th century almost led to the extinction of locally adapted breeds because of systematic crossbreeding. Genetic introgressions due to unplanned crossbreeding events are responsible for much of the loss of indigenous breeds (Senczuk *et al.* 2020).

5. REFERENCES

- AJMONE-MARSAN, P.; GARCIA, J. F.; LENSTRA, J. A. On the origin of cattle: How aurochs became cattle and colonized the world. **Evolutionary Anthropology**, v. 19, n. 4, p. 148–157, 2010.
- ALEXANDER, David H.; NOVEMBRE, John; LANGE, Kenneth. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individuals. **Genome research**, v. 19, n. 9, p. 1655-1664, 2009.
- BARBOSA, E. A., EGITO, A. A., MARTINS, V. M. V., MARTINS, E., SILVA, J. P., & RAMOS, A. F. Caracterização da curva de crescimento de fêmeas Crioulas Lageanas criadas em condições naturais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 66, p. 1281-1286, 2014.
- BLACKBURN, H. D. Biobanking genetic material for agricultural animal species. **Annual review of animal biosciences**, v. 6, p. 69-82, 2018
- BOLAJI, U. F. O., AJASA, A. A., AHMED, R. O., BELLO, S. F., & OSITANWOSU, O. E. Cattle Conservation in the 21st Century: A Mini Review. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 11, n. 02, p. 304, 2021.
- CAMPOS, B. M., DO CARMO, A. S., DO EGITO, A. A., DA MARIANTE, A. S., DO ALBUQUERQUE, M. S. M., DE GOUVEIA, J. J. S., ... & CARNEIRO, P. L. S. Genetic diversity, population structure, and correlations between locally adapted zebu and taurine breeds in Brazil using SNP markers. **Tropical animal health and production**, v. 49, n. 8, p. 1677-1684, 2017.
- CARDOSO, C. P., SILVA, B. F., GONÇALVES, D. S., TAGLIARI, N. J., SAITO, M. E., & AMARANTE, A. F. Resistência contra ectoparasitas em bovinos da raça Crioula Lageana e meio-sangue Angus avaliada em condições naturais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 141-146, 2014.
- DASH, S., SINGH, A., BHATIA, A. K., JAYAKUMAR, S., SHARMA, A., SINGH, S., ... & DIXIT, S. P. Evaluation of bovine high-density SNP genotyping array in indigenous dairy cattle breeds. **Animal biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 129-135, 2018.
- DO, C., WAPLES, R. S., PEEL, D., MACBETH, G. M., TILLET, B. J., & OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: reimplementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular ecology resources**. v. 14. n. 1. p. 209-214. 2014.
- EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de zootecnia**, v. 51, n. 193, p. 7, 2002.
- EGITO, Andréa A. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC genetics**, v. 8, n. 1, p. 1-14, 2007.
- EMBRAPA – Alelo Animal (2022) - Recursos Genéticos e Biotecnologia. - Núcleo de Tecnologia da Informação (NTI). Available in: < https://an.cenargen.embrapa.br/database_collaboration_page_dev > accessed in 11/29/22.
- EUSEBI, P. G., MARTINEZ, A., & CORTES, O. Genomic tools for effective conservation of livestock breed diversity. **Diversity**, v. 12, n. 1, p. 8, 2019.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., & SCHNEIDER, S. ARLEQUIN (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics**, v. 1, p. 117693430500100003, 2005.
- FAO – DAD-IS (2022) - Domestic Animal Diversity Information System: Available in: <<http://www.fao.org/dad-is/>>. Access in: 10/02/2022
- FAZA, D. R. L. R. et al. Development of tetra-primer ARMS-PCR protocol to genotype the prolactin receptor SNP 39136666 and assessment of this SNP in Brazilian locally adapted cattle breeds. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 73, p. 534-538, 2021.
- FREEMAN, A. R., MEGHEN, C. M., MACHUGH, D. E., LOFTUS, R. T., ACHUKWI, M. D., BADO, A., ... & BRADLEY, D. G. Admixture and diversity in West African cattle populations. **Molecular Ecology**, v. 13, n. 11, p. 3477-3487, 2004.
- GINJA, C., GAMA, L. T., CORTÉS, O., BURRIEL, I. M., VEGA-PLA, J. L., PENEDO, C., ... & MARTINEZ, A. The genetic ancestry of American Creole cattle inferred from uniparental and autosomal genetic markers. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-16, 2019.
- GINJA, C., TELO DA GAMA, L., & PENEDO, M. C. T. Y chromosome haplotype analysis in Portuguese cattle breeds using SNPs and STRs. **Journal of Heredity**, v. 100, n. 2, p. 148-157, 2009.
- GROENEVELD, L. F., LENSTRA, J. A., EDING, H., TORO, M. A., SCHERF, B., PILLING, D., ... & GLOBALDIV CONSORTIUM. Genetic diversity in farm animals—a review. **Animal genetics**, v. 41, p. 6-31, 2010.
- GUTIERREZ-REINOSO, M. A., APONTE, P. M., & GARCIA-HERREROS, M. Genomic analysis, progress and future perspectives in dairy cattle selection: a review. **Animals**, v. 11, n. 3, p. 599, 2021.
- INPI(2022) - INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL: Available in < https://www.gov.br/inpi/pt-br/servicos/indicacoes-geograficas/arquivos/certificados-de-ig/assinado_certificado_br412017000006-3_campos-de-cima-da-serra.pdf > Access in: 10/02/2022.
- KARIMI, K., ESMAILZADEH KOSHKOIYEH, A., ASADI FOZI, M., PORTO-NETO, L. R., & GONDRO, C. Prioritization for conservation of Iranian native cattle breeds based on genome-wide SNP data. **Conservation Genetics**, v. 17, n. 1, p. 77-89, 2016.
- KOPELMAN, N. M., MAYZEL, J., JAKOBSSON, M., ROSENBERG, N. A., & MAYROSE, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular ecology resources**, v. 15, n. 5, p. 1179-1191, 2015.
- LEROY, G., BAUMUNG, R., BOETTCHER, P., SCHERF, B., & HOFFMANN, I. Sustainability of crossbreeding in developing countries; definitely not like crossing a meadow. **Animal**, v. 10, n. 2, p. 262-273, 2016.
- MAKINA, SITHEMBILE O. et al. Genetic diversity and population structure among six cattle breeds in South Africa using a whole genome SNP panel. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 333, 2014.
- MANEL, STEPHANIE; GAGGIOTTI, OSCAR E.; WAPLES, ROBIN S. Assignment methods: matching biological questions with appropriate techniques. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 20, n. 3, p. 136-142, 2005.
- MARIANTE, A. D. S., DO SM ALBUQUERQUE, M., DO EGITO, A. A., & MCMANUS, C. Advances in the Brazilian animal genetic resources conservation programme. **Animal Genetic Resources**, v. 25, p. 107-121, 1999.
- MARIANTE, A. da S.; CAVALCANTE, N. **Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil**. Embrapa-Assessoria de Comunicação Social: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000.

- MARIANTE, A. da S.; TROVO, JB de F. The Brazilian genetic resources conservation programme. **Revista Brasileira de Genética, Ribeirão Preto**, v. 12, n. 3, p. 241-256, 1989.
- MARIASEGARAM, M., CHASE JR, C. C., CHAPARRO, J. X., OLSON, T. A., BRENNEMAN, R. A., & NIEDZ, R. P. The slick hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. **Animal Genetics**, v. 38, n. 1, p. 54-59, 2007.
- MASTRANGELO, S., CIANI, E., AJMONE MARSAN, P., BAGNATO, A., BATTAGLINI, L., BOZZI, R., ... & PILLA, F. Conservation status and historical relatedness of Italian cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 50, n. 1, p. 1-16, 2018.
- MEUWISSEN, T. H. E. Maximizing the response of selection with a predefined rate of inbreeding. **Journal of animal science**, v. 75, n. 4, p. 934-940, 1997.
- MITTERER-DALTOÉ, M. L., PETRY, F. C., WILLE, D. F., TREPTOW, R. O., MARTINS, V. M., & QUEIROZ, M. I. Chemical and sensory characteristics of meat from Nelore and Crioulo Lageano breeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 10, p. 2092–2100, 2012.
- OLDENBROEK, Kor. **Utilisation and conservation of farm animal genetic resources**. Wageningen: Wageningen Academic Publishers, 2007.
- PERIPOLLI, E., REIMER, C., HA, N. T., GEIBEL, J., MACHADO, M. A., PANETTO, J. C. D. C., DA SILVA, M. V. G. B. Genome-wide detection of signatures of selection in indicine and Brazilian locally adapted taurine cattle breeds using whole-genome resequencing data. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2020.
- PEZZINI, T. G., MARIANTE, A. S., MARTINS, E., PAIVA, S., RÔLO, J., SEIXAS, L., MCMANUS, C. Biometric evaluation of Brazilian Crioula Lageana cattle. **Archivos de zootecnia**, v. 67, p. 604-608, 2018.
- PRICE, Alkes L. et al. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. **Nature genetics**, v. 38, n. 8, p. 904-909, 2006.
- PRIMO, A. El ganado bovino ibérico en las Américas: 500 años después. **Archivos de zootecnia**, v. 41, n. 154, p. 13, 1992.
- PRIMO, Armando Teixeira. **América: conquista e colonização: a fantástica história dos conquistadores ibéricos e seus animais na era dos descobrimentos**. Editora: Movimento, 2004.
- PURCELL, Shaun et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **The American journal of human genetics**, v. 81, n. 3, p. 559-575, 2007
- ROSA, Vanessa Laus da et al. Identificação de polimorfismos no gene do IGF-I em bovinos (*Bos taurus*) da raça Crioula Lageana. 2017.
- SEBRAE, 2022. Available in: < <https://datasebrae.com.br/ig-campos-de-cima-da-serra/> >. Access in: 17/01/2022.
- SEMPÉRÉ G, MOAZAMI-GOUDARZI K, EGGEN A, LALOË D, GAUTIER M AND FLORI L. WIDDE: a Web-Interfaced next generation Database for genetic Diversity Exploration, with a first application in cattle, **BMC Genomics**.2015, 16:940. Available in: < <http://widde.toulouse.inra.fr/widde/>> Access in: 10/06/2022.
- SENCZUK, G., MASTRANGELO, S., CIANI, E., BATTAGLINI, L., CENDRON, F., CIAMPOLINI, R., ... & CASSANDRO, M. The genetic heritage of Alpine local cattle breeds using genomic SNP data. **Genetics Selection Evolution**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2020.
- SERMYAGIN, A. A., DOTSEV, A. V., GLADYR, E. A., TRASPOV, A. A., DENISKOVA, T. E., KOSTYUNINA, O. V., ... & ZINOVIEVA, N. A. Whole-genome SNP analysis elucidates the genetic structure of Russian cattle and its relationship with Eurasian taurine breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 50, n. 1, p. 1-13, 2018

- SERRANO, G. M.; EGITO, A. A.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. DA S. Genetic population structure of brazilian bovine breeds inferred by rapid markers. **Archivos de Zootecnia**, vol. 54, núm. 206-207, 2005, pp. 409-414
- SMITH, Charles. **Genetic aspects of conservation in farm livestock. Livestock Production Science**, v. 11, n. 1, p. 37-48, 1984.
- SOUTO, P. L. G., BARBOSA, E. A., MARTINS, E., MARTINS, V. M. V., HATAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K., PIMENTEL, C. M. M., & RAMOS, A. F. Influence of season and external morphology on thermal comfort and physiological responses in bulls from two breeds adapted to a subtropical climate. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 22, 2021.
- SOUTO, P. L. G., MCMANUS, C., ZAGO, F. C., MARTINS, E., FONTEQUE, J. H., DO EGITO, A. A., & RAMOS, A. F. Reproductive characteristics of Crioulo Lageano breed bulls (*Bos taurus*) at puberty. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1034-1042, 2018.
- SPRITZE, A. L., SERRANO, G. M. S., MCMANUS, C., & MARIANTE, A. S. Consanguinidade e intervalo entre partos da raça Crioulo Lageano. **In: simposio de recursos genéticos para a america latina e caribe**. 1999.
- SPRITZE, Á., EGITO, A. A. D., MARIANTE, A. D. S., & MCMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 1157-1164, 2003.
- TABERLET, P., VALENTINI, A., REZAEI, H. R., NADERI, S., POMPANON, F., NEGRINI, R., & AJMONE MARSAN, P. Are cattle, sheep, and goats endangered species? **Molecular ecology**, v. 17, n. 1, p. 275-284, 2008.
- TAMURA, K., STECHER, G., & KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.
- TORO, M. A., VILLANUEVA, B., & FERNÁNDEZ, J. Genomics applied to management strategies in conservation programmes. **Livestock Science**, v. 166, p. 48-53, 2014.
- TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and its use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, n. 3, p. 174-195, 2009.
- VAN BREUKELEN, A. E. et al. Characterization of genetic diversity conserved in the gene bank for Dutch cattle breeds. **Diversity**, v. 11, n. 12, p. 229, 2019.
- WANG, J.; SANTIAGO, E.; CABALLERO, Armando. Prediction and estimation of effective population size. *Heredity*, v. 117, n. 4, p. 193-206, 2016.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **evolution**, p. 1358-1370, 1984.
- WOOLLIAMS, J. A. et al. Effective sizes of livestock populations to prevent a decline in fitness. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 89, n. 7, p. 1019-1026, 1994.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram que a raça bovina brasileira Crioula Leagena apresenta alta diversidade genética em todos os rebanhos estudados. A subestruturação e diferenciação encontrada entre estes rebanhos pôde ser associada com a frequência de animais mochos ou aspados nos respectivos rebanhos, dentre outros fatores históricos específicos de cada rebanho. Foi possível determinar que o BBGA deve focar o seu enriquecimento com germoplasma proveniente das fazendas com animais mochos, uma vez que estão subrepresentados na atual coleção de germoplasma. Contudo, rebanhos de animais aspados ainda podem contribuir para aumentar a diversidade armazenada no BBGA.

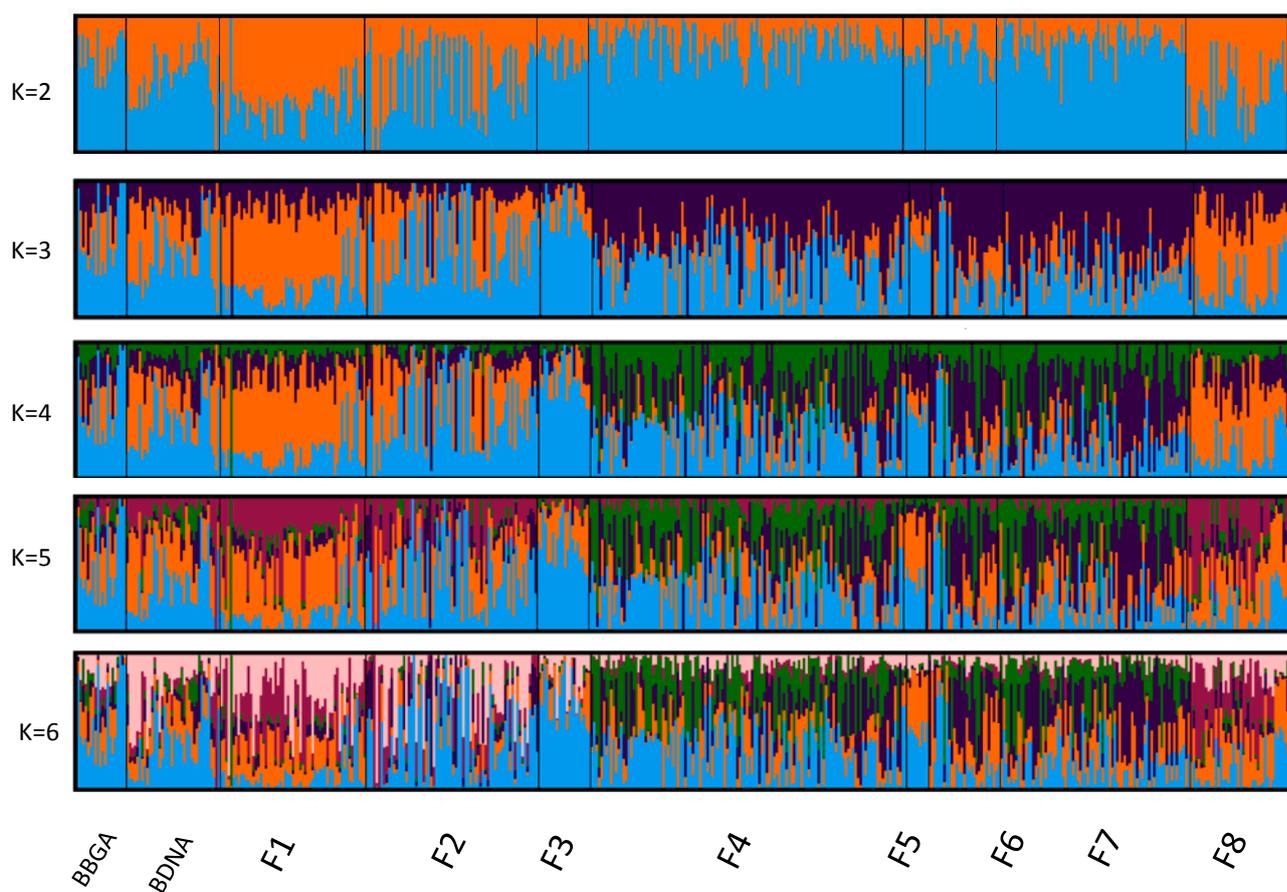
O tamanho efetivo populacional estimado do banco está abaixo do recomendado para a conservação de uma raça, sugerindo que além da necessidade de enriquecimento para representar a diversidade, ainda são necessários esforços para que o BBGA tenha melhor representatividade do tamanho efetivo da raça. Estratégias de manejo genético para manter a diversidade dos rebanhos de raças locais com baixo tamanho efetivo populacional são baseadas principalmente em abordagens para evitar cruzamentos entre parentes próximos e consequentemente minimizar as taxas de acúmulo de endogamia, para evitar a perda da diversidade genética por processos estocásticos. Os resultados mostram que ferramentas genômicas poderão ser utilizadas para direcionar cruzamentos dentro e entre rebanhos para manter a diversidade genética presente na raça.

Os resultados obtidos mostram que estratégias para identificar doadores de sêmen ou embriões para serem adicionados ao BBGA também devem considerar a estrutura da raça e as relações genéticas dentre e entre os rebanhos, maximizando a amostragem da diversidade populacional existente. Além disso, para seleção de indivíduos para compor o banco, deve-se considerar características únicas da raça, como características adaptativas e de produção.

Os resultados sobre diversidade e estrutura genética do gado brasileiro Crioulo Lageano aqui apresentados fornecerão subsídios para o estabelecimento de estratégias eficazes de manejo genético para os rebanhos de produção, por meio de relatórios à ABCCL e enriquecimento do banco de germoplasma BBGA, contribuindo para a conservação desta raça.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Figure 2.1 – Structured plots for K 2 to 6. Farms (F1, F2, F3, F4, F6, F7, F8, F9), BBGA and BDNA. Each animal is represented by a vertical line divided into K clusters, where length of the colored segment represents the estimated proportion of membership to a particular cluster. Black lines separate individual populations.

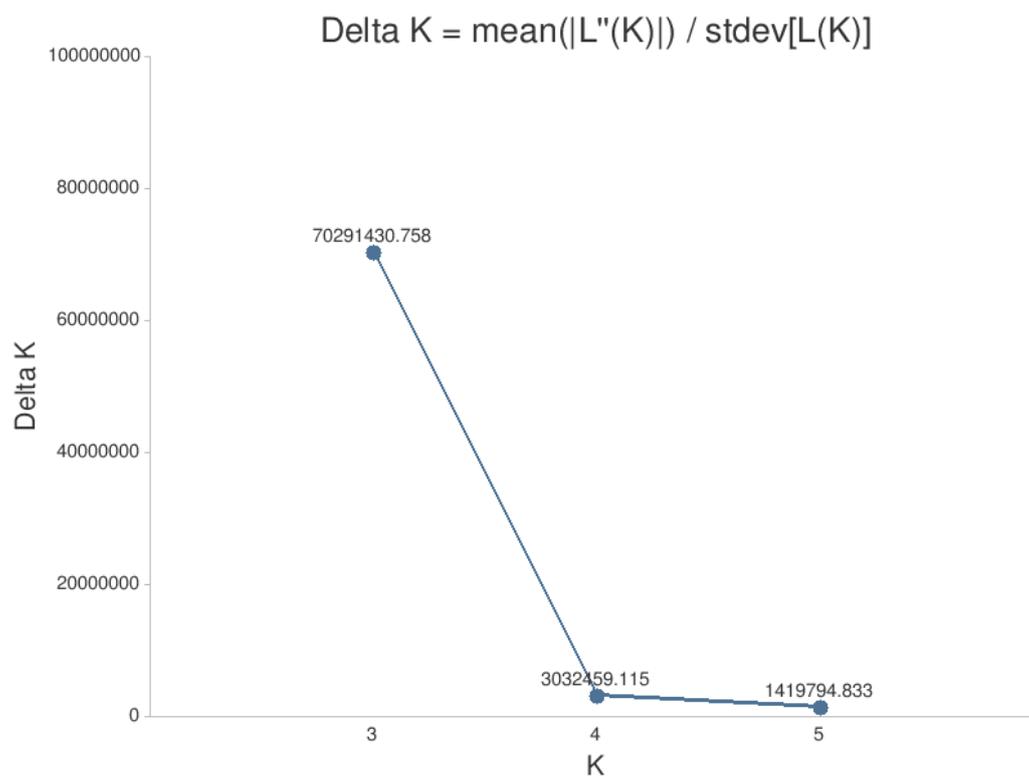


Minor modes for the uploaded data:

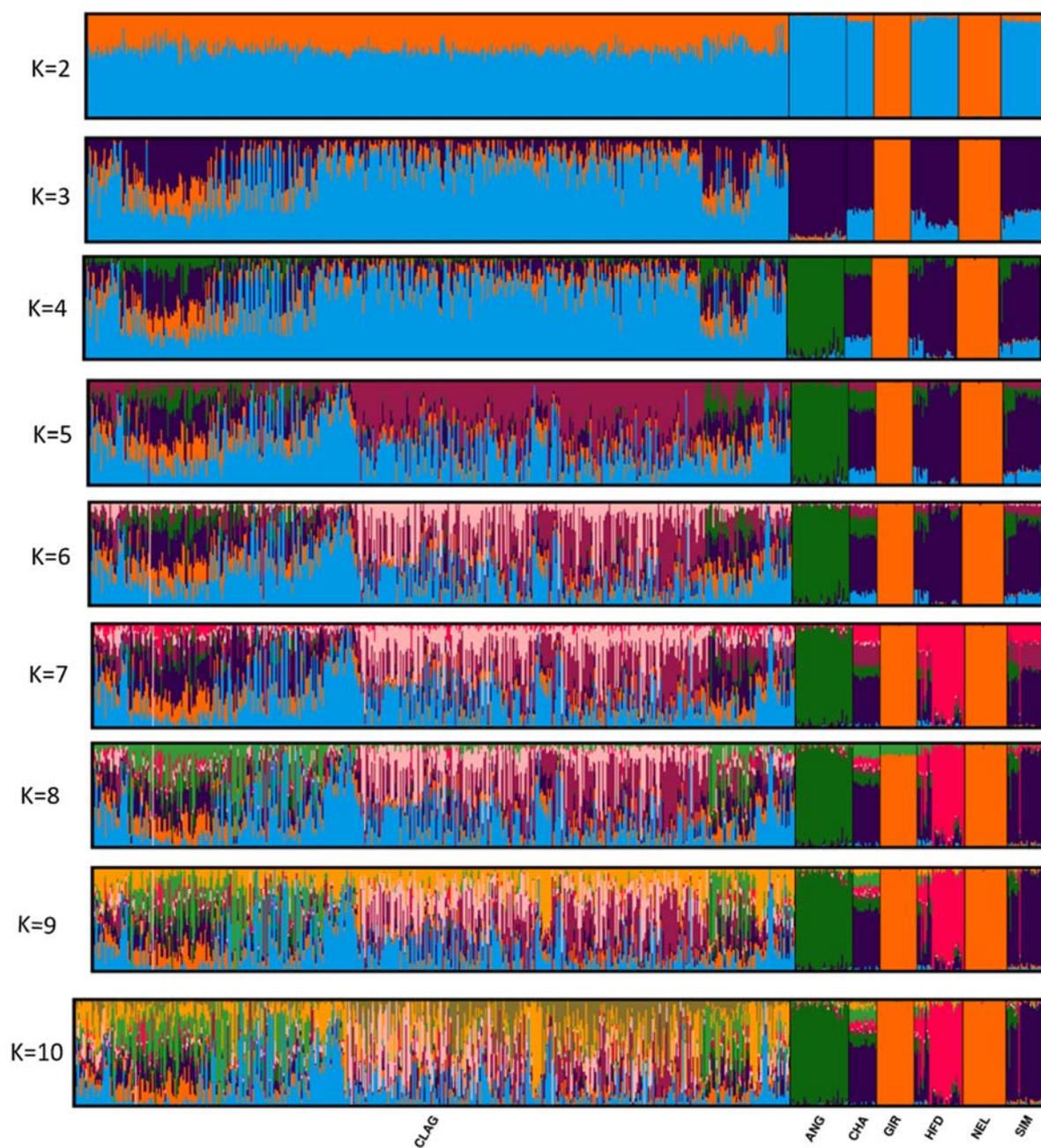
Division of runs by mode:

K=2	6/6
K=3	6/6
K=4	6/6
K=5	6/6
K=6	6/6

Supplementary Figure 2.2 – Best_K_By_Evanno-DeltaK By KGraph - Farms (F1, F2, F3, F4, F6, F7, F8, F9), BBGA and BDNA.



Supplementary Figure 3.1 – Structured plots for $K=2$ to $k=10$. Breed codes: Crioulo Lageano (CLAG), Angus (ANG), Charolais (CHA), Gir (GIR), Hereford (HFD), Nelore (NEL) and Simmental (SIM). Each animal is represented by a vertical line divided into K clusters, where length of the colored segment represents the estimated proportion of membership to a particular cluster. Black lines separate individual populations. Black lines separate individual populations.



Division of runs by mode:

K=1 1/1
K=2 10/10
K=3 10/10
K=4 5/10, 5/10
K=5 10/10
K=6 5/10, 5/10
K=7 10/10
K=8 10/10
K=9 9/10, 1/10
K=10 5/10, 3/10, 2/10

Supplementary Figure 3.2 – Best_K_By_Evanno-DeltaK By KGraph - CLAG, ANG, CHA, GIR, HFD, NEL and SIM.

