

Brasília, DF Junho, 2025

Uso de ferramentas genômicas no manejo do Núcleo de Conservação Animal da Embrapa Pantanal

Laura de Moraes Guazzeli⁽¹⁾, Adriana Mello de Araújo⁽²⁾, Sandra Aparecida Santos⁽³⁾, Raquel Soares Juliano⁽²⁾, Camila Souza Rodrigues⁽⁴⁾, Danielle Assis de Faria⁽⁵⁾, Samuel Rezende Paiva⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ Graduanda em Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF. ⁽²⁾ Pesquisadora da Embrapa Pantanal, Corumbá, MS. ⁽³⁾ Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. ⁽⁴⁾ Doutoranda em Ciências Animais pela Universidade de Brasília, Brasília, DF. ⁽⁵⁾ Pós-doutorado pela Universidade de Brasília, Brasília, DF. ⁽⁶⁾ Pesquisador, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Resumo – A Embrapa Pantanal possui um núcleo de conservação, onde são mantidos in situ rebanhos de ovinos, equinos e bovinos Pantaneiros. Esse estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética dos rebanhos equino e ovino, e através de ferramentas genômicas, gerar resultados práticos que auxiliam o manejo genético. Após o controle de qualidade, foram analisadas 81 e 102 amostras de ovinos e equinos Pantaneiros, com 2.549 e 1.476 SNPs respectivamente. Foi avaliada a diversidade, estrutura genética do rebanho e testes de exclusão de paternidade foram realizados. Em termos de diversidade genética, a heterozigosidade observada (H_o) do rebanho ovino é igual a 0,412 e do equino, 0,472, e ambos os rebanhos apresentaram o coeficiente de endogamia (F_{IS}) negativo, indicando uma considerável taxa de variabilidade genética e baixa endogamia. A análise de estrutura populacional dos ovinos Pantaneiros mostra duas composições genéticas distintas no rebanho, ($K=2$), sendo que essa segunda identidade genômica foi identificada como proveniente do Santa Inês. Os equinos Pantaneiros ($K=3$) mostram-se com uma estruturação ainda mais complexa, presença de outra(s) raça(s) ou subpopulações, as quais ainda não foram identificadas. O teste de exclusão de paternidade no rebanho ovino identificou 3 duos, informações estas que não estavam presentes na plataforma Alelo Animal. Nos equinos, o resultado foi de 19 trios e 33 duos, enquanto sete trios e 14 duos estão de acordo com as informações de pedigree registradas na Plataforma. Esses resultados apresentam uma oportunidade de enriquecer estratégias de conservação, orientando a seleção criteriosa de progenitores em cruzamentos futuros.

Termos para indexação: *Ovis aries*; *Equus caballus*; recursos genéticos animais; genotipagem; SNP; análises genéticas.

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica,
PqEB Av. W5 Norte (final)
[www.embrapa.br/
recursos-geneticos-e-
biotecnologia](http://www.embrapa.br/recursos-geneticos-e-biotecnologia)
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações

Presidente

Priscila Grynberg

Secretária-executiva

Ana Flávia do N. Dias

Membros

*Andrielle Camara Amaral
Lopes, Bruno MachadoTeles
Walter, Carolina Vianna
Morgante, Débora Pires Paula,
Edson Junqueira Leite, Marcos
Aparecido Gimenes, Solange
Carvalho Barrios Roveri Jose e
Sueli Correa Marques de Mello.*

Revisão de texto

Samuel Rezende Paiva

Normalização bibliográfica

*Rosameres R. Galvão
(CRB-1/2122)*

Projeto gráfico

Leandro Sousa Fazio

Diagramação

Adilson Werneck

Publicação digital: PDF

Todos os direitos
reservados à Embrapa.

Abstract – Use of genomic tools in the management of the Animal Conservation Nucleus from the Embrapa Pantanal

Embrapa Pantanal has a conservation nucleus, where in situ herds of Pantaneiro sheep, horses and cattle are kept. This study focused on estimating the genetic diversity of horse and sheep herds, and through genomic tools, generate results that assist genetic management. After the quality control, 81 and 102 samples from Pantanal sheep and horses were analyzed, with 2.549 and 1.476 SNPs, respectively. The diversity and genetic structure of the herd were evaluated and paternity exclusion tests were performed. In terms of genetic diversity, the observed heterozygosity (H_o) of the sheep herd is equal to 0.412 and the horse herd, 0.472, and both herds presented a negative inbreeding coefficient estimation (F_{IS}), indicating a high rate of genetic variability and low inbreeding. The analysis of the population structure of Pantaneiro sheep shows two distinct genetic compositions in the herd, ($K=2$), in which this second genomic identity can be attributed to Santa Inês breed. The Pantaneiro horses ($K=3$) have an even more complex structure, with the presence of other breed(s) or subpopulations, which have not been identified yet. The paternity exclusion test in the sheep herd showed three duos, information that was not present on the Alelo Animal platform. In horses, the result was 19 trios and 33 duos, while seven trios and 14 duos are in accordance with the pedigree information present in the platform. These results present an opportunity to enrich conservation strategies, conducting the selection of parents for future crosses.

Index terms: *Ovis aries*; *Equus caballus*; animal genetic resources; genotyping; SNP; genetic analyses.

Introdução

A Embrapa possui um projeto de conservação de animais domésticos com interesse zootécnico desde 1980, focado em raças brasileiras que se desenvolveram de animais previamente trazidos na época da colonização (Albuquerque; lanella, 2016). A Embrapa Pantanal, unidade descentralizada da Embrapa, possui um Núcleo de Conservação localizado na Fazenda Nhumirim, na sub-região da Nhecolândia – MS, onde encontram-se rebanhos de animais adaptados à região do Pantanal e passíveis de extinção, como os Ovinos Pantaneiros, Equinos Pantaneiros e Bovinos Pantaneiros (Mendes et al. 2012). Esse Núcleo de Conservação é de extrema importância, pois com ele é possível conservar os animais Pantaneiros in situ, manejar os rebanhos visando o aumen-

to da variabilidade genética e com isso preservar as suas características específicas provenientes de sua adaptação.

A Conservação Genética na Embrapa pode ser feita de duas maneiras: in situ ou ex situ. A Conservação in situ é feita com a espécie em seu habitat natural, dentro dos seus respectivos núcleos de conservação, tendo como objetivo principal evitar a extinção desses animais e minimizar a endogamia para poder prevalecer a heterozigotidade sob a homozigose. A Conservação ex situ é feita no Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA), tendo como objetivo principal criopreservar o sêmen e embriões desses animais, sendo que as amostras de sêmen podem ser cedidas para utilização quando necessário por produtores ou associações (Albuquerque; lanella, 2016).

O ovino Pantaneiro é um grupo genético que vem apresentando alguns padrões de adaptação ao ambiente do ecossistema do Pantanal, como termo tolerância ao ambiente, resistência aos parasitos e resistência dos cascos à umidade, provenientes de sua criação extensiva, e ocupam geograficamente quase todo o Pantanal (Carvalho et al., 2016). A ovelha Pantaneira possui uma cobertura de lã que permite sua proteção contra o sol, frio e água das chuvas, possuindo pouca lã nas pernas, barriga e pescoço, regiões que ficam constantemente molhadas. Para essa raça ainda não existe associação de criadores, tornando difícil estimar o tamanho da sua população e distribuição pelo Brasil, mas a maioria está concentrada no Centro-Oeste, nas regiões do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Barbosa-Ferreira, 2011).

O equino Pantaneiro é um grupo genético que também sofreu adaptações significativas ao ambiente do Pantanal. Esses animais possuem uma maior força, resistência ao calor excessivo e às longas distâncias que são necessárias percorrer no Pantanal, se tornando o principal meio de transporte para os habitantes da região e de extrema importância no manejo extensivo do gado de corte (Santos et al., 2021). Além disso, o cavalo Pantaneiro também apresenta uma boa adaptação às regiões alagadas do Pantanal, possuindo cascos fechados, o que confere a esses animais maior resistência às doenças, como a “podridão da anilha”. Essa raça chegou perto da extinção devido a cruzamentos inter-raciais e doenças contagiosas, e, por isso, criou-se em 1972 a Associação Brasileira de Criadores do Cavalo Pantaneiro (ABCCP), iniciando seu projeto de conservação (Albuquerque; lanella, 2016).

O principal objetivo deste estudo é avaliar geneticamente a diversidade dos rebanhos ovino e equino do Núcleo de Conservação da Embrapa Pantanal utilizando de marcadores moleculares do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polimorphism*). Além de uma avaliação geral, o resultado gerado a partir das análises destes marcadores irão auxiliar o manejo e manutenção da coleção in situ (Núcleo de Conservação), direcionando cruzamentos, informando e controlando a variabilidade genética do rebanho, fomentando estratégias de coletas de novo material e identificando animais miscigenados.

A ferramenta genômica utilizada foi desenvolvida pela Embrapa, em parceria com a empresa Neogen, um microarranjo (“beadchip”) de genotipagem “multi-espécie”, EMBRAPA multispecies 65K *Illumina Infinium* 1 chip. Esse chip contém um total de 66.413 SNPs para 27 diferentes espécies de plantas e animais de produção.

Material e Métodos

As diretrizes de bem-estar animal foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Ani-

mais (CEUA), que regulamenta o uso dos animais para realização de pesquisas. Toda a pesquisa foi realizada de acordo com as práticas estabelecidas pelo comitê de ética da Embrapa (número do processo da Embrapa Pantanal: 001/2022).

Amostragem, extração de DNA e genotipagem

O material coletado dos animais foi o pelo, retirados pela raiz, pois é dos bulbos que o DNA é extraído. Foram coletados pelos de 145 animais ovinos da raça Pantaneira (Figura 1) e de 112 equinos da raça Pantaneira (Figura 2), enviados em envelopes identificados para a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Cenargen. A extração do DNA foi realizada utilizando um protocolo de extração com o detergente CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide). Após a extração, a quantidade e qualidade do DNA foram avaliadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, usando padrões de lambda de 200 ng/μg, 100 ng/μg e 50 ng/μg para comparação. Se necessário, informações complementares sobre os animais em questão, caso existentes, podem ser encontradas na Plataforma Alelo Animal¹.



Figura 1 - Rebanho de ovinos Pantaneiros na Fazenda Nhumirim (A), campo experimental da Embrapa Pantanal, localizada na sub-região da Nhecolândia – MS. Exemplar de ovino Pantaneiro tosquiado (B), em que se pode observar as regiões que normalmente ficam sem pelo pela diferença de coloração: pernas, barriga e pescoco.



Figura 2 - Equinos Pantaneiros na Fazenda Nhumirim (A), campo experimental da Embrapa Pantanal, localizada na sub-região da Nhecolândia – MS. Exemplar de equino Pantaneiro submerso (B), mostrando sua aptidão em regiões alagadas.

¹ Disponível em: https://an.cenargen.embrapa.br/database_collaboration_page_dev.

As amostras em questão foram diluídas, secas e enviadas para a genotipagem na empresa parceira Neogen² no Brasil. Um total de 1.498 SNPs para equinos foram escolhidos daqueles validados no GGP Equine Chip³ (GeneSeek - Genomic Profiler) e 2.926 SNPs para ovinos foram escolhidos daqueles validados no OvineSNP50 para compor duas seções do EMBRAPA multispecies 65K *Illumina Infinium* 1 chip. Uma das vantagens desse chip é a redução significativa do custo individual de genotipagem, enquanto ao mesmo tempo provém dados de SNPs de alta qualidade e reproduzível entre laboratórios. A genotipagem foi conduzida pela Neogen/Geneseek (Lincoln, NE). *Manifest files* e *intensity data* (.idat files) foram obtidos da Neogen, e a clusterização e chamada dos genótipos foram feitas usando o GenomeStudio 2.0 (Illumina, Inc. San Diego, CA) seguindo os controles de qualidade padrões e os alelos foram exportados no formato top, A, C, G, T. Os dados brutos foram filtrados com parâmetros de qualidade utilizando o SVS SNP & Variation Suite 8.10.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT)⁴.

Análise de dados

Aos dados brutos foram aplicados filtros para garantir a qualidade das amostras e dos marcadores utilizados para análises posteriores. Primeiramente, filtramos os animais e excluímos aqueles com *call rate* < 0,9, tanto para os ovinos quanto para os equinos, restando respectivamente 81 e 102 animais. Para os marcadores, em ambos os rebanhos foram eliminados aqueles em cromossomos sexuais, não mapeados, com *call rate* < 0,90; MAF < 0,01; Desequilíbrio de Ligação (DL) com $r^2 < 0,5$ em uma janela de 50 SNPs; e que não se encontravam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ($p < 0,001$), restando 2.549 marcadores para os ovinos e 1.476 para os equinos.

A diversidade genética foi estimada utilizando o software GenAlex6.5 (Peakall and Smouse, 2012). Para ambos os rebanhos, foram determinados parâmetros de heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{IS}). A H_e mostra a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto, considerando as frequências alélicas e refletindo o potencial genético da população de gerar diversidade, já a H_o mostra a real proporção dos indivíduos heterozigotos presentes em uma população (Weir, 1996). O F_{IS} mostra a probabilidade do indivíduo ser heterozigoto devido à reprodução consanguínea (Cruz et al., 2011).

O programa SVS SNP & Variation Suite 8.10.0 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT) também foi usado para cálculo de matrizes de IBD (*Identity by Descent*), baseadas no índice de identidade por descendência. Para cada espécie duas matrizes são propostas, uma com os reprodutores e outra com todos os animais. Essa matriz, em linhas gerais, descreve a probabilidade de duas amostras compartilharem 0, 1 ou 2 alelos oriundos da mesma população de cruzamentos aleatórios, em outros termos, a relação de parentesco entre os animais. O resultado é a identificação de prováveis meios-irmãos e/ou pais-filhos, mães-filhos, meios-irmãos, ou ainda indivíduos que não possuem relacionamento entre si ("0" não possuem nenhum alelo em comum).

Também é possível a identificação de identidade, sendo importante pois indica duplicação de amostras, erro laboratorial ou ainda erro no momento de coleta ou documentação dos pelos. A probabilidade de dois indivíduos compartilharem todos os alelos de um grande número de SNPs é mínima, sendo possível de acontecer em gêmeos univitelinos.

Para a análise de estrutura populacional foi usado o modelo Bayesiano implementado no software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). O modelo usado na análise das duas espécies permitiu miscigenação, frequências alélicas correlacionadas, 5.000 interações de *burn-in* (aquecimento) seguido por 10.000 simulações para coleta de dados. Foi utilizado um total de cinco repetições para cada valor de K (número predeterminado de populações/agrupamentos) e a princípio usamos 10 K's na análise individual de cada rebanho. Utilizando o Structure Selector (Li; Liu, 2018), o valor mais provável de K foi estimado, com base no ΔK descrito por Evanno et al. (2005). O valor de ΔK indica o provável número de subpopulações ou grupamentos genéticos a amostragem possui. Na análise dos ovinos Pantaneiros foram incluídos 30 animais da raça Santa Inês para comparação, uma vez que existe o histórico de cruzamentos entre essas duas raças. Ao rebanho equino foram adicionados dados de 117 amostras de equinos Pantaneiros armazenadas no banco de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, genotipados previamente com o GGP Equine Beadchip⁵. O processo de juntar diferentes bancos de dados, seja de diferentes raças ou de diferentes Beadchips, leva a um novo processo de controle de qualidade tanto das amostras quanto dos marcadores. Essa nova filtragem foi feita utilizando os mesmos parâmetros usados na análise anteriormente.

² Disponível em: <https://www.neogen.com/>.

³ Disponível em: <https://www.neogen.com/categories/genotyping-arrays/ggp-equine/>

⁴ Disponível em: www.goldenhelix.com.

⁵ Disponível em: <https://www.neogen.com/>.

A reconstrução do pedigree e/ou teste de exclusão de paternidade/maternidade foi realizada pelo software Cervus 3.0.7 (Kalinowski et al. 2007). O Cervus estima um valor de probabilidade usando os marcadores moleculares e sua segregação mendeliana, indicando aqueles animais que não podem ser excluídos como genitores de uma dada progênie. Foram montados três arquivos para cada rebanho de acordo com as datas de nascimento estimadas de cada animal, quando presente: (A) potenciais pais, (B) potenciais mães, e (C) progênie. Para os ovinos Pantaneiros, o arquivo “A” continha 4 machos, o “B” 69 fêmeas e o “C” 73 animais. Para os equinos Pantaneiros, o arquivo “A” continha 66 machos, o “B” 31 fêmeas, e o “C” 102 animais. Para eleger as fêmeas e machos como potenciais pais dos ovinos Pantaneiros foi considerada apenas a data de nascimento aproximada, pois não havia informações de descendentes na plataforma Alelo Animal. No caso dos equinos Pantaneiros, foi considerado principalmente a data de nascimento dos animais, mas também as informações dos reprodutores no Alelo Animal.

O Cervus utiliza uma metodologia para determinar progênies para pais que não podem ser excluídos baseado em máxima verossimilhança. Foram realizados dois testes independentes para cada rebanho, o teste de exclusão de paternidade e o de maternidade. Os parâmetros usados nas simulações foram 100.000 ciclos de interação, 80 progenitores candidatos; 50% dos locos genotipados, 1% de erros de genotipagem, e pré determinados níveis de confiança relaxada e estrita de 80% e 95%, respectivamente. O intuito dessa análise, para os ovinos Pantaneiros, é montar um pedigree para o máximo de animais possíveis usando as informações que a Embrapa Pantanal disponibilizou na plataforma Alelo e, para os equinos Pantaneiros, confirmar o pedigree que está presente na plataforma Alelo e adicionar novas informações.

Resultados

Amostragem, extração de DNA e genotipagem

Após filtragem dos dados de genotipagem, 64 amostras de ovinos foram eliminadas, enquanto de equinos foram eliminadas apenas 10 amostras. Na filtragem de marcadores, restaram um total de 2.549 marcadores para ovinos e 1.476 marcadores para equinos.

Índices de diversidade genética

Os valores da heterozigosidade observada (H_o) e da heterozigosidade esperada (H_e) nas espécies Pantaneiras avaliadas apresentam-se bastante próximos, sendo considerados satisfatórios de acordo com a literatura para equinos Pantaneiros (Nogueira et al., 2021) e ovinos Pantaneiros (Souza et al., 2024). Altos valores de heterozigosidade explicam o valor negativo do coeficiente de endogamia (F_{IS}) obtido e indicam que os rebanhos não estão em endogamia no momento avaliado por esse estudo (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado das análises de diversidade genética intrapopulacional dos ovinos Pantaneiros e equinos Pantaneiros: Número de amostras (N), Heterozigosidade esperada (H_e), Heterozigosidade observada (H_o) e coeficiente de endogamia (F_{IS}).

Espécie	Raça	N	H_e	H_o	F_{IS}
<i>Ovis aries</i>	Pantaneiro	81	0,404	0,412	-0,023
<i>Equus caballus</i>	Pantaneiro	112	0,472	0,474	-0,027

Manejo Genético dos Rebanhos

Duas matrizes genômicas baseadas no índice de identidade por descendência IBD (*Identity by Descent*) do rebanho de ovinos Pantaneiros foram calculadas, uma entre os 81 ovinos Pantaneiros genotipados (Figura 3) e outra entre os 6 machos genotipados (Figura 4). Da mesma forma, duas matrizes genômicas do rebanho de equinos Pantaneiros foram construídas, uma entre os 102 equinos Pantaneiros genotipados (Figura 5) e outra entre os 69 machos genotipados (Figura 6). As matrizes estão aqui representadas por meio de mapas de calor (*heatmaps*), permitindo a identificação de diferentes graus de parentesco entre os animais analisados. A escala de cores varia de 0 (cor mais clara), demonstrando animais sem nenhum grau de parentesco, a 1 (cor mais escura), demonstrando animais com identidade completa. Os indivíduos com relações de primeiro grau possuem valores cerca de 0,5.

O grau de relacionamento indicado pelas matrizes foi verificado com as informações de pedigree conhecidas e disponibilizadas na plataforma Alelo Animal, quando existente. A matriz de machos de ovinos destaca um alto grau de relacionamento entre os reprodutores 109109 e

122217 (Figura 4). Uma das estratégias de manejo, caso necessário, seria eliminar um dos dois reprodutores por possuírem 50% do seu pool gênico em comum. O restante dos machos compartilha poucos ou nenhum alelo entre si. Pelo *heatmap* do rebanho de ovinos (Figura 3) fica evidente também o baixo índice de relacionamento entre os animais, não conseguindo observar nenhuma família específica destacada, o que indica que o manejo reprodutivo do rebanho, da forma que é realizado, mantém a variabilidade desejada.

Os *heatmaps* representativos das matrizes do rebanho de equino também demonstram relativamente menos parentesco entre os animais do que animais aparentados entre si (Figura 5 e 6). Da mesma forma, ela indica alguns machos com alto grau de parentesco, sendo necessário seu descarte do rebanho em detrimento de outros menos aparentados. Os *heatmaps* refletem a criação do rebanho em sistemas extensivos, compartilhando espaços entre si e com o rebanho bovino em pastagens nativas.

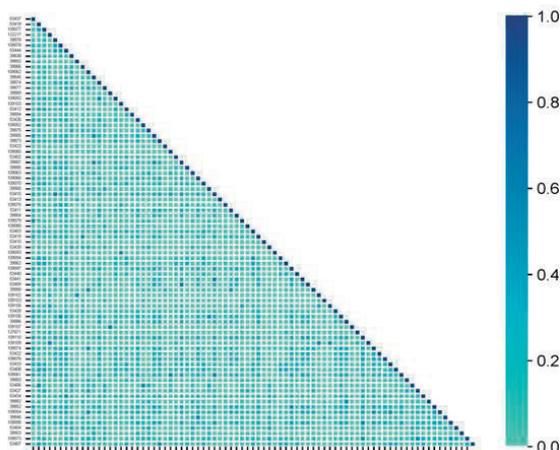


Figura 3 – Mapa de calor (*heatmap*) originado de uma matriz IBD (*Identity by Descent*) para o rebanho de ovinos Pantaneiros (N = 81). Diagonal principal: animal com ele mesmo, identidade total = 0,98 a 1; irmãos completos, pai-filho ou mãe-filho = 0,48 a 0,60; meio irmãos = 0,29 a 0,45.

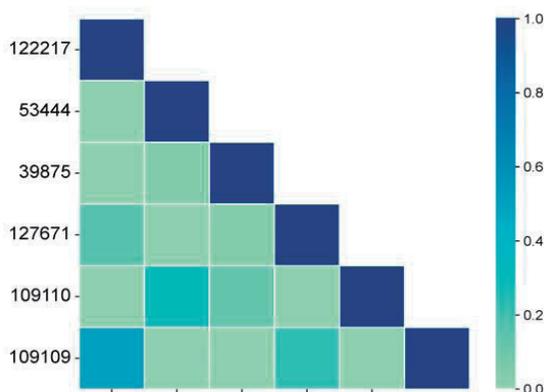


Figura 4 – Mapa de calor (*heatmap*) representativo de uma matriz IBD (*Identity by Descent*) entre os machos dos ovinos Pantaneiros (N = 6). Diagonal principal: animal com ele mesmo, identidade total = 0,98 a 1; irmãos completos, pai-filho = 0,48 a 0,60; meio irmãos = 0,29 a 0,45.

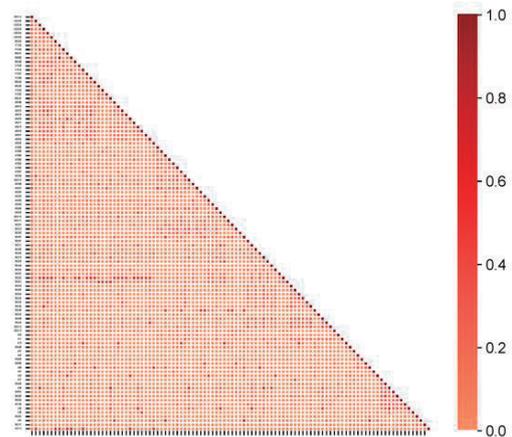


Figura 5 – Mapa de calor (*heatmap*) originado de uma matriz IBD (*Identity by Descent*) para o rebanho de equinos Pantaneiros (N = 102). Diagonal principal: animal com ele mesmo, identidade total = 0,98 a 1; irmãos completos, pai-filho ou mãe-filho = 0,48 a 0,60; meio irmãos = 0,29 a 0,45.

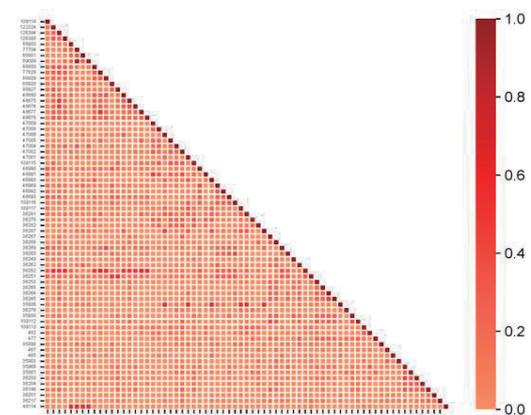


Figura 6 – Mapa de calor (*heatmap*) originado de uma matriz IBD (*Identity by Descent*) entre os machos dos equinos Pantaneiros (N = 69). Diagonal principal: animal com ele mesmo, identidade total = 0,98 a 1; irmãos completos, pai-filho = 0,48 a 0,60; meio irmãos = 0,29 a 0,45.

Estrutura Genética Populacional

De acordo com o ΔK proposto por Evanno et al. (2005), a estrutura genética encontrada no rebanho de ovinos indica dois clusters independentes (K = 2), (Figura 7 – A). O gráfico de barras individuais (Figura 7 – B) mostra a divisão em dois clusters independentes (cores vermelho e verde). As barras individuais 100% verdes ou próximas a esse valor caracteriza os animais da raça Santa Inês, enquanto que as barras individuais com diferentes proporções das duas cores representam o rebanho Pantaneiro. Por esse resultado, grande parte dos animais Pantaneiros seriam miscigenados, como esperado pela descrição passada pelos pesquisadores responsáveis pelo Núcleo. As quatro fêmeas controle, ou seja, animais que supostamente são cruzados com a raça Santa Inês, não foram confirmadas como miscigenadas. No entanto, o que vemos é uma proporção cada vez maior da cor vermelha, indicando o Pantaneiro. Esses resultados auxiliam no manejo do

rebanho, eliminando indivíduos com alta proporção de miscigenação com a raça Santa Inês e direcionando cruzamentos entre indivíduos “puros”, ou com maior parte do genoma pertencente à raça Pantaneira, quando possível.

Os equinos Pantaneiros foram colocados lado a lado com amostras de equinos Pantaneiros armazenadas no banco de DNA da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O resultado do ΔK , proposto por Evanno et al. (2005), são 3 prováveis clusters ($K = 3$), (Figura 8 – A). No gráfico de barras individuais (Figura 8 – B) não é possível observar uma estrutura, pois foi visualizado um resultado de distribuição contínua, onde não há diferenciação entre o rebanho atual e as amostras armazenadas no banco de dados.

No K3 as três cores distintas (vermelho, verde e azul) estão presentes em diferentes proporções em todos os animais do Núcleo de Conservação, amostras 1 - 112. As amostras do Banco de DNA e Tecidos, mesmo que tendo sido coletadas em diferentes momentos e em diferentes propriedades ao longo do ecossistema Pantanal, apresentam proporcionalmente maior contribuição da cor azul. Cinco indivíduos do banco de DNA tem uma grande contribuição da cor vermelha que indica um outro grupamento genético desconhecido. Uma das hipóteses é que as três cores podem indicar miscigenação com outras raças, ou uma diferenciação dentro da raça Pantaneiro (subestruturação) que foi observada por Nogueira et al., (2021).

De acordo com McManus et al., (2013), a procura por gananhões é alta, o que gera alto fluxo gênico dentro do ecossistema pantaneiro. Com microssatélites, Sereno et al., (2008) observou o mesmo resultado

de animais miscigenados na fazenda Nhumirim, o que nos leva a acreditar que realmente não existe isolamento geográfico entre os diferentes grupamentos genéticos, evidenciados na análise de estrutura agora com marcadores SNPs. A hipótese de cruzamentos indiscriminados no passado com outras raças também existe e foi ressaltada por Santos et al., (2003). Infelizmente no presente estudo e tão pouco no estudo de Nogueira et al., (2021), não foi possível identificar quais raças teriam sido utilizadas.

Testes de Exclusão de Paternidade e Manejo do Rebanho

Para os testes de exclusão de paternidade e maternidade, apenas aqueles de exclusão significativos foram considerados e, além disso, o parâmetro “*Pair loci mismatching*” igual ou menor que quatro (Tabela 2 e 3), o que quer dizer que de todos os marcadores usados, apenas quatro ou menos que quatro poderiam estar não segregantes, ou com “erros de segregação (ex., mutação, erro de genotipagem), segundo as leis de herança Mendeliana. Apesar desse número de *mismatching* ser considerado relativamente alto, foi utilizado esse parâmetro pois havia um grande número de SNPs na análise, o que pode acabar gerando mais erros, estatisticamente falando. Além disso, os resultados dos testes em que o *pair loci mismatching* foi igual a 3 ou 4 foram conferidos com o pedigree presente na plataforma Alelo Animal, podendo ser confirmados.

No total, para os ovinos, foram formados três possíveis duos. Nenhuma informação de

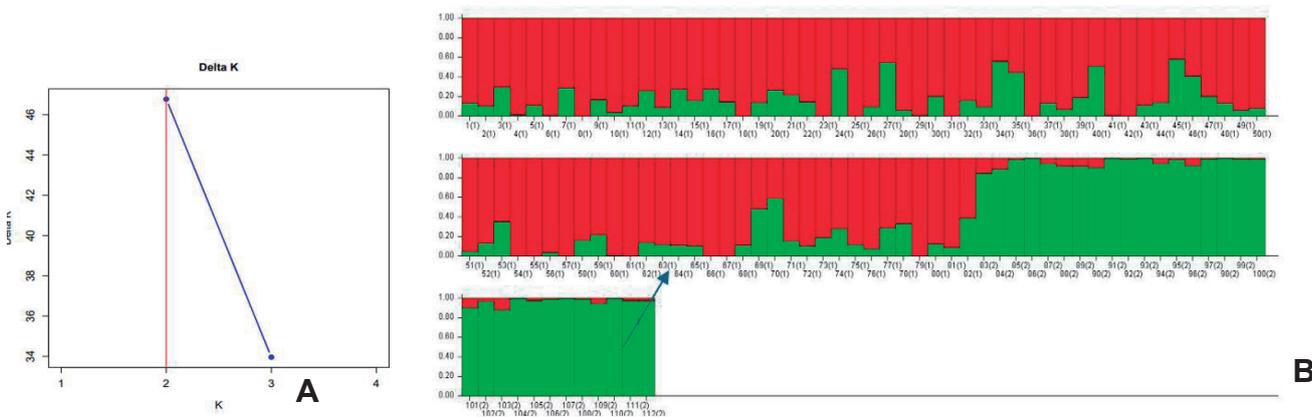


Figura 7 – Clusterização baseada no modelo utilizado pelo software para $K = 2$ (A). Cada barra vertical representa a ancestralidade estimada de cada animal dentro de cada cluster (B), sendo os animais de 1 a 82 Pantaneiros e do 83 ao 112 Santa Inês. (divisão das raças indicada pela seta).

pedigree estava presente na plataforma Alelo Animal, todos os duos são inéditos (Tabela 2).

O resultado da reconstrução de pedigree dos equinos Pantaneiros mostrou novos pedigrees e confirmou as informações presentes na plataforma Alelo Animal, com exceção de um animal (RN 48675). O pedigree deste é conhecido, onde a fêmea RN 36232 é sua mãe, porém no resultado do teste de maternidade essa fêmea apresentou o *Pair loci mismatching* = 35, o que leva a crer que a informação presente na plataforma Alelo Animal esteja errada, já que o teste possui um nível de confiança estrita de 95%.

Tabela 2 – Validação do teste de paternidade e maternidade dos ovinos genotipados da raça Pantaneira. A identificação de cada progênie é feita por meio do RN ID (*Repository Number*) do animal, cadastrado na plataforma Alelo Animal.

Progênie	Possível mãe	Possível pai	Número de marcadores comparados	Número de marcadores não coincidentes	LOD score	Delta
109092	39874		2356	0	3,07E+02	3,07E+02
109062	109074		2340	0	2,32E+02	2,32E+02
53434		53444	2341	0	2,01E+02	2,01E+02

A maioria dos dados de nascimento presentes na plataforma Alelo Animal corroboram com os resultados do teste. No total, para os equinos, foram formados 19 trios e 33 duos. (Tabela 3) Na plataforma Alelo Animal estão presentes informações de pedigree de 58 animais e, com o resultado do teste realizado, sete trios e 14 duos foram confirmados (21 animais).

DISCUSSÃO

Os resultados das análises de diversidade genética para os ovinos e equinos Pantaneiros (Tabela 1) mostram que ambos os rebanhos demonstram uma ampla diversidade genética. Souza et al. (2024) realizaram um estudo de ovinos Pantaneiros, utilizando o chip *OvineSNP50*, e observaram valores de $H_e = 0,434$, $H_o = 0,398$ e $F_{IS} = 0,095$. Nogueira et al. (2021), utilizando o chip *Equine GGP 70K*, observaram valores de $H_e = 0,307$ e $H_o = 0,311$, porém não foi feito o coeficiente de endogamia. Esses resultados mostram que, para os ovinos, o *Beadchip* customizado da Embrapa (EMBRAPA multispecies 65K *Illumina Infinium 1* chip) é tão eficiente quanto o *OvineSNP50* e de menor custo, visto que os resultados obtidos foram próximos. Para os equinos, os resultados obtidos apresentam uma certa discrepância. Uma hipótese para essa diferença é a proba-

bilidade dos equinos estudados por Nogueira et al. (2021) serem menos miscigenados, visto que são os mesmos animais que foram introduzidos na análise de estrutura populacional (Figura 8), porém os valores continuam dentro da faixa esperada.

Os valores de heterozigosidade obtidos para esse Núcleo de Conservação estão na mesma faixa dos reportados para rebanhos da América do Sul e Europa, indicando relativamente alta taxa de diversidade genética (Silva et al. 2024). Os níveis obtidos são satisfatórios, o que significa que o manejo do rebanho de conservação está sendo feito de forma adequada e, com as novas informações adquiridas e continuidade do manejo adequado, a tendência é que a diversidade genética seja mantida em níveis elevados.

A matriz genômica dos equinos Pantaneiros (Figura 5) revelou um animal, RN 89009, com identidade genômica com outro animal, RN 77704. A hipótese mais provável é um erro laboratorial, onde as amostras provavelmente foram misturadas. Esses tipo de erro podem acontecer no momento da coleta, extração do DNA e até mesmo na montagem do material a ser enviado para a genotipagem. Por essa razão o animal RN 89009 foi excluído das análises genéticas posteriores. A matriz genômica dos reprodutores de ovinos Pantaneiros (Figura 4) apontou um grau de relacionamento 0,5 entre os machos RN 122217 e RN 109109, e seu teste de paternidade não deu resultado significativo. Como não há informação de pedigree depositado no Alelo Animal, não se sabe ao certo qual é o grau de parentesco entre eles.

O objetivo da matriz IBD reduzida de reprodutores em ovinos (Figura 4) e equinos (Figura 6) é gerar uma visão direta do grau de relacionamento entre os machos disponíveis no Núcleo para cruzamentos. O manejo do rebanho fica facilitado em casos de descarte ou venda de animais, onde pode-se escolher animais mais aparentados como prioridade. O cruzamento entre fêmeas menos aparentadas com esses reprodutores mantém ou eleva a variabilidade genética do rebanho. Lembrando que as matrizes IBD são maleáveis e em caso de seleção de fêmeas reprodutoras podem também ser direcionadas a elas. O manejo genético de rebanhos de conservação através de índices de relacionamento entre os animais é desejável, pois o mesmo garante ao menos manutenção dos níveis de variabilidade genética evitando endogamia quando possível (Blackburn et al., 2015).

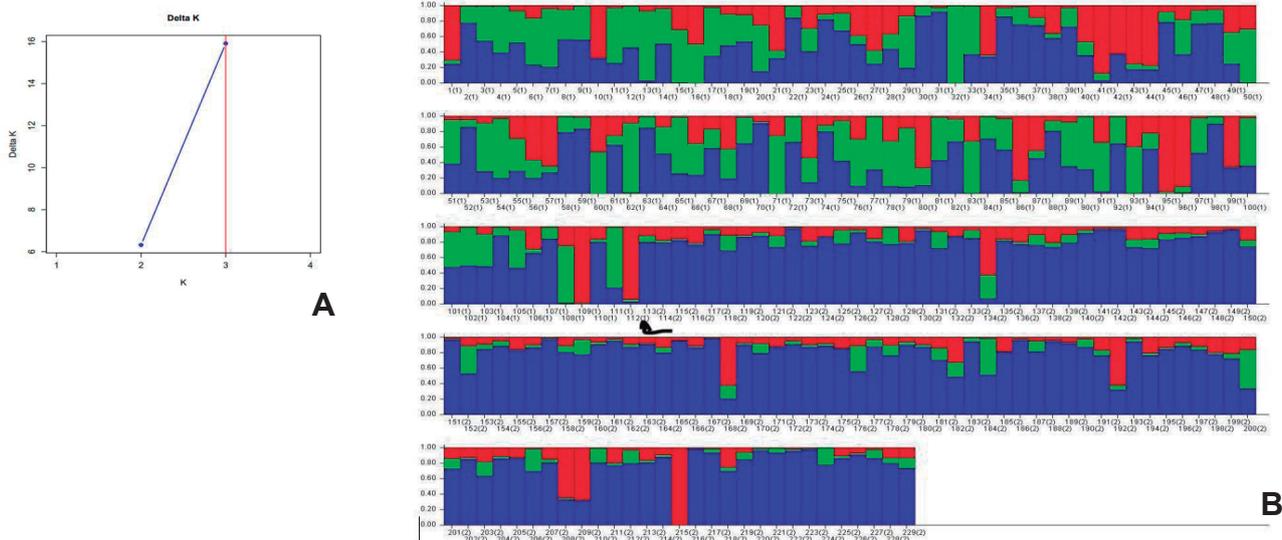


Figura 8 - Clusterização baseada no modelo utilizado pelo software STRUCTURE para K = 3 (A). Cada barra vertical representa a ancestralidade estimada de cada animal dentro de cada cluster (B), sendo os animais de 1 a 112 Pantaneiros do Núcleo de Conservação atual da Embrapa Pantanal e do 113 ao 229 amostras de animais pantaneiros genotipados e armazenados no Banco de DNA e Tecidos da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

A análise de estrutura genética dos ovinos Pantaneiros indica uma miscigenação com a raça Santa Inês, que já foi reportada por pesquisadores do Núcleo (dados não publicados). As fêmeas denominadas controle (mestiças) RN 39873, RN 109073 e RN 1090106, apresentam nenhuma ou praticamente nenhuma miscigenação com Santa Inês, com exceção da RN 39846 que possui 25% do seu genoma com ancestralidade na raça Santa Inês. É importante ressaltar que a raça Santa Inês por si só é uma raça miscigenada originada de cruzamentos entre outras raças de ovinos (Paiva et al., 2005). Uma hipótese para a miscigenação não ter sido apontada nos demais animais é a origem e pureza do rebanho de Santa Inês que foi usado como comparação, este pertence à Embrapa Caprinos e Ovinos, que corresponde ao Núcleo de Conservação da raça (dados genotipados com OvineSNP50 BeadChip, não publicados). Já Paim et al., (2021) demonstram que não é possível separar as raças Pantaneira, Bergamácea e Santa Inês utilizando SNP chips.

Outros animais dentro do rebanho ovino Pantaneiro possuem 50% de ancestralidade de seu genoma em Santa Inês, por exemplo: RN 53410, RN 39892, RN 53413, RN 39889, RN 53423, RN 109109, RN 109107, RN 122217 e RN 109102. O resultado é de imediato aplicável no manejo do núcleo de conservação uma vez que animais considerados mestiços ou miscigenados devem ser isolados do rebanho de conservação da raça (Blackburn et al., 2015). O resultado alerta que os níveis altos de diversidade genética podem estar mascarados pela miscigenação com outra raça.

A estrutura presente no cavalo Pantaneiro não foi muito significativa, visto que temos animais de todas as estratificações no rebanho atual e no Banco de DNA. Uma hipótese, de acordo com Nogueira et al. (2021), é uma diferenciação dentro da própria raça dando origem a grupamentos genéticos distintos que em sua maioria não são fenotipicamente divergentes, dificultando a identificação e prevenção da miscigenação. O resultado é importante e ajuda no manejo do Núcleo, porém ainda falta elucidação. É importante ressaltar que animais miscigenados não são reconhecidos por suas Associações de Reprodutores. Quando se trata de grupos genéticos nacionais ou localmente adaptados, muitas vezes nem a raça em si é reconhecida no Ministério da Agricultura ainda. O uso e propagação de animais mestiços entre duas raças dificulta o reconhecimento do animal e até mesmo da raça em si (Paiva et al., 2005).

Os testes de exclusão de paternidade são essenciais para manejo e certificação do rebanho/raça. O pedigree do animal é importante no momento do registro do mesmo na Associação de Produtores. Resultados aqui obtidos que não estão na plataforma Alelo Animal serão adicionados com o intuito de aumentar a informação nos pedigrees dos animais auxiliando a escolha de reprodutores e matrizes para cruzamentos. Até mesmo os pedigrees que foram confirmados na análise genômica deve ser adicionados à Plataforma proporcionando uma garantia extra da qualidade desse pedigree.

Tabela 3 - Validação do teste de paternidade e maternidade dos equinos genotipados da raça Pantaneira. A identificação de cada progênie é feita por meio do RN ID (*Repository Number*) do animal, cadastrado na plataforma Alelo Animal.

Progênie	Possível mãe	Número de marcadores comparados	Número de marcadores não coincidentes	LOD score	Delta	Possível pai	Número de marcadores comparados	Número de marcadores não coincidentes	LOD score	Delta
122225	46999	1476	2	1,54E+16	1,26E+16	46114	1475	3	1,95E+16	1,79E+16
122224	450	1429	1	1,67E+16	1,62E+16	36252	1470	3	1,24E+16	1,22E+16
122223	36229	1310	0	1,5E+16	1,03E+16	36252	1314	1	1,05E+16	7,56E+15
126394						36252	1467	0	1,2E+16	2,41E+15
126393						36252	1457	2	1,31E+16	1,31E+16
88933						46114	1472	0	2,25E+16	2,25E+16
77704						46114	1475	2	1,72E+16	0,00E+00
77699	440	1404	0	1,86E+16	1,11E+16	36252	1401	1	1,24E+16	1,05E+16
88931	455	1472	1	1,81E+16	1,99E+15	46114	1471	2	1,92E+16	1,92E+16
89009						46114	1475	2	1,72E+16	0,00E+00
88930	35888	1471	1	2,03E+16	2,03E+16	36252	1469	1	1,32E+16	1,26E+16
77828						36252	1471	0	1,97E+16	2,78E+15
77818	473	1466	1	1,96E+16	1,62E+16	46114	1466	3	1,73E+16	1,55E+16
88929	460	1395	0	1,79E+16	1,59E+16					
88927	450	1430	1	1,76E+16	1,43E+16	36252	1472	0	1,14E+16	1,14E+16
77698						36252	1470	2	1,3E+16	5,88E+15
88929						36252	1468	0	1,63E+16	9,8E+15
88928						36251	1474	2	1,44E+16	1,22E+16
77823						36251	1468	0	1,51E+16	1,15E+16
77825						36251	1468	2	1,5E+16	6,94E+15
88927						36251	1474	2	1,2E+16	1,2E+16
48680	437	1466	1	2,03E+16	2,03E+16	36252	1471	1	1,47E+16	1,15E+16
48672	473	1472	2	1,68E+16	1,68E+16	36252	1469	2	1,07E+16	4,87E+15
48675						36252	1472	1	1,23E+16	8,41E+15
48676						36252	1469	0	1,27E+16	8,78E+15
48683	455	1473	0	1,84E+16	1,84E+16	46114	1473	3	1,78E+16	1,65E+15
48677						36252	1469	0	1,85E+16	1,66E+15
48673	440	1475	1	1,73E+16	9,77E+15	36252	1472	4	1,13E+16	5,98E+15
48678	439	1475	1	1,97E+16	1,97E+16	36252	1472	1	1,39E+16	1,28E+16
48681						36252	1472	0	1,4E+16	1,38E+16
48684	35945	1474	2	1,72E+16	1,72E+16	36252	1472	2	1,3E+16	1,28E+16
48682	460	1398	0	2E+16	1,44E+16	46114	1472	2	2,05E+16	1,52E+16
47006	437	1464	1	1,97E+16	1,90E+16	35936	1473	4	1,72E+16	5,61E+15
47001	473	1473	2	2,43E+16	2,25E+16	35936	1474	3	2,14E+16	1,76E+16
109115	450	1429	2	1,6E+16	1,44E+16					
46993	35888	1473	3	2,13E+16	2,00E+16	35936	1475	3	2,06E+16	1,42E+16
46995						35936	1475	2	1,89E+16	1,76E+16
46989	455	1475	1	1,88E+16	1,88E+16					
46693	440	1472	1	1,65E+16	5,00E+15					
109116	473	1474	3	1,81E+16	1,22E+16					
109117						35936	1473	2	1,71E+16	1,32E+16
36275	35888	1445	1	2,3E+16	2,23E+16					
36281						35936	1468	1	1,63E+16	1,44E+16
36287	437	1466	1	1,88E+16	1,88E+16	35936	1475	1	1,8E+16	6,41E+15
36271	440	1475	1	1,6E+16	1,04E+16					
36269	460	1382	0	1,64E+16	1,39E+16					
36273	450	1429	2	1,76E+16	1,76E+16					
36262	455	1457	0	1,87E+16	1,87E+16					
36264	473	1475	4	1,94E+16	1,82E+16					
36265	451	1468	2	2,23E+16	2,19E+16					
35938	440	1474	0	1,79E+16	1,13E+16					
460	437	1394	0	1,9E+16	0,00E+00					

CONCLUSÃO

1. As análises de diversidade genética demonstraram baixa endogamia para ambos rebanhos da Embrapa Pantanal, o que é satisfatório;
2. A estrutura genética dos ovinos Pantaneiros mostra a presença de animais miscigenados com a raça Santa Inês;
3. Em relação à análise da estrutura genética dos equinos Pantaneiros, não foi possível elucidar a questão da miscigenação presente, se seria realmente mistura ou alta diversidade genética com ações de deriva entre grupamentos genéticos da própria raça;
4. Os testes de exclusão de paternidade/maternidade evidenciaram e certificaram trios e duos, oferecendo informações essenciais para a escolha estratégica de cruzamentos entre animais menos aparentados.
5. A aplicação das ferramentas genômicas apoia o manejo dos rebanhos, favorecendo a otimização da diversidade genética e a preservação dos recursos genéticos animais.
6. O uso das ferramentas genômicas auxiliam no manejo de ambos rebanhos Pantaneiros abordados, apresentando uma oportunidade de enriquecer estratégias de conservação, contribuindo na expansão do banco de germoplasma animal da Embrapa e fornecendo uma base para coletas e pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, M. do S. M.; IANELLA, P. (Ed.). **Inventário de recursos genéticos animais da Embrapa**. Brasília, DF: Embrapa, 2016. 108 p.
- BARBOSA-FERREIRA, M. **Resumo histórico do ovino pantaneiro**. 2011. Disponível em: <http://www.ruralcentro.com.br/analises/2214/resumo-historico-do-ovinopantaneiro>. Acesso em: maio de 2024
- BLACKBURN, H.; BOETTCHER, P.; OLDENBROEK, J. K. Conservation: the state of the art. In: SCHERF, B. D.; PILLING, D. (Ed.). *The second report on the state of the world's animal genetic resources for food and agriculture*. p. 497-527. FAO, 2015. Disponível em: <https://edepot.wur.nl/407383>. Acesso em: setembro de 2024.
- CARVALHO, É. S.; BERSELLI, C.; JULIANO, R. S.; SANTOS, S. A. Recursos genéticos no Brasil: a base para o desenvolvimento sustentável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 4., 2016, Curitiba, PR. **Anais...** Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2016. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1065951>. Acesso em: maio de 2024.
- CRUZ, C. D.; FERREIRA, F. M.; PESSONI, L. A. **Biometria aplicada ao estudo da diversidade genética**. Viçosa: Suprema, 2011. 620 p.
- 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, jul. 2005.
- KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 5, Mar. 2007.
- LI, Y.; LIU, J. X. StructureSelector: a web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. **Molecular Ecology Resources**, v. 18, n.1 p. 176-177, 2018.
- MCMANUS, C. M.; SANTOS, S. A.; SILVA, J. A. da; LOUVANDINI, H.; ABREU, U. G. P. de; SERENO, J. R. B.; MARIANTE, A. da S. Body indices for the Pantaneiro horse. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 5, p. 362-370, 2008.
- MENDES, E. D. M.; COMASTRI FILHO, J. A.; CRISPIM, S. M. A. **Núcleos de conservação Fazenda Nhumirim**. Corumbá, Embrapa Pantanal, 2012. 13 p. Folder.
- NOGUEIRA, M. B.; MCMANUS, C.; FARIA, D. A. de; SANTOS, S. A. O.; IANELLA, P.; PAIVA, S. R. Fine-scale genetic diversity of the Brazilian Pantaneiro horse breed adapted to flooded regions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53, n. 6, p. 525, 2021.
- PAIM, T. P.; PAIVA, S. R.; DE TOLEDO, N. M.; YAMAGHISHI, M. B.; CARNEIRO, P. L. S.; FACÓ, O.; DE ARAÚJO, A. M.; AZEVEDO, H. C.; CAETANO, A. R.; BRAGA, R. M.; MCMANUS, C. Origin and population structure of Brazilian hair sheep breeds. **Animal Genetics**, v. 52, n. 4, p. 492-504, 2021.
- PAIVA, S. R.; MARIA, A. N.; MARCONDES, C. R.; FIGUEIREDO, E. A. P.; MCMANUS, C. Aplicação de marcadores moleculares na conservação e melhoria de um rebanho da raça Santa Inês. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **A produção animal e o foco no agronegócio**: anais. Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005. 4 f. CD-ROM. Dispo-

nível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/531812>. Acesso em: setembro de 2024

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

SANTOS, S. A.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. da S.; SERENO, J. R. B.; SILVA, J. A. da; EGITO, A.; ABREU, U. G. P. de; COMASTRI FILHO, J. A.; LARA, M. A. **Estratégias de conservação in situ do cavalo Pantaneiro**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 29 p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 55).

SANTOS, S. A. S.; PAIVA, S. R.; COMASTRI FILHO, J. A.; RAMOS, A. F.; JULIANO, R. S.; NOGUEIRA, M. F.; PÉRES, I. A. H. F. S. Histórico, vivências e desafios do núcleo de conservação do cavalo Pantaneiro. **Revista Científica de Produção Animal**, v. 22, n. 2, p. 67-72, 2021. Disponível em: <https://periodicos.ufpb.br/index.php/rcpa/article/view/57818>. Acesso em: agosto de 2024.

SERENO, F. T. P. de S.; SERENO, J. R. B.; VEGA-PLA, J. L.; DELGADO, J. V. DNA testing for parentage verification in a conservation nucleus of Pantaneiro horse. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 64-67, 2008.

SILVA, K. M.; MESQUITA, T. A.; CASTRO, C. S. P.; COUTINHO, M. V. **Núcleos de Conservação Animal da Embrapa Caprinos e Ovinos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018. 19 p. (Requisitos Corporativos de Qualidade 5ª Cartilha).

SNP & VARIATION SUITE™, (Versão 8.x) [Software]; Golden Helix, Inc.: Bozeman, MT, EUA. Disponível em: <http://www.goldenhelix.com>. Acesso em: abril de 2024.

SOUZA, L. A. de; ARAÚJO, A. M. de; DINIZ SOBRINHO, F. de A.; BAJAY, M. M.; JULIANO, R. S.; REIS, F. A.; FERREIRA, M. B.; VEGA-BRITEZ, G. D.; VARGAS JUNIOR, F. M. de. SNP Markers: analysis of genetic diversity and identification of genomic regions in pantaneiro sheep and texel sheep under natural selection. **Frontiers in Bioscience**, v. 29, 2024.

WEIR, B. S. **Genetics data analysis II: methods for discrete population genetic data**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 455 p.



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E
PECUÁRIA