



BRENNDA PAULA GONÇALVES ARAUJO

**GENETIC DIVERGENCE AND PHENOTYPIC
CHARACTERIZATION IN THE MANGALARGA MARCHADOR
BREED**

**LAVRAS – MG
2023**

BRENNDA PAULA GONÇALVES ARAUJO

**GENETIC DIVERGENCE AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION IN THE
MANGALARGA MARCHADOR BREED**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de Mestre**

**Dr^a. Sarah Laguna Conceição Meirelles
Orientadora**

LAVRAS - MG

2023

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Araujo, Brennda Paula Gonçalves.

Genetic divergence and phenotypic characterization in the
Mangalarga Marchador breed / Brennda Paula Gonçalves Araujo. -
2023.

62 p. : il.

Orientador(a): Sarah Laguna Conceição Meirelles.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. equine. 2. microsatellites. 3. principal components. I.
Meirelles, Sarah Laguna Conceição. II. Título.

BRENNDA PAULA GONÇALVES ARAUJO

**GENETIC DIVERGENCE AND
PHENOTYPIC CHARACTERIZATION IN
THE MANGALARGA MARCHADOR
BREED**

**DIVERGÊNCIA GENÉTICA E
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA NA
RAÇA MANGALARGA MARCHADOR**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras
como parte das exigências do
Programa de Pós Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de Mestre**

APROVADA EM 19 DE ABRIL DE 2023.

Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles UFLA

Dra. Silvina Diaz UNLP

Dr. Caio Augusto Perazza USP

Orientadora

Dra. Sarah Laguna Conceição Meirelles

LAVRAS – MG

2023

A Deus por sempre cuidar de mim e me manter forte no caminho que ele trilhou
DEDICO

A minha família que sempre me apoiou e incentivou em todos esses anos
OFEREÇO

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a Deus, pois sem ele, não seria possível eu estar aqui e tendo a oportunidade de realizar mais uma etapa do meu sonho.

Agradeço a minha Mãe, Deborah, por sempre me apoiar, incentivar e principalmente por todos os ensinamentos que me deu e ainda tem me dado, agradeço também a por todas as orações que tens feito por mim. Muito obrigada por ser exatamente como você é, eu te amo muito!

Agradeço ao meu pai, Marcelo, e minha madrasta, Mirian, que sempre estiveram presentes em minha vida, me ajudando e auxiliando de todas as formas possíveis, se preocupando e zelando por mim, eu os amo muito!

Agradeço aos meus familiares em geral por sempre demonstrarem muita confiança e me incentivarem a conquistar meus sonhos.

Agradeço a Ana Karla e Ana Luiza que além de serem muito importantes na minha vida como amigas, ainda me deram a oportunidade de ter suas famílias como minhas famílias aqui em Minas, por terem estado comigo em muito momentos, por me acolherem, por cuidarem de mim e por me carregarem como membro da família para vários eventos. Sério, sem vocês e estadia aqui não teria sido a mesma e com certeza seria menos aconchegante e familiar, eu amo vocês!

Agradeço a Cacau, nossa mascotinha, que sempre nos trouxe alegria, carinho e aconhego, que em dias que eu não estava bem, percebia e simplesmente vinha ficar próxima a mim, em forma de solidariedade, te amo neném!

Agradeço aos amigos Gustavo, Silas, Gustavinho, Aurelio e Yasmin que conquistei aqui, ao longo desses dois anos, amigos que quero levar pra vida e que foram muito importantes, sejam em momentos de risada, diversão e também de choros, obrigada pelo apoio de vocês!

Agradeço ao Grupo de melhoramento genético animal e biotecnologia (GMAB) e todos seus integrantes, por todo aprendizado, trocas e também por nossas confraternizações.

Agradeço aos meus amigos do Rio de Janeiro que mesmo de longe sempre estiveram me apoiando, mandando energias positivas, incentivando e acreditando que eu conseguiriam concluir mais essa etapa.

Agradeço as minhas crianças, Fellipe, Laura, Luiza, Gabi, Maju e Mia por serem as minhas alegrias quando eu voltava pro Rio, por me mandarem videos, audios sempre me lembrando o quando vocês são incríveis e agradeço por entenderem a minha ausência necessária, eu amo vocês!

Agradeço a minha professora e orientadora Sarah Meirelles, que me apoiou, confiou em mim e me deu uma oportunidade no melhoramento genético mesmo eu nunca tendo trabalhado nessa área, muito obrigada pela paciência, ensinamentos e cuidados. A senhora se tornou mais que uma

orientadora, tenho um carinho enorme por você!

Agradeço ao professor Caio Perazza, que me auxiliou muitas vezes e que contribuiu de várias formas meu crescimento acadêmico e profissional.

Agradeço a Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Mangalarga Marchador por pelos dados cedidos e a oportunidade de trabalhar com a raça.

Agradeço a todos os cavalos que contribuíram para que meu trabalho pudesse ser realizado, tenho grande respeito e admiração por eles.

Agradeço a Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós Graduação em Zootecnia pela oportunidade e por terem sido a minha casa por esses anos, pelos aprendizados e contribuições na minha vida pessoal e acadêmica.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio na execução desta pesquisa científica e pela bolsa cedida.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

Muito obrigada!

“Um cavalo é poesia em movimento,
ele pode nos emprestar a liberdade
e a força que não temos.”

Autor desconhecido

Não se preocupe com nada, em vez disso, ore por tudo. Diga a Deus o que você precisa e agradeça a ele por tudo que ele fez.

Filipenses 4,6

RESUMO

A raça Mangalarga Marchador (MM) iniciou a formação na região sul do estado de Minas Gerais através do cruzamento de éguas nativas com um garanhão da raça Puro Sangue Lusitano. Ao longo dos anos, as famílias sul mineiras começaram a selecionar os animais de acordo com os próprios interesses e preferências pessoais, formando assim, linhagens dentro da raça com características individuais. Pesquisas científicas sobre as linhagens na raça MM são escassas quando comparadas a outras raças, com isso há muitos questionamentos sobre as afirmações históricas feitas sobre elas. De acordo com o livro “Costelas do abismo” de Ricardo Casiuch, baseado em informações históricas, é apresentada a existência de linhagens na raça. Os objetivos dessa pesquisa foram identificar se existem linhagens na raça MM utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites e descrever a caracterização fenotípica dessas linhagens, para que seja utilizado como ferramenta ao se selecionar os indivíduos de acordo com o objetivo de seleção de cada criador. Os bancos de dados utilizados foram provenientes da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Mangalarga Marchador. O banco de genotipagem continha 255.257 equinos da raça MM, nascidos entre os anos de 2005 a 2021. Além deste, foi utilizado um banco com informações de pedigree de 622.299 animais nascidos de 1952 a 2020 e um banco de fenótipos avaliados no momento do registro definitivo contendo 303.248 animais nascidos de 1950 a 2018. Para a verificação da existência de diferenças genéticas de acordo com a linhagem na raça, foi realizada a análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC) implementada pelo pacote adegenet 2.0.0 (Jombart, 2008) do programa R e para a realização da caracterização fenotípica foi utilizado o teste de Kruskal Wallis no programa R, para comparação das medianas das medidas morfométricas. A análise de DAPC demonstrou diferenciação genética das linhagens Angai e Herdade, em relação às demais. No teste de Kruskal Wallis, a linhagem Herdade, apresentou maior diferenciação em relação aos 3 grupos de comparação, demonstrando que os animais dessa linhagem são menores e mais reunidos, além de apresentarem maior pontuação para andamento e morfologia. Desta forma, este estudo conclui que, quando comparadas às linhagens da raça MM descritas historicamente, a raça não apresenta tantos grupos genéticos distintos, separando em apenas 3 grupos, e quando comparada às características fenotípicas, apenas 1 linhagem se diferenciou.

Palavras-chaves: componentes principais equinos linhagens melhoramento genético microssatélites

ABSTRACT

The Mangalarga Marchador (MM) breed is characterized by its elegant size, docile temperament and for being suitable for riding. Over the years, families in southern Minas Gerais began to select animals according to their own interests and personal preferences, thus forming lineages within the breed with individual traits. Scientific research on lineages in the MM breed is scarce compared to other breeds, so there are many questions about historical claims made about them. According to the book “*Costelas do Abismo*” by Ricardo Casiuch, based on historical information, the existence of lineages in the breed is present. The objectives of this work were to identify if there are lineages in the MM breed using microsatellite markers and to describe the phenotypic characterization of these lineages, so it can be used as a tool when selecting individuals according to the selection objective of each breeder. The databases used came from the Brazilian Association of Mangalarga Marchador Horse Breeders. The genotyping database contained 255,257 MM horses, born between 2005 and 2021. In addition, a database with pedigree information of 622,299 animals born from 1952 to 2020 and a phenotypes database evaluated at the time of definitive registration were used, containing 303,248 animals born from 1950 to 2018. To verify the existence of genetic differences according to lineage in the breed, a discriminant analysis of principal components (DAPC) implemented by the adegenet 2.0.0 package (Jombart, 2008) of the R software was performed and to carry out the phenotypic characterization, the Kruskal Wallis test in the R software was used to compare the means of morphometric measurements. The DAPC analysis demonstrated genetic differentiation of the lineages Angai and Herdade in relation to the others. The lineage Herdade showed greater differentiation in relation to the 3 comparison groups, demonstrating that the animals of this lineage are smaller and more closely grouped, in addition to presenting higher scores for gait and morphology. Thus, this study concludes that, when compared to the historically described MM lineages, the breed does not present as many distinct genetic groups, separating it into only 3 groups (Angai, Herdade and General), and when compared to the phenotypic characteristics, only the lineage Herdade stood out.

Keywords: equine genetic improvement lineages microsatellites principal components

INFOGRÁFICO - Criado por Brennda Paula Gonçalves Araujo e supervisionado por Sarah Laguna Conceição Meirelles



DIVERGÊNCIA GENÉTICA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA NA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

OBJETIVOS

- Identificar geneticamente possíveis linhagens na raça MM utilizando SSR.
- Descrever a caracterização fenotípica dessas linhagens.

MICROSSATÉLITES - SSR

DNA - PAI E MÃE



LINHAGENS

- Caxambu
- Angaí
- Herdade
- Catuni
- Porto
- Traituba
- Narciso
- Favacho
- Passa tempo
- Bela Cruz
- Tabatinga

GENÉTICO RESULTADOS FENOTÍPICO



LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número de animais por origens/linhagens e número total de equinos avaliados da raça Mangalarga Marchador.....	35
Tabela 2. Valores de Fis para cada locus em relação a cada linhagem/origem estudada na raça Mangalarga Marchador.....	39
Tabela 3. Coeficiente de endogamia pelo método TrioML coancestry de cada linhagem da raça Mangalarga Marchador.....	40
Tabela 4. Coeficiente de parentesco pelo método TrioML coancestry entre as linhagens da raça Mangalarga Marchador.....	41
Tabela 5. Alelos privativos pertencentes às linhagens Bela Cruz, Catuni, Caxambu, Favacho e Herdade.....	43
Tabela 6. Valores de probabilidade obtidos para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg verificado nas linhagens da raça Mangalarga Marchador.....	44
Tabela 7. Tamanho efetivo da população (N_e) em cada linhagem da raça Mangalarga Marchador a 0.05.....	45
Tabela 8. Valores médios das análises de D-Jost para cada locus estudado na raça Mangalarga Marchador.....	46
Tabela 9. Valores de D-Jost das relações entre linhagens na raça Mangalarga Marchador.....	47
Tabela 10. Intervalo de confiança dos valores de D-Jost a 95% entre as linhagens da raça Mangalarga Marchador.....	48
Tabela 11. Valores de D-Jost das relações entre os grupos genéticos separados pós DAPC....	53
Tabela 12. Valores do teste de Kruskal Wallis em comparação às linhagens, de acordo com as medidas morfométricas dos animais da raça Mangalarga Marchador.....	54
Tabela 13. Valores de média, mínimo, máximo e coeficiente de variação em relação às medidas morfométricas na linhagem Angai.....	55
Tabela 14. Valores de média, mínimo, máximo e coeficiente de variação em relação às medidas morfométricas no grupo Geral.....	56
Tabela 15. Valores de média, mínimo, máximo e coeficiente de variação em relação às medidas morfométricas na linhagem Herdade.....	57

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE - REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1. Variação da população equina no Brasil entre os anos 1974 a 2021 (IBGE,2021).....15

SEGUNDA PARTE - ARTIGO

Figura 1. Porcentagem de dados perdidos em cada origem/linhagem de acordo com cada locus estudado e porcentagem média total.....36

Figura 2. Nível de confiabilidade em relação ao número de locus estudados na raça Mangalarga Marchador.....37

Figura 3. Número ideal de componentes principais (PCs) a serem retidas através do α -score.....48

Figura 4. Análise discriminante dos componentes principais (DAPC), utilizando marcadores microssatélites em linhagens de equinos da raça Mangalarga Marchador (Scatterplot).....49

Figura 5. Análise discriminante por meio de componentes principais (DAPC), utilizando marcadores microssatélites em linhagens de equinos da raça Mangalarga Marchador (Compplot).....50

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE - REFERENCIAL TEÓRICO	14
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Equinos.....	15
2.2. Raça Mangalarga Marchador (MM).....	15
2.3 Linhagens da Raça MM.....	17
2.4 Registro genealógico da raça MM.....	18
2.5 Testes de DNA na raça MM.....	18
2.6 Microssatelites (SSR).....	19
2.7 Tamanho efetivo da população.....	20
2.8 Fis, Fst e Fit.....	20
2.9 D-Jost e Gst.....	21
2.10 Identificação de linhagens.....	21
2.11 Características morfológicas avaliadas na raça Mangalarga Marchador.....	23
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
SECOND PART – ARTICLE/PAPER	32
1. INTRODUCTION	32
2. MATERIAL AND METHODS	33
2.1 Database.....	33
2.2 Animal selection criteria	33
2.3 Statistical analysis.....	34
2.4 Phenotypic characterization	35
3. RESULTS	35
4. DISCUSSION	55
5. CONCLUSION	59
6. REFERENCES	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

A raça Mangalarga Marchador (MM) teve o início na região sul do estado de Minas Gerais através do cruzamento de éguas nativas com um garanhão da raça Puro Sangue Lusitano. Os acasalamentos deram origem a animais de porte elegante, temperamento dócil e próprio para montaria, o que caracteriza a raça (CASIUCH, 2016). A raça MM possui o maior número de exemplares criados, e devido a contribuição no desenvolvimento social e econômico brasileiro, foi considerada patrimônio nacional pela lei nº 12.975/2014, para que pudesse garantir sua preservação e diversidade genética (ABCCMM, 2020).

Ao longo dos anos, as famílias sul mineiras começaram a selecionar os animais de acordo com os próprios interesses e preferências pessoais, formando “linhagens” na raça com características individuais, utilizando acasalamentos, na maioria das vezes endogâmicos, na tentativa de buscar maior padronização, em particular para fixação de características de andamento (Costa *et al.* 2005a). O desenvolvimento da raça valorizava principalmente animais com características para o trabalho nas propriedades rurais, cavalgadas, caçadas e provas esportivas, além de comodidade, rusticidade, docilidade e marcha adequada (BECK, 1992).

Pesquisas científicas sobre as linhagens na raça MM são escassas quando comparadas a outras raças, com isso, há muitos questionamentos sobre as afirmações históricas feitas sobre elas. Casiuch (1997 e 2016) e Bortoni (1991), afirmam historicamente a existência de linhagens na raça.

Costa *et al.* (2005b) e Santos *et al.* (2019) realizaram estudos buscando identificações de linhagens na raça, porém nenhum deles buscou a diferenciação genética utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR). Entretanto, Souza (2021) realizou uma pesquisa para identificar a existência de possíveis linhagens na raça Mangalarga Marchador, levando em consideração a frequência alélica de marcadores microssatélites, porém também não observou separação de linhagens na raça MM.

Como podemos observar, existem poucos estudos dentro da raça MM com objetivo em identificar linhagens e isso é importante para a caracterização racial e para o conhecimento da variabilidade genética da raça, possibilitando o conhecimento posteriormente se existe diferenças fenotípicas entre as linhagens, podendo assim ser uma ferramenta para auxiliar na seleção.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

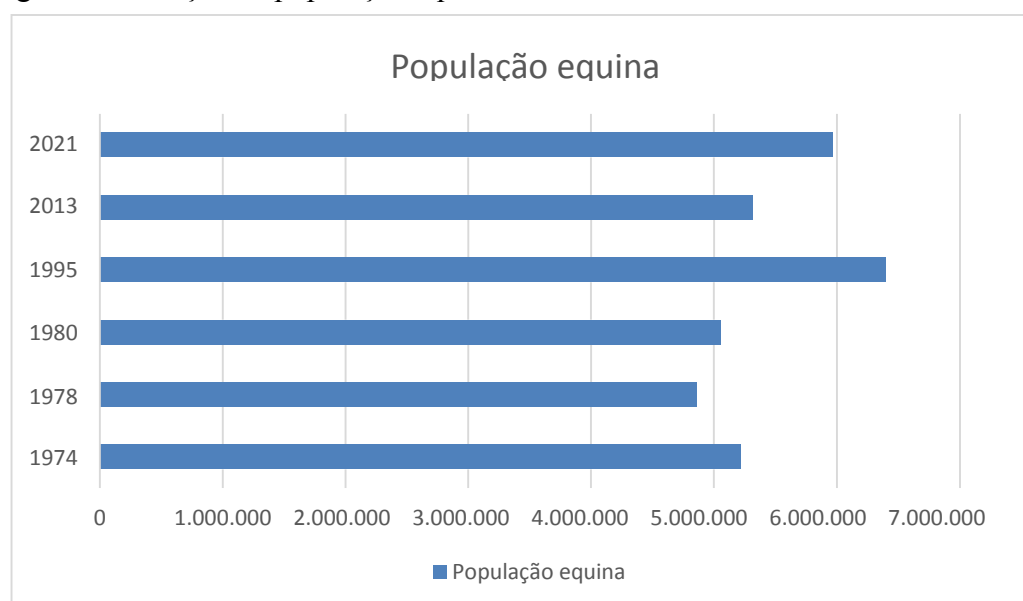
2.1 Equinos

Ao longo das décadas foi possível observar variações sobre a utilização do equino na sociedade. Foi observado por Procópio (2003), a possibilidade da influência negativa entre a mecanização e a evolução industrial com relação a utilização dos equinos nas atividades agropecuárias. Essa influência inicialmente foi percebida pelo desuso dos cavalos. Entretanto, com o passar dos anos começaram a surgir outros meios de utilização dos equinos, demonstrando que além da força de trabalho e transporte, ele também poderia ser utilizado nas atividades de lazer, equoterapia, militares, esportes hípicas e entre outros.

É possível perceber a expressiva representatividade dos cavalos nas áreas urbanas a partir do século XX. Nesse momento ocorria o crescimento exponencial das empresas o que promovia competição entre elas, levando os funcionários a exaustão e estresse, com isso, foi intensificado o uso dos equinos como alternativa de lazer e terapia, a fim de auxiliar as pessoas nesses períodos (PROCÓPIO, 2008).

Entre os anos de 1974 até 2021 pode-se observar a variação da população de equinos no Brasil, demonstrando que após uma queda brusca em 2013, o rebanho nacional está em ascensão novamente (IBGE, 2021) (Gráfico 1).

Figura 1. Variação da população equina no Brasil entre os anos 1974 a 2021



(IBGE,2021).

2.2 Raça Mangalarga Marchador (MM)

De acordo com a história, a raça originou-se no sul de Minas Gerais a cerca de 200

anos, proveniente do cruzamento de éguas nativas denominadas “crioulas” com um garanhão Puro Sangue Lusitano. O garanhão foi cedido por D. João VI ao Barão de Alfenas, Gabriel Francisco Junqueira, patriarca da família Junqueira. O barão era proprietário da fazenda Campo Alegre, em Cruzília-MG, considerada o berço do MM (CASIUCH, 2016).

Os acasalamentos deram origem a animais de porte elegante, temperamento dócil e próprio para montaria. A raça Mangalarga do Brasil também tem essa origem histórica, e começou a se diferenciar do MM quando parte da família Junqueira migrou para o estado de São Paulo, e realizaram cruzamentos com outras raças (Árabe, Anglo Árabe, Puro Sangue Inglês e American Saddle Horse) com o objetivo de modificar a conformação e andamentos para que favorecessem a topografia plana da região, diferente do que observado no estado de Minas Gerais, conseqüentemente necessitando a mudança de andamento desses animais. Ambas raças iniciaram o controle genealógico oficial a partir de 1934 com a fundação Associação Brasileira de Criadores de Cavalos da Raça Mangalarga (ABCCMM, 2020; ABCCRM, 2020; BAENA, 2019; CASIUCH, 2016).

A Associação Brasileira dos Criadores do Cavalos Mangalarga Marchador (ABCCMM) foi fundada em 16 de julho de 1949, em reunião realizada em Caxambu – MG, atualmente com sede em Belo Horizonte. A partir de sua fundação iniciaram-se os trabalhos de registros genealógicos dos animais, foram estabelecidos padrões morfológicos dentro da raça, algumas avaliadas subjetivamente, o que conseqüentemente direcionou a seleção desses animais. Esta entidade é considerada a maior associação de uma única raça da América Latina, com aproximadamente 11 mil associados em 2016, cinco mil destes no estado de Minas Gerais. A raça, além de distribuída por todo o Brasil, tem também criadores em vários países como os Estados Unidos, Alemanha, Holanda, Bélgica, Portugal, Itália, Canadá, Israel, Peru, Uruguai, Argentina, Congo, França e Dinamarca (SOUZA, 2017).

A abertura do primeiro Livro de Registro de Animais da ABCCMM aconteceu no ano de 1949, de acordo com Livro de Registro Definitivo de Machos (MM3), fechado em 09 de fevereiro de 1982. O registro de número 1 pertence ao garanhão chamado Angahy e foi realizado em de outubro de 1950.

Em 14 de Julho de 2015 entrou em vigor o novo Regulamento do SRG (Serviço de Registro Genealógico) aprovado pelo MAPA, com anuência do Ministério Público Federal (MPF). Regulamento este que está adequado ao Termo de Ajuste de Conduta (TAC) chamado de “Resgate Genético” no qual prevê a utilização e a reabertura dos Livros

Abertos MM3 e MM4 (ABCCMM, 2015).

A primeira vistoria do Livro Aberto aconteceu em Barbacena-MG em 2015. Segundo o relatório de Inspeções do Livro Aberto apresentado pelo SRG, os técnicos da ABCCMM realizaram, desde dezembro de 2015 até janeiro de 2019, 29 vistorias de Livro Aberto em diferentes estados como Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Pernambuco, Goiás e Santa Catarina. Neste período, foram vistoriados 1880 animais, desses, 1.543 obtiveram aprovação para registro. O estado em que mais se realizou vistorias do Livro Aberto foi Minas Gerais, com 14 inspeções e mais de 930 animais aprovados (ABCCMM, 2019).

2.3 Linhagens da raça MM

De acordo com historiadores e pesquisadores, como Casiuch (1997 e 2016) e Bortoni (1991), existem linhagens na raça MM, sendo estas denominadas pilares ou base da raça, que surgiram por volta do início do século XIX. Estas são baseadas nas linhagens masculinas que estão reunidas em apenas seis genearcas, sendo estes denominados: Fortuna, Joia da Chamusca, Sublime, Gregório, Telegrama e Rosilho (ou Abismo) que foram responsáveis pelo estabelecimento e expansão da raça Mangalarga do Brasil e Mangalarga Marchador nos séculos XIX e XX, visto que ambas as raças tiveram a mesma origem no Sul de Minas Gerais.

Dentre estes seis genearcas influentes na raça MM, três consolidaram significativamente a base da raça, sendo estes os animais Fortuna e seus descendentes, Telegrama e seus descendentes e o Abismo (ou Rosilho) e seus descendentes, sendo este último o de maior influência na raça ao longo do século XX, cujo nascimento se deu por volta de 1870 na antiga Fazenda Narciso em Cruzília – MG (CASIUCH, 2016).

Casiuch (2016), dividiu as linhagens da raça MM em três grupos, “linhagens base”, “linhagens de tradição” e “linhagens extintas”. As linhagens base, também chamadas de pilares, tiveram origem nos criatórios onde iniciou a seleção dos animais da raça e foram considerados os “núcleos de criação”, sendo as fazendas, Favacho, Campo alegre, Traituba, Narciso, Campo lindo e Angahy. As linhagens de tradição foram aquelas que tiveram sua origem em animais oriundos das linhagens base submetidos à seleção artificial visando à fixação de características como o andamento, a docilidade, a conformação e a caracterização racial, e serviram como fornecedoras de reprodutores para novas criações que surgiram posteriormente e são elas, Abaíba, Ara, Bela Cruz, Catuni, F.R., Herdade,

Itamotinga, Passa Tempo, Porto, Tabatinga, Caxambu (desmembrada em outras duas linhagens que são Caxambuense e Santa Helena) e Água Limpa (Casiuch, 2016). Já as linhagens extintas contribuíram por um período para a raça MM, mas os criadores pararam de criar ao longo dos anos e estas acabaram desaparecendo, são elas: Engenho de Serra, Leme, Juca Carneiro, Criminosos, Silvestre Goiabal.

Apesar das descrições históricas da raça evidenciarem na maioria das vezes somente os garanhões de maior importância na mesma, segundo Casiuch (2016) um exemplo de seleção com base em linhas maternas é a linhagem Herdade, como exemplo da égua Herdade Alteza, também encontrada por Costa *et al.* (2005b) como a maior contribuinte para a raça. Estes autores verificaram que os animais podem ser subdivididos em grupos familiares, mas mesmo diante das diversas linhagens que são citadas na literatura, somente foram encontrados como representantes da raça MM as linhagens Herdade, Providência, Abaíba, Tabatinga e Angaí.

2.4 Registro genealógico da raça MM

O registro genealógico é realizado em animais a partir dos 36 meses de idade, podendo ou não ter genealogia dos pais conhecida, esse registro pode ser definitivo ou provisório, sendo o provisório para controle do animal e definitivo para equinos adultos. Para que os animais possam entrar no studbook da raça, é necessário que seja realizada a inspeção por técnico habilitado pela ABCCMM. O profissional descreve detalhadamente a pelagem do animal e suas particularidades, além de realização de 12 medidas morfométricas, também é realizada a verificação de microchip aplicado no animal, além de analisado se o equino não apresenta nenhum dos itens de desclassificação de acordo com o padrão racial.

Os animais têm seu andamento e morfologia pontuados, segundo normas preconizadas no padrão racial. Um dos critérios desclassificatórios no momento do registro é o somatório dessas notas que não deve ser inferior a 140 pontos para machos, e 120 pontos para fêmeas (ABCCMM, 2019).

2.5 Testes de DNA na raça MM

O controle dos potros nascidos na raça é feito através do comunicado para que o técnico credenciado pela ABCCMM possa realizar a resenha, aplicação do microchip e coleta de material para exame de DNA e posteriormente emitir o registro provisório (ABCCMM, 2018). Os exames de DNA podem ser DNA-VP quando se tem a verificação

completa de parentesco, paterno e materno. Porém é possível um animal que apresente o exame DNA-AP, que significa que esse animal é testado, porém os pais não apresentam teste de DNA e desta forma não há como confirmar todos os seus ascendentes.

2.6 *Microsatélites (SSR)*

Os microsatélites são repetições de sequências que compõe geralmente de dois a seis nucleotídeos ao longo da molécula de DNA, ocupando uma extensão de até 100 pares de bases. A sequência com maior repetição em animais é a (AC), os quais são distribuídas em todo o genoma de forma aleatória e são flanqueadas por sequências altamente conservadas. Quando comparado as regiões codificadas com as sequências transcritas, as maiores frequências de de SSR são observadas nas transcritas e em algumas regiões com maiores abundâncias como as regiões próximas aos centrômeros e telômeros (GUIMARÃES, 2009).

Devido ao pareamento desalinhado das sequências repetidas que temos a origem do SSR. A consequência desse desalinhamento é a produção de números variados das unidades repetidas, de forma que cada fragmento de microsatélite assume comprimentos diferentes, que podem ser identificados em eletroforese. O SSR é considerado um dos marcadores de maior variabilidade alélica devido a cada um desses fragmentos ser equivalente a um alelo.

É possível identificar os microsatélites através de duas estratégias: por busca de sequências que possuem microsatélites nas bases de dados na internet e outra por construção e seleção de livreria/biblioteca genômica ou de ESTs (*Expressed Sequence Tag*), que são sequências de DNA provenientes de RNA (SANTOS, 2014; BAENA, 2020).

A sua herança de codominância, frequência e distribuição no genoma, alto nível de polimorfismo, possibilidade de detecção em sistemas multiplex e boa repetibilidade são as principais vantagens do uso de marcador. Entretanto, como desvantagem pode-se citar o custo para desenvolver primers específicos de espécies que não estão disponíveis no banco de dados ou que não foram estudadas (FALEIRO *et al.*, 2004).

Até o momento, na raça MM, são realizados testes de verificação de parentesco utilizando marcadores do tipo microsatélites de acordo com ISAG (International Society for Animal Genetics).

2.7 *Tamanho efetivo da população*

O tamanho efetivo é definido levando em consideração o número de machos e de

fêmeas que estão efetivamente se reproduzindo no rebanho, desta forma, dando origem à variância da amostragem ou a taxa de endogamia apropriada às condições em consideração, se eles fossem criados na forma da população idealizada (FALCONER, 1981). Wright (1938) definiu o tamanho efetivo da população como um parâmetro que quantifica a perda de alelos entre gerações. Segundo Valera et al., (1999), o conceito de tamanho efetivo da população é importante para a compreensão dos efeitos da variação no número de machos e de fêmeas e do tamanho da família sobre a deriva genética e sobre a endogamia (Valera et al., 1999).

2.8 Fis, Fst e Fit

Os índices de fixação (Fis, Fst e Fit) foram elaborados por Sewall Green Wright na intenção de descrever as propriedades das populações que são subdivididas. O efeito já conhecido como endogamia é semelhante a subdivisão das populações, pois resulta em excesso de homozigotos naquela população. Sendo necessário medir esse efeito em termos de redução na proporção de genótipos heterozigotos (PINTO, 2010).

Todos os três índices são calculados baseados na heterozigosidade esperada e observada. O coeficiente de endocruzamento (Fis) pode ser definido também como a probabilidade de que dois alelos de um *locus* em um indivíduo endocruzado sejam idênticos por descendência. Fst é definido também como o coeficiente de endogamia da subpopulação em relação à população total da qual ela é parte, sendo uma estatística informativa utilizada para estimar o nível de divergência genética entre subpopulações ou raças, com valores que variam entre 0 e 1 (HARTL; CLARK, 2010). A interpretação dos valores de Fst de Wright deve seguir as seguintes orientações (WRIGHT, 1978): a amplitude de 0 a 0,05 pode ser considerada indicativa de pequena diferenciação genética; a amplitude de 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação genética; a amplitude de 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação genética; valores de Fst acima de 0,25 indicam diferenciação genética muito grande. Fit também é definido como o coeficiente de endogamia que leva em consideração tanto o efeito do acasalamento não aleatório quanto os efeitos da subdivisão da população. É uma medida de heterozigosidade de um indivíduo em relação ao total da população (PINTO, 2010).

2.9 D-Jost e G_{ST}

Populações são frequentemente subdivididas e isoladas umas das outras em algum grau genético. A genética contém duas grandes medidas que quantificam a estrutura

populacional: medidas de fixação como F_{ST} e G_{ST} e medidas de diferenciação alélica, como D de Jost e diferenciação de entropia (JOST *et al.*, 2018).

Por muitos anos, a diferenciação genética foi medida em sua maioria pelo índice de fixação de Wright F_{ST} (WRIGHT, 1951). Nei (1973), dividiu entre heterozigosidade total (H_T) em um componente dentro da subpopulação (H_S), e um componente entre subpopulação (D_{ST}), dada pela fórmula, $H_T = H_S + D_{ST}$.

Jost (2008) para superar as limitações do G_{ST} , propôs uma nova estatística de diferenciação, D , baseada em medir a diversidade genética pelo número efetivo de alelos e particioná-la multiplicativamente em componentes dentro e entre subpopulações. Ele afirmou que G_{ST} não mede diferenciação, enquanto seu D faz e mede diferenciação independentemente da heterozigosidade dos marcadores.

G_{ST} e D -Jost são estatísticas cujos máximos não são restringidos por H_S , podendo variar de 0 a 1. Entretanto, não é possível garantir que eles não sejam restringidos por outros aspectos das frequências alélicas (ALCALA e ROSENBERG, 2018).

D -Jost é uma medida baseada em heterozigosidade que foi introduzida na genética a partir da ecologia para descrever esse aspecto da estrutura populacional. D -Jost considera os alelos pelo quadrado de suas frequências, a mesma ponderação utilizada pela heterozigosidade sob o modelo de ilha finita com alelos infinitos.

A diferenciação alélica entre populações geralmente varia de locus para locus, porque seu valor de equilíbrio depende fortemente da taxa de mutação. D -Jost deve ser estimado a partir dos loci com os quais nos interessamos, ou outros loci que se espera que tenham taxas de mutação semelhantes, e não de marcadores de mutação rápida. No entanto, as medições dele de marcadores de mutação rápida ainda são úteis para classificar pares de populações de acordo com seu grau de diferenciação alélica em todo o genoma (JOST *et al.*, 2018).

2.10 Identificação de linhagens

Mesmo com todo rebanho significativo de equinos no Brasil, existem poucas pesquisas diretamente ligadas ao melhoramento genético e seleção da raça MM. Isso é característica geral dos equinos quando comparados a outras espécies animais, o que pode estar relacionado às particularidades observadas na criação de equinos, como, falta de escrituração zootécnica ou com informações escassas e imprecisas de caracteres reprodutivos, comportamentais e de desempenho nos criatórios; baixa receptividade das associações de criadores ao uso consciente das tecnologias reprodutivas; e a relação

superficial entre órgãos técnicos, criadores e pesquisadores da área (BAENA, 2020; MEIRA, 2010).

Costa *et al.* (2005) realizaram um estudo com o objetivo de identificar formação de linhagens na raça MM. Utilizaram para o cálculo dos coeficientes de parentesco 233.214 animais que apresentavam algum grau de ligação genética com os ancestrais identificados como de maior contribuição genética para a população atual. Os coeficientes de parentesco e de endogamia foram calculados utilizando-se a rotina proposta por Meuwissen e Luo (1992), incluída no programa Pedig® (Boichard, 2002). Esses autores, encontraram a existência de cinco grupos genéticos distintos na população, associados aos descendentes: Herdade Alteza e Seta Caxias, Providência Itu e Tabatinga Predileto, Abaíba Marengo, Tabatinga Cossaco e Angaí Miron, nessa ordem de importância, sendo o principal animal considerado formador da raça a égua Herdade Alteza.

Apesar das descrições históricas da raça Mangalarga Marchador evidenciarem na maioria das vezes somente os garanhões de maior importância na mesma, segundo Casiuch (2016) um exemplo de seleção com base em linhas maternas é a linhagem Herdade, como exemplo da égua Herdade Alteza, também encontrada por Costa *et al.* (2005) como a maior contribuinte para a raça.

Estes autores verificaram que os animais podem ser subdivididos em grupos familiares, mas mesmo diante das diversas linhagens que são citadas na literatura, somente foram encontrados como representantes da raça as linhagens Herdade, Providência, Abaíba, Tabatinga e Angaí. Estudos conduzidos por Santos *et al.* (2019), também buscaram investigar formação de estruturas familiares na raça MM, por meio de genotipagem em SNP, na tentativa de identificar linhagens de acordo com o tipo de andamento dos animais. Mas apesar de encontrarem formação de grupos na população estudada, não verificaram a existência de linhagens ligadas ao tipo de marcha (batida e picada) na raça.

Souza (2021) realizou uma pesquisa para identificar a existência de possíveis linhagens da raça Mangalarga Marchador, levando em consideração a frequência alélica de marcadores microssatélites, porém também não obteve separação de linhagens na raça Mangalarga Marchador.

Marchiori *et al.* (2019) buscaram aplicar as metodologias de linkage disequilibrium (LD) e análise de componentes principais para separar geneticamente as linhagens de corrida e de trabalho da raça Quarto de Milha. Estes autores encontraram diferenças genéticas entre as linhagens de trabalho e de corrida de cavalos da raça Quarto de Milha,

pois subestruturas da formação de famílias que descendem de diferentes reprodutores foram encontradas, demonstrando que estas análises de LD juntamente com os dados de pedigree podem levar a determinação das linhagens.

2.11 Características morfológicas avaliadas na raça Mangalarga Marchador

A avaliação morfológica tem grande relevância para escolha de animais, visto que há relação da morfologia com a locomoção dos animais (CABRAL *et al.*, 2004; SANTIAGO *et al.*, 2016, ZAMBORLINI *et al.*, 1996).

Ao longo do tempo, os equinos têm sido utilizados para diversas atividades, que exigem principalmente força, velocidade e resistência, o que levou à evolução de diferentes biótipos de animais. As medidas morfológicas geralmente são tomadas diretamente no corpo por pontos anatômicos e mensuração por meio de equipamentos como hipômetro, artrogoniômetro e fita métricas (BACK, 1992; FONSECA, 2018).

O corpo dos equinos é dividido em cabeça, pescoço, tronco e membros. Para que se possam selecionar animais para participação em esportes equestres e também para escolha de matrizes e garanhões na reprodução deve-se avaliar separadamente cada uma destas regiões, a fim de identificar características de sua conformação que possuem relação e influenciem a locomoção dos animais (CABRAL *et al.*, 2004; SANTIAGO *et al.*, 2016, ZAMBORLINI *et al.*, 1996).

As características mencionadas abaixo são avaliadas pelos técnicos das associações no momento do registro definitivo e são elas que serão utilizadas no presente projeto.

Comprimento e largura da cabeça e comprimento do pescoço

O comprimento da cabeça é medido através da distância entre a extremidade proximal da cabeça, que coincide com a crista nugal, e a porção medial ou central da arcada incisiva inferior; a largura de cabeça é distância entre a porção livre da borda supra-orbital direita e a borda esquerda. O comprimento do pescoço é a distância entre a porção cranial do arco dorsal do atlas e o terço médio da borda cranial da escápula (SOUSA *et al.*, 2018 e OOM & FERREIRA, 1987). A cabeça e o pescoço proporcionais são essenciais para o equilíbrio do animal, pois são eles que controlam a oscilação do centro de gravidade do tronco, sendo importante para impulsão do animal durante a locomoção (NASCIMENTO, 1999).

Perímetro torácico e altura da cernelha

A altura na cernelha é obtida da medida ponto mais alto da região interescapular, localizado

no espaço definido pelo processo espinhoso de T5 e T6, até o solo; o perímetro torácico é a medida de circunferência posicionada logo após o final da cernelha, entre os processos espinhosos T8 e T9, passando pelo espaço intercostal da 8ª e 9ª costelas, até a articulação da última costela com o processo xifóide (SOUSA *et al.*, 2018 e OOM & FERREIRA, 1987). Características do tronco também podem influenciar capacidade respiratória dos equinos, onde segundo Fontes (1954) e Thomas (2005) quanto maior o perímetro torácico melhor será a capacidade cardiorrespiratória. Para Camargo e Chieffi (1971) a cernelha bem definida, alta, comprida, bem musculada e larga na base conferem encaixe ergométrico à sela, favorecem as ações biomecânicas dos músculos extensores, flexores do tronco e pescoço, alivia os membros torácicos e favorece o deslocamento do animal, principalmente em animais de sela.

Comprimento de dorso-lombo

É medido entre a distância das extremidades dos processos espinhosos de T8 e T9 e a porção cranial da tuberosidade sacral (OOM & FERREIRA, 1987). A conformação do dorso também se diferencia nos biótipos funcionais dos equinos. Em animais de sela o dorso deve ser de comprimento médio, reto e musculado garantindo espaço para encaixe da sela e pleno funcionamento da biomecânica da coluna vertebral (NASCIMENTO, 1999).

Altura, comprimento e largura da garupa

A altura da garupa é obtida do ponto mais alto da garupa, especificamente sobre a tuberosidade sacral, até o solo; já o comprimento da garupa é distância entre as porções cranial da tuberosidade ilíaca e caudal da tuberosidade isquiática; e a largura da garupa é distância entre as porções laterais das tuberosidades ilíacas (SOUSA *et al.*, 2018). A garupa também atua nas diferentes fases da locomoção dos animais, onde quando compridas estão associadas a músculos longos, capazes de amplas contrações, facilitando a propulsão dos membros posteriores, sendo assim desejável em equinos de corrida, salto, adestramento e marcha (SANTIAGO, 2013).

Comprimento de espádua

Para o comprimento de espádua é medido pela distância entre a borda dorsal da cartilagem da escápula e o ângulo distal da escápula ou porção central da articulação escápulo-umeral (SOUSA *et al.*, 2018). Para Jones (1987), às espáduas têm influência durante as fases apoio e elevação na locomoção, pois se relaciona com as regiões

zootécnicas da cernelha, pescoço, tórax e dorso. As espáduas têm como função transformar em velocidade a força propulsora transmitida pelos membros pélvicos (NASCIMENTO, 1999). Assim para Camargo e Chieffi (1971) a inclinação da espádua e seu tamanho determinam a amplitude do movimento, o comprimento da passada e conseqüentemente a melhor absorção do impacto gerado pelo contato do casco com o solo, resultando em maior amortecimento e suavidade durante a locomoção.

Comprimento do corpo

É medido pela distância entre as porções craniais do tubérculo maior do úmero e caudal da tuberosidade isquiática (SOUSA *et al.*, 2018). Santiago *et al.* (2013) constataram que tanto a relação entre os comprimentos do corpo e da cabeça, quanto a proporção entre o comprimento do corpo e a altura na cernelha, foram muito próximas tanto em machos campeões da raça quanto os demais machos registrados na ABCCMM.

Perímetro de canela

É medido pela circunferência na região mediana da canela de um dos membros anteriores, formada pelos ossos metacárpicos II, III e IV (OOM & FERREIRA, 1987). O perímetro da canela está relacionado com a qualidade óssea do esqueleto e com a funcionalidade da região anatômica, determinando, juntamente com o perímetro torácico, a capacidade de carga do animal (Berbari Neto, 2005).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCALA, Nicolas; ROSENBERG, Noah. **Urn:x-wiley:09621083:media:mec15000:mec15000-math-0002, Jost's D, and FST are similarly constrained by allele frequencies: A mathematical, simulation, and empirical study.** *Molecular ecology*, [s. l.], v. 28, p. 1624-1636, 27 dez. 2018. DOI 10.1111/mec.15000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6821915/>. Acesso em: 14 out. 2022
- ANUNCIÇÃO, CARLOS EDUARDO; ASTOLFI-FILHO, SPARTACO. Paternity test in “mangalarga-marchador” equines by dna-fingerprinting. **Paternity test in “mangalarga- marchador”**, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, ano 2000, v. 35, n. 10, p. 2007-2015, outubro 2000. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pab/a/GcC3zVP37qh4twJptRpWYxP/?lang=en&format=pdf>. Acesso em: 25 fev. 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE CAVALO DA RAÇA MANGALARGA. **O Cavallo Mangalarga**, ABCCRM, 2020. Disponível em: <https://www.cavalomangalarga.com.br/historia>>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO MANGALARGA MARCHADOR. **A raça mangalarga marchador.** Disponível em: <http://www.abccmm.org.br/principal.aspx>>. Acesso em: 20 de fev. de 2022.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DO CAVALO MANGALARGA MARCHADOR. **Regulamento do serviço de registro geneológico do cavalo Mangalarga Marchador.** Disponível em: <http://leia.abccmm.org.br/portal/regulamentos/regulamentosrg.pdf>. Acesso em: 28 de fev. de 2022
- BAENA, M.M., DIAZ, SILVINA, MOURA, R.S., MEIRELLES, S.L.C., 2020. **Genetic characterization 288 of Mangalarga Marchador breed horses based on microsatellite molecular markers.** 289 *Journal of Equine Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103231>
- BECK, S.L., 1992. **Mangalarga Marchador: Caracterização, história e seleção.** Primeira ed, 292 Brasília.
- BECK, Sérgio Lima. **Mangalarga Marchador:caracterização, história e seleção -** Brasília: Edição dos autores, 1992.
- BERBARI NETO, F. Análise das medidas lineares e avaliação de índices morfométricos em garanhões da raça Campolina. 2005. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- BORTONI, Rosalbo. **O Mangalarga Marchador e os outros cavalos de sela no Brasil.** Uberaba: Grupo Rotal Ltda, 1991.
- CABRAL, G. C. *et al.* **Avaliação Morfométrica de equinos da raça Mangalarga Marchador: Medidas Lineares.** *Revista Brasileira de Zootecnia*. Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1790-1797, 2004. <http://www.scielo.br/pdf/rbz/v33n4/22095.pdf>.
- CAMARGO, Manoel Xavier de; CHIEFFI, Armando. **Ezoognózia.** São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1971.
- CASIUCH, R. L. **As costelas do abismo: Os mais influentes garanhões do século XX na raça. 2016**
- COSTA, M. D. *et al.* **Estudo da subdivisão genética da raça Mangalarga Marchador.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 57, n. 2, p.

- 272-280, 2005b.
- FALEIRO, F. G.; FERNANDES, F. D.; KARIA, C. T.; BELLON, G.; RAMOS, A. K. B.; MARTHA, J.G. B.; ANDRADE, R. P.; JANK, L. **Diversidade genética de uma coleção de trabalho de *Panicum Maximum* com base em marcadores moleculares**. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004. Campo Grande. **Anais eletrônicos...** Campo Grande: SBZ, 2004.
- FALCONER, D.S. **Introduction to Quantitative Genetics**. Longman, London. 1981.
- FONSECA, Mayara Gonçalves. **Mangalarga Marchador: estudo morfométrico, cinemático e genético da marcha batida e da marcha picada**. 2018. Tese (Doutorado em medicina veterinária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/154263>.
- FONTES, L.R. **Exterior, raças e julgamento dos animais domésticos**. Belo Horizonte: Universidade Rural do Estado de Minas Gerais, 1954.
- garanhões da raça Campolina. 2005. **Dissertação (Mestrado em Produção Animal) -**
- GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. J.; SCLIUSTER, I. **Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético**. Belo Horizonte. 2009. p. 4 - 6. (Infome agropecuário, 30).
- HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Pesquisa Pecuária Municipal- **População equina do Brasil**. Disponível em: <https://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?vcodigo=PPM01>.
- JOMBART, T., 2008. **Adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers**. *Bioinformatics* 24, 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>.
- JOMBART, T., DEVILLARD, S., BALLOUX, F., 2010. **Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations**. *BMC Genet.* 11, 94–109. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>.
- JONES, W.E. **Genética e Criação de Cavalos**. São Paulo: Roca, 1987.
- JOST, L. (2008). **GST and its relatives do not measure differentiation**. *Molecular Ecology* 17, 4015–4026.
- JOST, Lou *et al.* **Differentiation measures for conservation genetics**. *Evolutionary Applications*, [S. l.], v. 11, p. 1139-1148, 2 jan. 2018. DOI <https://doi.org/10.1111/eva.12590>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/eva.12590>. Acesso em: 12 out. 2022.
- LEMOS, A. M. **A utilização dos polimorfismos bioquímicos e sistemas de grupos sanguíneos no melhoramento de bovinos**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1995. 47p. (Documentos, 56). **Mangalarga Marchador**. ESSENTIAL IDEA, São Paulo, 304 p., 2016.
- MARCHIORI, C. M. *et al.* **Linkage disequilibrium and population structure characterization in the cutting and racing lines of Quarter Horses bred in Brazil**. *Livestock Science*, v. 219, p. 45-51, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.11.013>
- MEDEIROS, B. R. *et al.* **Brazilian Sport Horse:pedigree analysis of the Brasileiro de Hipismo breed**. *Italian Journal of Animal Science*, v. 13, n. 3146, p. 657-664 2014. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4081/ijas.2014.3146>.
- MISERANI, M. G. *et al.* **Heritability estimates for biometric measures of the**

- Pantaneiro horse.** Archivos de Zootecnia, v. 51, n. 194, p. 107-112, 2002. <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/174388/heritability-estimatesfor-biometric-measures-of-the-pantaneiro-horse>.
- NASCIMENTO, Jair Ferreira do. **Mangalarga Marchador: Tratado Morfofuncional.** Belo Horizonte: ABCCMM, 1999
- NEI M. (1973). **Análise da diversidade genética em populações subdivididas**. *Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América*, 70, 3321-3323. 10.1073/pnas.70.12.3321 [PMC free article] [PubMed].
- OOM, M.M.; FERREIRA, J.C. **Estudo biométrico do cavalo Alter.** *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v.83, n.1, p.101-148, 1987.
- PINTO, C. A. B. **Genética de populações.** Lavras: UFLA, 2010. 1-67 p. (Texto acadêmico).
- PROCÓPIO, A. M., **Biomecânica da locomoção dos eqüinos.** Amazonpec encontro internacional da pecuária da amazônia, 2008, Belém - PA. Belém - PA: [s. n.], 2008. Disponível em: <http://www.campolina.org.br/pdfs/enacam/amazonpec-biomecnica.pdf>.
- PROCÓPIO, A.M. BERGMANN, J.A.G.; COSTA, M.D. **Formação e demografia da raça Campolina.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.vol.55 no.3 Belo Horizonte June 2003.
- PURCELL, S. *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. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1950838/>
- SANTIAGO, J. M. *et al.* **Evolution of morphometric measures in the Mangalarga Marchador breed.** *Revista Caatinga, Mossoró*, v. 29, n. 1, p. 191-199, 2016. <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n122rc>.
- SANTIAGO, Juliano Martins. **Caracterização morfométrica da raça Mangalarga Marchador.** 2013. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.
- SOUSA, A.S.; CARVALHO, I.J.; OLIVEIRA, C.A.A.; COSTA, R.B.; GODOI, F.N. 2018. **How is the morphometry of stallions and mares show winning and non-winning Campolina Brazilian breed with batida and picada gaits?** *Journal of Equine Veterinary Science*. 64. 10.1016/j.jevs.2018.02.012.
- SOUZA, F. A. C. **Parâmetros genéticos de características morfofuncionais e identificação de linhagens na raça Mangalarga Marchador** / Felipe Amorim Caetano de Souza. - Tese (doutorado)- Universidade Federal de Lavras, 2021. 94 p.
- SOUZA, F.A.C., FERNANDES, T. J. , MOURA, R.S., MEIRELLES, S.L C., RIBEIRO, A.R, CUNHA, F.O., 1216 Augusto, M.J., 2017. **Nonlinear modeling growth body weight of Mangalarga Marchador** 1217 horses. *Ciência Rural, Santa Maria*. 47, 2-6. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1218-8478cr20160>.
- THOMAS, Heather Smith. **The Horse Conformation.** New York: Storey Publishing, 2005 Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.
- VALERA, M.; MOLINA, A.; PIRES, L. *et al.* **A Importância do livro de genealógico na conservação de linhas, estirpes e raças eqüinas.** *Rev. Port. Ciên. Vet.*, Abril/Junho,1999.
- WRIGHT, S. **Size of population and breeding structure in relation to evolution.** *Science*, v. 87, n. 2263, p. 430-2264, 1938.

- WRIGHT S. (1951). **A estrutura genética das populações** . *Annals of Eugenics* , 15 , 323-354. [PubMed].
- WRIGHT S. **Evolution and the genetics of populations: Variability within and among natural populations**. University of Chicago Press: Chicago. USA, v. 4. 1978.
- ZAMBORLINI, L. C. *et al.* **Estudo genético-quantitativo de medidas lineares de equinos da raça Mangalarga Marchador – I. Estimativas dos fatores de ambiente e parâmetros genéticos**. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 3, n. 2, p. 33-37, 1996. <https://periodicos.uff.br/rbcv/article/view/7365>.

SECOND PART – ARTICLE/PAPER**Genetic divergence and phenotypic characterization in the Mangalarga
Marchador breed**

Formatted according to the Livestock Science Journal

B. P. G. Araujo^a; C. A. Perazza^b; R. S. Moura^a; S. L. C. Meirelles^{a*}

^aFederal University of Lavras, Department Animal Science, University Campus, postal code 3037, Downtown, CEP 37200000, Lavras/MG, Brazil.

^bIntegrated Center of Biotechnology, University of Mogi das Cruzes, SP, Brazil.

*Corresponding author: Federal University of Lavras, Department Animal Science, University Campus, postal code 3037, Downtown, CEP 37203-202, Lavras/MG, Brazil; E-mail: sarah@ufla.br

ABSTRACT

The Mangalarga Marchador (MM) breed is characterized by its elegant size, docile temperament and for being suitable for riding. Over the years, families in southern Minas Gerais began to select animals according to their own interests and personal preferences, thus forming lineages within the breed with individual traits. Scientific research on lineages in the MM breed is scarce compared to other breeds, so there are many questions about historical claims made about them. According to the book “*Costelas do Abismo*” by Ricardo Casiuch, based on historical information, the existence of lineages in the breed is present. The objectives of this work were to identify if there are lineages in the MM breed using microsatellite markers and to describe the phenotypic characterization of these lineages, so it can be used as a tool when selecting individuals according to the selection objective of each breeder. The databases used came from the Brazilian Association of Mangalarga Marchador Horse Breeders. The genotyping database contained 255,257 MM horses, born between 2005 and 2021. In addition, a database with pedigree information of 622,299 animals born from 1952 to 2020 and a phenotypes database evaluated at the time of definitive registration were used, containing 303,248 animals born from 1950 to 2018. To verify the existence of genetic differences according to lineage in the breed, a discriminant analysis of principal components (DAPC) implemented by the adegenet 2.0.0 package (Jombart, 2008) of the R software was performed and to carry out the phenotypic characterization, the Kruskal Wallis test in the R software was used to compare the means of morphometric measurements. The DAPC analysis demonstrated genetic differentiation of the lineages Angai and Herdade in relation to the others. The lineage Herdade showed greater differentiation in relation to the 3 comparison groups, demonstrating that the animals of this lineage are smaller and more closely grouped, in addition to presenting higher scores for gait and morphology. Thus, this study concludes that, when compared to the historically described MM lineages, the breed does not present as many distinct genetic groups, separating it into only 3 groups (Angai, Herdade and General), and when compared to the phenotypic characteristics, only the lineage Herdade stood out.

Keywords: principal components, equine, lines, genetic improvement, microsatellites

1. INTRODUCTION

The Mangalarga Marchador (MM) breed is characterized by its elegant size, docile temperament and for being suitable for riding (CASIUCH, 2016) and was considered a national heritage by the law nº 12.975/2014, so that it could guarantee its preservation and genetic diversity (ABCCMM, 2020).

The Brazilian Association of Mangalarga Marchador Horse Breeders (ABCCMM) and also the breeders mainly value animals with traits for work on rural properties, horseback riding, hunting and sports competitions, in addition to comfort, rusticity, docility and adequate gait (BECK, 1992).

In search of a greater standardization and with an interest in fixing, mainly the traits of gait, the families of the south of Minas Gerais began to select the animals according to their own interests and personal preferences, forming “lineages” in the breed with individual traits, using matings, most of the time endogamous (Costa *et al.* 2005a).

Casiuch (1997 and 2016) and Bortoni (1991), historically affirm the existence of lineages in the MM breed, but few studies have verified the existence of lineages using information from molecular markers. Thus, there are many questions about these historical claims.

Costa *et al.* (2005b) and Santos *et al.* (2019) carried out studies to identify lineages in the breed, but none of them sought genetic differentiation using microsatellite markers type (SSR). However, Souza (2021), even using information from molecular markers, did not observe a separation of the population into different lineages.

The hypothesis of this study is that there are genetically different lineages in the Mangalarga Marchador breed and these have phenotypic differences in terms of morphology.

As we can see, there are few studies within the MM breed with the aim of identifying lineages and consequently knowing the genetic variability of the breed. Thus, the objectives of this research were to genetically identify possible lineages in the MM breed using SSR and describe the phenotypic characterization of these lineages, so that it can be used as a tool when selecting individuals according to the selection objective of each breeder.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Database

The databases used in the research were provided by the Brazilian Association of Mangalarga Marchador Horse Breeders (ABCCMM). The microsatellite genotyping bank contained 255,257 horses born between 2005 and 2021. In addition to this, a database with pedigree information of 622,299 animals born from 1952 to 2020 and a bank of phenotypes evaluated at the time of definitive registration containing information from 303,248 animals born from 1950 to 2018 were also used. The animals came from different properties throughout Brazil.

We used genotyping data from 11 highly polymorphic microsatellite loci standardized by the International Society of Animal Genetics (ISAG), namely AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4 and VHL20. These SSR used are distributed in 11 different chromosomes of the equine genome (24, 8, 15, 2, 3, 10, 9, 4, 1, 9 and 30, respectively).

2.2 Animal selection criteria

Sampling was performed from the genotyping and pedigree databases. The search for animals belonging to each lineage, according to Casiuch (2016), was carried out by searching in the pedigree database if each animal presented DNA parentage verification

and if their paternal and maternal parents and/or grandparents also belonged to the same lineage, that is, if they had the same prefix or suffix, so that in this way the animals remained closed in the lineages until the second and/or third generation, increasing the reliability of the data studied.

In addition, animals that were closed in maternal or paternal parents and/or grandparents of this lineage, but that did not have the name of the same lineage in their suffix/prefix were also considered from the same lineage.

2.3 Statistical analysis

Genetic differentiation between lineages

First, the database was previously separated into groups according to the lineages described by Ricardo Casiuch (2016).

To verify the existence of lineages of genetically similar animals in the MM breed from the SSR data, the discriminant analysis with principal components (DAPC) was performed by the adegenet 2.0.0 package (Jombart, 2008) of the R software.

To choose the ideal number of principal components (PC) to be used in the analysis, the α -score was calculated using the adegenet package (Jombart, 2008) of the R software, where the method uses interpolation to reduce the intensive use of processing, reducing the number of estimated α -scores in the chosen PC range.

To determine whether there is genetic differentiation between the lineages, standardized F (Fis) and D-Jost statistics were used, using the diveRsity package in the R software. The effective population size was determined using NeEstimator.

2.4 Phenotypic characterization

The phenotypic characterization of each lineage was carried out using the morphometric measurements evaluated at the time of definitive registration, which are:

height at withers, height at croup, head length, neck length, back-loin length, croup length, shoulder length, body length, head width, croup width, thoracic perimeter and shin perimeter, in addition to scoring measures such as gait and morphology.

Descriptive analyzes were performed for each trait, by lineage, using the SAS (2010) program and the Kruskal Wallis test at 5% probability to compare means, using the R software.

3. RESULTS

Data from 1,357 Mangalarga Marchador horses were used, divided into 11 lineages previously described by Ricardo Casiuch (2016). Lineages that had less than 10 animals were discarded from the analyzes (Table 1).

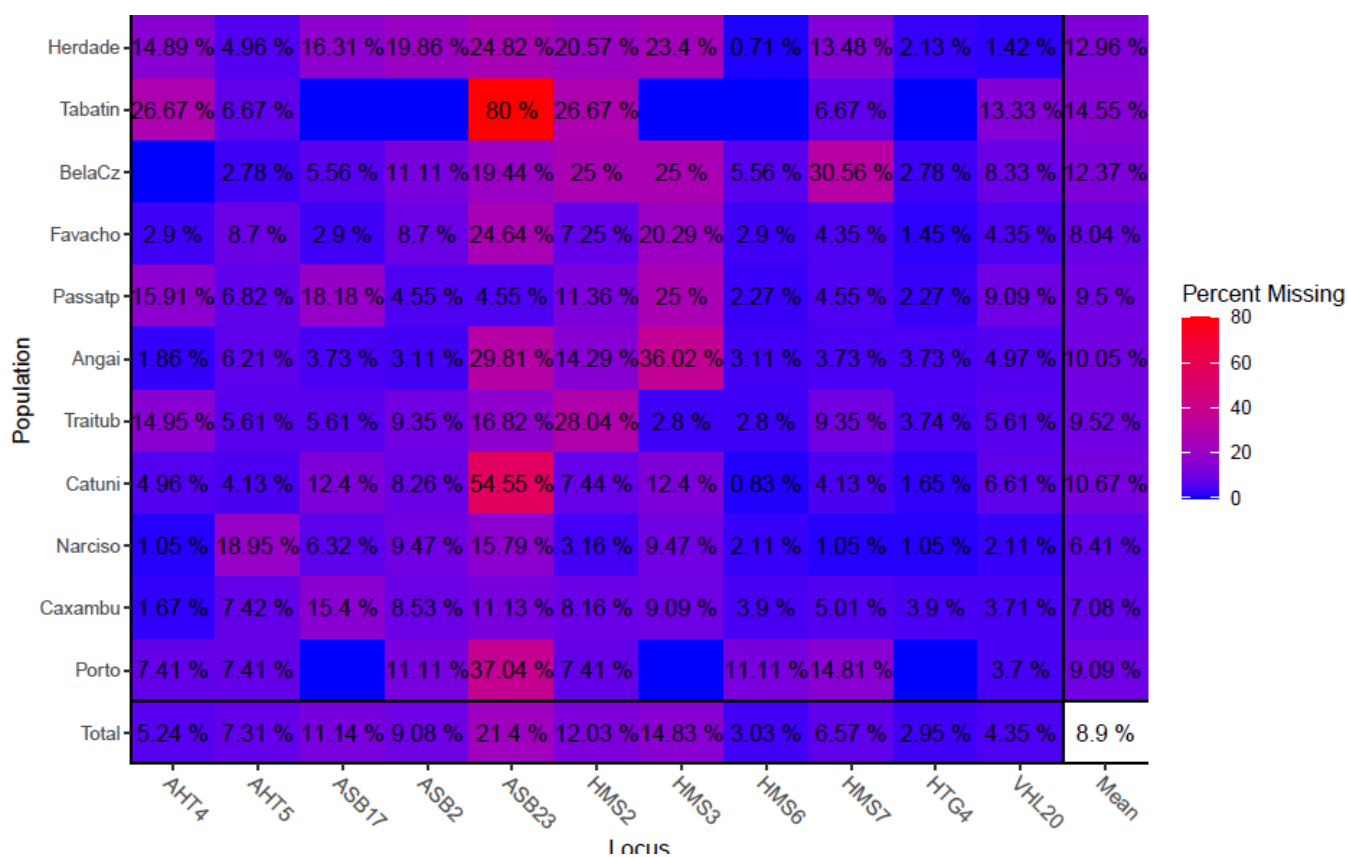
Table 1. Number of animals per lineage and total number of evaluated horses of the Mangalarga Marchador breed.

Lineages	N
Angaí	161
Bela cruz	36
Catuni	121
Caxambu	540
Favacho	69
Herdade	141
Narciso	95
Passa tempo	44
Porto	28
Tabatinga	15
Traituba	107
Total	1357

N: number of animals

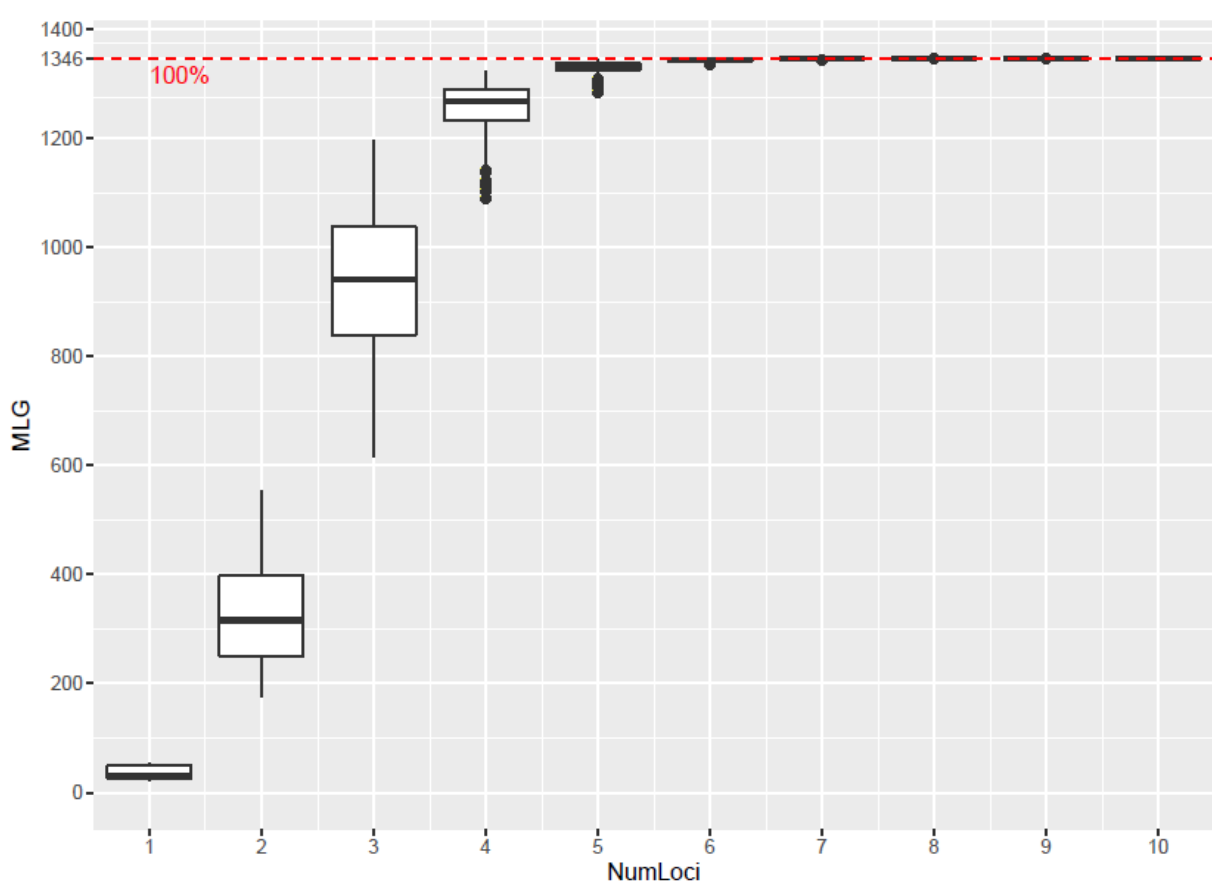
The mean total percentage of missing data according to genotyping in the 11 loci was 8.9% in the studied animals. The locus ASB23 presented 80% of missing in the lineage Tabatinga, which is considered a high number, however, it was not necessary to remove it from the analysis since the total percentage of missing data of this locus was 21.4%, considering all the lineages (Figure 1).

Figure 1. Percentage of missing data in each lineage according to each studied locus and total mean percentage.



According to figure 2, it can be observed that the confidence level to determine whether there is differentiation between the lineages reaches 100% considering at least 6 loci. Thus, as 11 loci were used during the research, the reliability of the study is considered high.

Figure 2. Reliability level in relation to the number of loci studied in the Mangalarga Marchador breed.



The results of the inbreeding coefficient (F_{is}) found in each lineage considering the loci studied obtained a mean of 4.30% in the Herdade lineage, 6.30% in Tabatinga, 7.2% in Bela Cruz, 1.30% in Favacho, 5.4% in Passatempo, 4.80% in Angai, 6.30% in Traituba, 1.40% in Catuni, 7.70 in Narciso, 2.00% in Caxambu and 1.70% in Porto (Table 2).

We observed that the lineages Favacho and Porto were the only ones that presented more than half of the loci with excess homozygosity, which demonstrates a higher percentage of inbreeding, with a minimum of (-0,056 ou 5,6%) and (-0,027 ou 2,7%) and a maximum of (0,031 ou 3,1%) and (0,150 ou 15%), respectively (Table 2).

Table 2. Fis values for each locus in relation to each lineage studied in the Mangalarga Marchador breed.

Lineage	AHT4	AHT5	ASB17	ASB2	ASB23	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	VHL20	Overall
Angai	-0.016	-0.082	-0.047	0.009	-0.070	-0.084	-0.096	-0.026	-0.043	-0.081	-0.022	-0.048
Bela Cruz	-0.104	-0.016	-0.026	-0.200	-0.076	-0.011	-0.033	0.000	-0.088	-0.097	-0.088	-0.072
Catuni	0.060	0.016	-0.034	0.086	0.059	-0.030	-0.086	-0.086	-0.065	-0.086	-0.029	-0.014
Caxambu	-0.045	-0.049	0.012	0.039	-0.027	-0.042	-0.074	0.017	-0.049	0.006	-0.006	-0.020
Favacho	0.031	0.014	0.016	0.038	0.004	-0.103	-0.107	0.023	0.015	-0.032	-0.056	-0.013
Herdade	-0.076	0.009	-0.095	-0.086	0.024	-0.007	0.008	-0.019	-0.107	-0.032	-0.069	-0.043
Narciso	-0.135	-0.219	-0.060	0.049	0.234	-0.089	-0.107	-0.312	-0.123	0.063	-0.169	-0.077
Passatemp	-0.038	-0.094	-0.011	-0.022	-0.112	-0.147	0.001	-0.017	-0.093	0.003	-0.056	-0.054
Porto	0.011	-0.027	0.150	0.088	0.031	0.025	-0.081	0.072	-0.197	-0.205	-0.033	-0.017
Tabatinga	-0.230	-0.098	-0.126	0.029	0.333	-0.132	0.247	-0.089	-0.107	-0.031	-0.331	-0.063
Traituba	0.031	-0.038	-0.099	-0.025	-0.029	-0.134	-0.134	0.000	-0.108	-0.067	-0.112	-0.063

In addition to Fis, the analysis of the inbreeding coefficient and kinship was performed by the TrioML method in the coancestry program. Coefficients are given comparatively across study populations. In Table 3, we observe that the Porto lineage is the most inbred of the populations studied (0.15), while the Caxambu lineage is the one with the lowest inbreeding rate (0.07).

Regarding the kinship coefficient, we observed that the Tabatinga lineage presents higher values more frequently when compared to the other lineages. The Herdade lineage, on the other hand, presents lower values more frequently (Table 4).

Table 3. Coefficient of inbreeding by the TrioML coancestry method for each strain of the Mangalarga Marchador breed.

Lineages	Means TrioML
Herdade	0.13
Tabatinga	0.14
Bela Cruz	0.10
Favacho	0.13
PassaTempo	0.08
Angai	0.11
Traituba	0.08
Catuni	0.08
Narciso	0.10
Caxambu	0.07
Porto	0.15

Table 4. Coefficient of kinship by the TrioML coancestry method among the Mangalarga Marchador breed lines.

Linhagens	Herdade	Tabatin	BelaCz	Favacho	Passatp	Angai	Traitub	Catuni	Narciso	Caxambu
Herdade										
Tabatinga	0.13									
BelaCz	0.13	0.14								
Favacho	0.06	0.15	0.13							
Passatp	0.08	0.17	0.12	0.12						
Angai	0.10	0.12	0.11	0.09	0.10					
Traituba	0.07	0.09	0.09	0.12	0.08	0.08				
Catuni	0.08	0.09	0.09	0.11	0.09	0.07	0.10			
Narciso	0.08	0.17	0.08	0.10	0.14	0.12	0.08	0.07		
Caxambu	0.09	0.07	0.09	0.09	0.08	0.07	0.09	0.10	0.09	
Porto	0.14	0.13	0.10	0.09	0.09	0.12	0.07	0.09	0.14	0.11

It was observed that the lineages Bela Cruz, Catuni, Favacho, Herdade and Caxambu have private alleles in their loci, the latter being the lineage that has the most private alleles (36) within the studied population (Table 5).

Table 5. Private alleles of the lineages Bela Cruz, Catuni, Caxambu, Favacho e Herdade.

Private alleles	Bela Cruz	Catuni	Caxambu	Favacho	Herdade
AHT4.38	0	0	1	0	0
AHT4.33	0	0	3	0	0
ASB17.15	0	0	16	0	0
ASB17.26	0	0	1	0	0
ASB17.27	0	0	3	0	0
ASB17.00	0	0	1	0	0
ASB23.23	0	0	1	0	0
HMS2.21	0	0	0	0	1
HMS2.23	4	0	0	0	0
HMS2.00	0	0	2	0	0
HMS3.24	0	0	3	0	0
HMS6.16	0	2	0	0	0
HMS7.15	0	0	0	1	0
HTG4.00	0	0	4	0	0
VHL20.15	0	0	1	0	0

Considering the mean of all loci and p-value of 0.05, it is demonstrated that the lineages Herdade, Angai, Traituba, Catuni, Narciso and Caxambu are not in Hardy-Weinberg equilibrium. On the other hand, the lineages Tabatinga, Bela Cruz, Favacho, Passatempo and Porto showed values for the HWE that demonstrate that they are in balance (Table 6).

Table 6. Probability values obtained for the exact test of Hardy-Weinberg equilibrium verified in the lineages of the Mangalarga Marchador breed lineages.

Lineages	AHT4	AHT5	ASB17	ASB2	ASB23	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	VHL20	Overall
Angai	0.587	0.263	0.934	0.000	0.012	0.973	0.141	0.658	0.728	0.556	0.987	0.000
BelaCruz	0.985	0.402	0.484	0.275	0.352	0.588	0.951	0.141	0.429	0.818	0.900	0.943
Catuni	0.254	0.352	0.320	0.015	0.176	0.654	0.106	0.457	0.758	0.895	0.001	0.008
Caxambu	0.454	0.073	0.997	0.000	0.000	0.850	0.000	0.853	0.596	0.686	0.509	0.000
Favacho	0.359	0.038	0.268	0.478	0.556	0.568	0.562	0.532	0.442	0.948	0.877	0.604
Herdade	0.337	0.881	0.532	0.000	0.223	0.999	0.867	0.675	7e-04	0.827	0.326	0.000
Narciso	0.827	0.027	0.910	0.575	0.044	0.000	0.155	0.006	0.364	0.000	0.289	0.000
Passatp	0.756	0.005	0.533	0.745	0.421	0.906	0.732	0.786	0.172	0.959	0.133	0.382
Porto	0.276	0.521	0.586	0.021	0.362	0.949	0.622	0.030	0.899	0.878	0.218	0.184
Tabatinga	0.705	0.522	0.494	0.292	0.111	0.927	0.516	0.391	0.062	0.506	0.282	0.269
Traituba	0.016	0.976	0.916	0.261	0.863	0.826	0.041	0.000	0.257	0.351	0.748	0.000

The effective population size (N_e) was analyzed, in each lineage studied, this analysis takes into account the number of males and females that are effectively reproducing in the herd (Table 7).

Table 7. Effective population size (N_e) in each lineage of the Mangalarga Marchador breed at 0.05.

Lineages	N_e
Herdade	23.3
Tabatinga	124.5
Bela Cruz	23.6
Favacho	23.2
Passatempo	29.1
Angai	41.1
Traituba	24.3
Catuni	41.8
Narciso	49.1
Caxambu	63.9
Porto	22.7

The means found for D-Jost in each locus, whose function is to separate the populations according to the alleles, are presented in Table 8. Values greater than 0.15 have a good structure of that locus in relation to the studied population, and it is what we observed in all 11 loci analyzed in this study, that is, all loci are well structured (characterized) when compared to each other.

Table 8. Mean values of D-Jost analysis for each locus studied in the Mangalarga Marchador breed.

D-Jost	Mean
AHT4	0.2414
AHT5	0.3000
ASB17	0.2693
ASB2	0.2512
ASB23	0.3421
HMS2	0.2215
HMS3	0.2761
HMS6	0.1634
HMS7	0.2498
HTG4	0.1596
VHL20	0.3008
Global	0.2469

In Table 9, the lineages that presented the highest frequency of D-Jost values above 0.15 were Herdade, Tabatinga and Angai. These results demonstrate that the differentiation between these 3 lineages is much more defined when compared to the others in this study.

Table 9. D-Jost values of the relationships between lineages in the Mangalarga Marchador breed.

	Herdade	Tabatin	BelaCz	Favacho	Passatp	Angai	Traitub	Catuni	Narciso	Caxambu
Herdade										
Tabatin	0.1829									
BelaCz	0.1255	0.1705								
Favacho	0.2517	0.1300	0.1028							
Passatp	0.1877	0.0943	0.1314	0.0937						
Angai	0.1880	0.1776	0.1443	0.1820	0.1683					
Traitub	0.2272	0.1972	0.1442	0.0788	0.1193	0.1905				
Catuni	0.1607	0.1735	0.1130	0.0688	0.0998	0.1710	0.1130			
Narciso	0.1764	0.0913	0.1718	0.1011	0.0839	0.1240	0.1939	0.1346		
Caxambu	0.1144	0.2150	0.1292	0.1032	0.0898	0.1652	0.1061	0.0608	0.1164	
Porto	0.0726	0.1594	0.1449	0.1736	0.1038	0.0951	0.1731	0.1009	0.0901	0.0754

Table 10 shows the 95% confidence interval for the D-Jost values compared to the strains presented in this study.

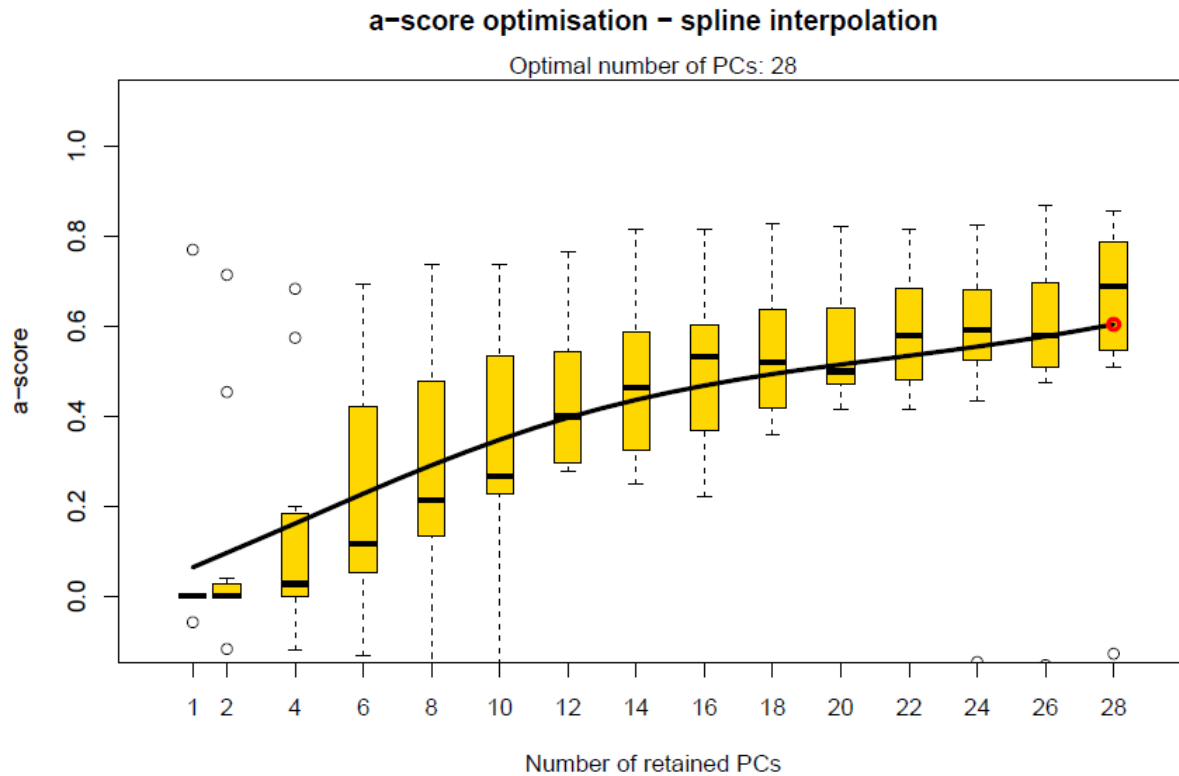
Table 10. Confidence interval of D-Jost values at 95% among the Mangalarga Marchador breed lines.

DjostEst comparison		BC Lower 95%CI
Herdade	vs. Tabatinga	0.1505
Herdade	vs. BelaCruz	0.0851
Herdade	vs. Favacho	0.2213
Herdade	vs. Passatempo	0.1666
Herdade	vs. Angai	0.1655
Herdade	vs. Traituba	0.2056
Herdade	vs. Catuni	0.1594
Herdade	vs. Narciso	0.1529
Herdade	vs. Caxambu	0.1026
Herdade	vs. Porto	0.0549
Tabatinga	vs. BelaCruz	0.0989
Tabatinga	vs. Favacho	0.0729
Tabatinga	vs. Passatempo	0.0395
Tabatinga	vs. Angai	0.1388
Tabatinga	vs. Traituba	0.1365
Tabatinga	vs. Catuni	0.1857
Tabatinga	vs. Narciso	0.0279
Tabatinga	vs. Caxambu	0.1567
Tabatinga	vs. Porto	0.1052
BelaCruz	vs. Favacho	0.0419
BelaCruz	vs. Passatempo	0.0940
BelaCruz	vs. Angai	0.1211
BelaCruz	vs. Traituba	0.1115
BelaCruz	vs. Catuni	0.0829
BelaCruz	vs. Narciso	0.1337
BelaCruz	vs. Caxambu	0.0938
BelaCruz	vs. Porto	0.1064
Favacho	vs. Passatempo	0.0602
Favacho	vs. Angai	0.1527
Favacho	vs. Traituba	0.0393
Favacho	vs. Catuni	0.0422
Favacho	vs. Narciso	0.0944
Favacho	vs. Caxambu	0.0818
Favacho	vs. Porto	0.1449
Passatempo	vs. Angai	0.1254
Passatempo	vs. Traituba	0.1269

Passatempo	vs.	Catuni	0.0950
Passatempo	vs.	Narciso	0.0393
Passatempo	vs.	Caxambu	0.1000
Passatempo	vs.	Porto	0.1058
Angai	vs.	Traituba	0.1631
Angai	vs.	Catuni	0.1677
Angai	vs.	Narciso	0.0973
Angai	vs.	Caxambu	0.1567
Angai	vs.	Porto	0.0804
Traituba	vs.	Catuni	0.0782
Traituba	vs.	Narciso	0.1622
Traituba	vs.	Caxambu	0.0853
Traituba	vs.	Porto	0.1337
Traituba	vs.	Narciso	0.1329
Traituba	vs.	Caxambu	0.0512
Traituba	vs.	Porto	0.0740
Narciso	vs.	Caxambu	0.0974
Narciso	vs.	Porto	0.0558
Caxambu	vs.	Porto	0.0549

According to the DAPC analysis, the ideal number of clusters was defined by the number of lineages analyzed in this study (K=11), and the ideal number of principal components (PC) retained is 28 to carry out the analysis (Figure 3).

Figure 3. Optimal number of principal components (CP) to be retained through the α -score.



Herdade and Angai lineages were the ones that obtained the greatest differentiation in relation to the others. Although they have not completely separated from the quadrant, it is possible to observe a genetic group that is further away and with less interference when compared to the others (Figures 4 and 5). This result confirms the differentiation according to the D-Jost values (Table 9).

Figure 4. Discriminant analysis with principal components (DAPC), using microsatellite markers in lineages of Mangalarga Marchador horses (Scatterplot).

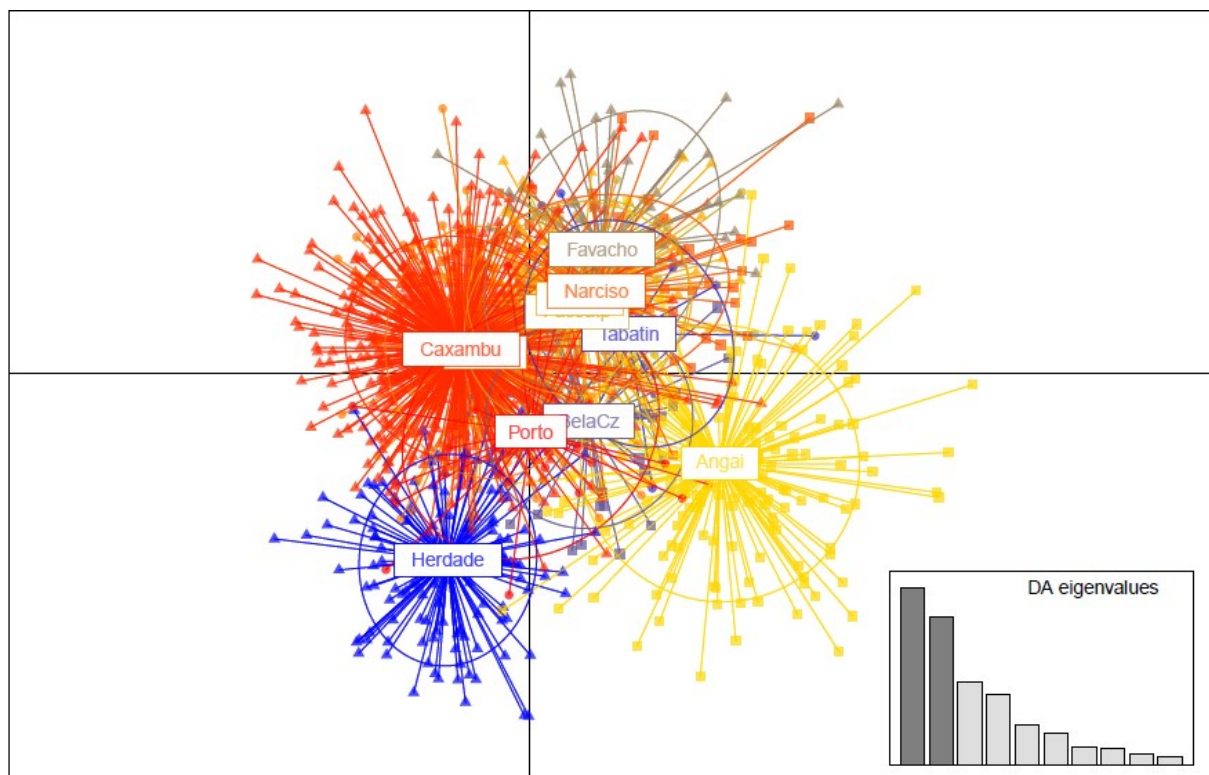
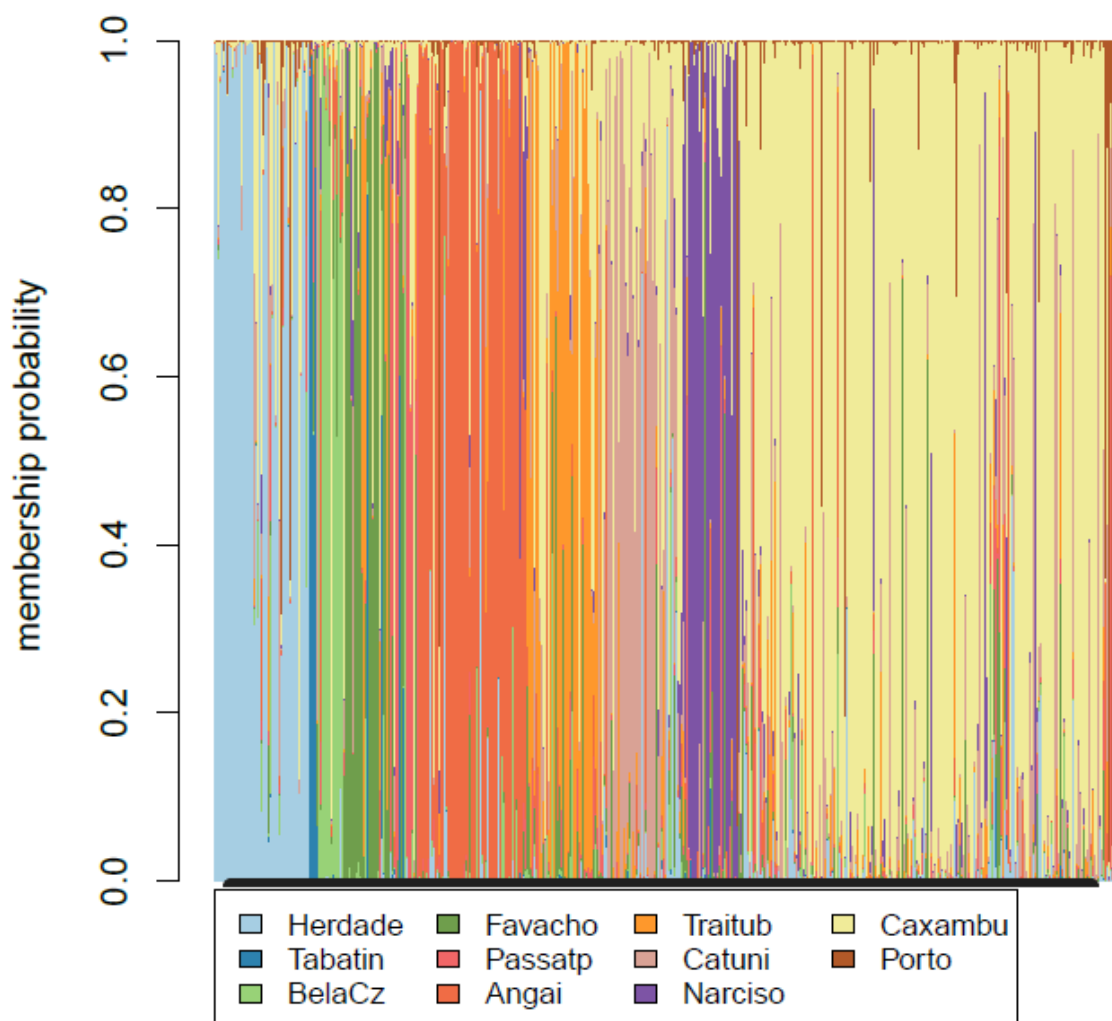


Figure 5. Discriminant analysis with principal components (DAPC), using microsatellite markers in lineages of Mangalarga Marchador horses (Compoplot).



After the DAPC, the D-Jost analysis was performed for the three genetic groups observed, Angai, Herdade and the strains that did not separate by DAPC, were considered only one group, called General. When we compared the three groups, we observed that the Herdade and Angai strains presented a value greater than 0.15, demonstrating a good structure among them (Table 11).

Table 11. D-Jost values of the relationships between group genetic group separated post DAPC.

D-Jost	Herdade	Geral
Herdade	-	0.124
Geral	0.124	-
Angai	0.188	0.137

For the study of phenotypic characterization, data from 536 animals were used, which were separated into 3 groups: Angai, Herdade and General. The Kruskal Wallis mean test was performed. It is a test for non-parametric data considering a significant value of $p = 0.05$, and it was observed that the only morphometric measures that did not present differences between the lineages were: head, neck, shoulder, croup and back loin length (Table 12).

Table 12. Kruskal Wallis test values in comparison to the lineages, according to the morphometric measurements of the animals of the Mangalarga Marchador breed.

Lineages	Morphometric measurements													
	HW	HC	HL	NL	SL	BL	CL	BLL	HeW	HW	TC	SC	GAIT	MORF
Angai x Geral	0.21	0.42	0.80	1.00	1.00	0.01*	0.97	1.00	0.04*	0.02*	0.15	0.51	1.00	0.87
Angai x Herdade	1.0e-06*	1.0e-06*	0.07	0.43	0.79	1.0e-02*	0.26	0.61	2.6e-09*	1.00	1.00	0.07	1.1e-10*	2.2e-07*
Herdade x Geral	1.8e-06*	3.7e-07*	0.21	0.84	0.80	0.20	0.87	0.50	1.9e-10*	2.5e-02*	0.04*	3.9e-03*	2.5e-10*	4.2e-05*

(*): significant values. HW: height at withers, HC: height at croup, HL: head length, NL: neck length, SL: shoulder length, BL: body length, CL: croup length, BLL: back loin length, HeW: head width, HW: hip width, TC: thoracic circumference, SC: shin circumference, GAIT: gait score, MORF: morphology score.

Tables 13, 14 and 15 present the descriptive statistics of the 3 lineages separately. For the most part, the means of morphometric measurements are lower in the lineage Herdade when compared to the others. However, the progress and morphology scores are also higher in the same lineage.

Table 13. Descriptive statistics of morphometric measurements in the lineage Angai.

Variable	N	Mean	Min	Max	CV	STD Dev
HW	67	1.47	1.40	1.54	2.27	0.03
HC	67	1.46	1.38	1.53	2.32	0.03
HL	67	0.56	0.50	0.64	3.58	0.02
NL	67	0.61	0.55	0.65	3.91	0.02
BLL	67	0.48	0.41	0.54	5.57	0.03
CL	67	0.51	0.44	0.55	5.40	0.03
SL	67	0.51	0.43	0.57	4.86	0.02
BL	67	1.50	1.39	1.58	2.26	0.03
HeW	67	0.20	0.18	0.22	4.93	0.01
HW	67	0.50	0.43	0.54	4.99	0.02
TC	67	1.70	1.57	1.85	3.12	0.05
SC	67	0.18	0.16	0.20	3.81	0.01
AND	65	70.00	60.00	85.00	6.09	4.29
MORF	65	70.00	60.00	81.00	6.06	4.22

HW: height at withers, HC: height at croup, HL: head length, NL: neck length, SL: shoulder length, BL: body length, CL: croup length, BLL: back loin length, HeW: head width, HW: hip width, TC: thoracic circumference, SC: shin circumference, GAIT: gait score, MORF: morphology score.

Table 14. Descriptive statistics of morphometric measurements in the General group.

Variable	N	Mean	Min	Max	CV	STD Dev
HW	409	1.47	1.40	1.56	2.36	0.03
HC	409	1.45	1.36	1.55	2.29	0.03
HL	409	0.56	0.50	0.62	3.10	0.02
NL	409	0.61	0.52	0.70	4.76	0.03
BLL	409	0.47	0.40	0.56	6.55	0.03
CL	409	0.51	0.41	0.57	4.85	0.02
SL	409	0.51	0.44	0.60	5.05	0.02
BL	409	1.48	1.37	1.59	2.72	0.04
HeW	409	0.20	0.17	0.24	5.74	0.01
HW	409	0.49	0.40	0.55	4.40	0.02
TC	409	1.69	1.53	1.86	3.29	0.05
SC	409	0.18	0.16	0.21	4.58	0.01
AND	398	71.00	27.00	90.00	9.83	6.99
MORF	398	71.00	55.00	91.00	9.39	6.64

HW: height at withers, HC: height at croup, HL: head length, NL: neck length, SL: shoulder length, BL: body length, CL: croup length, BLL: back loin length, HeW: head width, HW: hip width, TC: thoracic circumference, SC: shin circumference, GAIT: gait score, MORF: morphology score.

Table 15. Descriptive statistics of morphometric measurements in the lineage Herdade.

Variable	N	Mean	Min	Max	CV	STD Dev
HW	60	1.44	1.40	1.57	2.61	0.04
HC	60	1.43	1.38	1.53	2.33	0.03
HL	60	0.56	0.52	0.58	2.46	0.01
NL	60	0.61	0.53	0.68	3.96	0.02
BLL	60	0.48	0.40	0.56	6.23	0.03
CL	60	0.50	0.43	0.56	4.53	0.02
SL	60	0.51	0.44	0.57	5.03	0.02
BL	60	1.47	1.39	1.64	3.13	0.045
HeW	60	0.19	0.17	0.21	6.51	0.01
HW	60	0.50	0.45	0.54	3.79	0.02
TC	60	1.70	1.60	1.80	2.19	0.04
SC	60	0.18	0.17	0.20	3.07	0.00
AND	59	77.00	65.00	85.00	5.52	4.24
MORF	59	74.00	65.00	82.00	5.44	4.04

HW: height at withers, HC: height at croup, HL: head length, NL: neck length, SL: shoulder length, BL: body length, CL: croup length, BLL: back loin length, HeW: head width, HW: hip width, TC: thoracic circumference, SC: shin circumference, GAIT: gait score, MORF: morphology score.

4. DISCUSSION

Costa et al (2005a) found in the entire population of the Mangalarga Marchador breed registered, an average of 11.30% for the inbreeding coefficient, which is considered an acceptable level, corroborating those found in this study, demonstrating that breeders avoid mating between related animals, even within the same lineage.

Baena (2020), using the same molecular markers from this study, observed the Fis mean in the MM breed of -0.0195 ± 0.0254 , ranging from 0.0232 (ATH5) to 0.1490 (LEX03). In the present study, although the minimum value was observed in the same marker 0.009 (AHT5), the maximum value was 0.333 (ASB23).

Laat (2001), observed the variation of the average inbreeding coefficient in the Campolina breed between 0.0129 and 0.0659, within the subpopulations per generation. Andalusian horses had an average inbreeding of 0.0117 (Valera *et al.*, 1997). Other breeds that showed Fis values were Thoroughbred English (0.0102), French Trotter (0.0186), Arabian (0.0308), Anglo-Arabian (0.0117) and French Seal (0.007) (Moureaux, *et al.*, 1996).

According to studies in horses, the inbreeding coefficient (Fis) values are low, demonstrating that breeders do not perform much mating between related animals, thus maintaining genetic variability in their populations.

Silva Filho *et al.* (2007) in a study with the Marajoara, Puruca, Thoroughbred English, Mangalarga Marchador, Brasileiro de Equestrian and Quarter Horse breeds observed that the 5 studied breeds were not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). These same authors observed significant deviations in the loci HSM7, HTG4 and VHL20 in 79 MM animals from a single stud farm, and these loci were also analyzed in the current study.

Assis *et al.* (2009), considering other microsatellite markers, observed significant deviations in the HWE for the loci ASB3, LEX019, LEX031, TKY321, and VIASH39 when they analyzed each different population, but when analyzed together, they observed deviations only in the loci ASB3 and LEX031, in addition to observing that the value of zero was obtained in the global HWE test.

On the other hand, Silva *et al.* (2012) analyzed the genetic variability in five breeds of horses naturalized in Brazil, Campeira, Lavradeira, Pantaneira, Mangalarga Marchador and the Baixadeiro genetic group comparing with the exotic breed Purebred Arabe and concluded that the breeds were not in equilibrium.

Thus, according to several studies presented, it can be observed that most of the equine breeds and populations studied were not in HWE, demonstrating that there is an evolution in these populations, that is, that there may be selection, migration, mutation in these populations.

The values observed for Ne, are lower than those observed by Costa *et al.* (2005a) in the

same breed, this difference may be due to the populations observed in the present study present higher percentage of inbreeding.

No studies were found using the D-Jost parameter to differentiate between populations in horses. However, in fish, several studies used this parameter to determine whether there are differences between populations. The mean value considering the existence of differences between populations was 0.07 for Okazaki *et al.* (2017) and 0.14 for Landínez-García RM, Narváez JC, Márquez EJ. (2020). Studies with lions and bovines from southern Russia considered the determinant D-Jost value equal to 0.15. Thus, in the present study, a value of 0.15 was considered as the minimum value that indicates that there is differentiation between populations.

Santos *et al.* (2019) sought to investigate the formation of family structures in the MM breed, through SNP genotyping, in an attempt to identify lineages according to the type of behavior of the animals. But despite finding formation of groups in the population, they did not verify the existence of lineages linked to the type of gait.

Souza (2021) also working with the Mangalarga Marchador breed, analyzed lineage differentiations using 13 microsatellites, but with the methodology used, he did not observe genetic differences between them.

Costa *et al.* (2005b) carried out a study with the objective of identifying the formation of lineages in the Mangalarga Marchador breed. It was observed the existence of five distinct genetic groups in the population as representatives of the breed, being the lineages Herdade, Providência, Abaíba, Tabatinga and Angaí. Three of these lineages were also the ones with the greatest genetic differentiation observed in the present study, demonstrating that they are indeed distinct subpopulations within the Mangalarga Marchador breed.

In another breed, Marchiori *et al.* (2019) sought to genetically separate the racing and working lineages of the Quarter Horse breed. These authors found genetic differences between working and racing lineages of Quarter Horses.

Thus, observing studies seeking to identify lineages in the MM breed, we noticed the absence of work with genetic differentiation of populations, even though this method is of great importance and is the most used in several breeds.

The Kruskal-Wallis is a non-parametric statistical test that assesses the differences between three or more groups of independent samples on a single non-normally distributed continuous variable (McKight, PE e Najab, J., 2010).

For the phenotypic differentiation and with the performance of the test, it was observed that the lineage Herdade presented greater differentiation in relation to the other lineages. Herdade compared to Angai presented 6 different morphometric measurements, whereas when compared to General, Herdade presented 8 different measurements. Only for neck, head, shoulder, croup and back-loin length measurements there was no difference between the 3 groups. When we compare the differences between Angai and General, we observe only 3 different measurements between them.

Analyzing the descriptive statistics, we can conclude that the lineage Herdade has lower height at withers, height at croup, body and croup length, head width, when compared to the other 2 groups (Angai and General). However it presents a score of gait and morphology with higher values, proving to be a lineage with smaller animals but with better gait and morphology.

5. CONCLUSION

In the present study, the population of Mangalarga Marchador presented 3 groups with genetic differentiation, Herdade and Angai lineages and a single group with all the other 9 lineages (General).

It was possible to observe that only the lineage Herdade showed differences between their morphological measurements taken at the time of the animals' registration, showing animals with lower withers and rump heights and body length.

Animals of the lineage Herdade are horses with better morphology and gait, allowing the breeder to look for animals for reproduction.

6. REFERENCES

- ABDELMANOVA, A.S.; Kharzinova, V.R.; Volkova, V.V.; Dotsev, A.V.; Sermyagin, A.A.; Boronetskaya, O.I.; Chinarov, R.Y.; Lutshikhina, E.M.; Sölkner, J.; Brem, G.; *et al.* **Comparative Study of the Genetic Diversity of Local Steppe Cattle Breeds from Russia, Kazakhstan and Kyrgyzstan by Microsatellite Analysis of Museum and Modern Samples.** Diversity 2021, 13, 351. <https://doi.org/10.3390/d13080351>
- ASSIS, J.B., Laat, D.M., Peixoto, M.G.C.D., Bergmann, J.A.G., Fonseca, C.G., Carvalho, M.R.S., **Genetic diversity and population structure in Brazilian Mangalarga Marchador horses,** Genetic and Molecular Research, v8, n4, p1519-1524, 2009
- BAENA, M.M., DIAZ, SILVINA, MOURA, R.S., MEIRELLES, S.L.C., 2020. **Genetic characterization of Mangalarga Marchador breed horses based on microsatellite molecular markers.** 289 Journal of Equine Veterinary Science. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103231>.
- BECK, S.L., 1992. Mangalarga Marchador: **Caracterização, história e seleção.** Primeira ed, 292 Brasília.
- BORTONI, Rosalbo. **O Mangalarga Marchador e os outros cavalos de sela no Brasil.** Uberaba: Grupo Rotal Ltda, 1991.
- CASIUCH, R. L. **As costelas do abismo: Os mais influentes garanhões do século XX na raça.** 2016.
- COSTA, M. D. *et al.* **Análise temporal da endogamia e do tamanho efetivo da população de equinos da raça Mangalarga Marchador.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 57, n. 1, p. 112-119, 2005a.
- COSTA, M. D., Bergmann, J. A. G., Rezende, A. S. C., Fonseca, C. G., Faria, F. J. C., 2005b. **Estudo da subdivisão genética da raça Mangalarga Marchador.** Arq. Bras. Med. Vet.Zootec., 57, 272-280. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352005000200021>.
- DURES, Simon *et al.* **Population connectivity across a transboundary conservation network: potential for restoration?.** Research Square, [S. l.], ano 2021, p. -, 12 maio 2021. DOI <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-452520/v1>. Disponível em: <https://www.researchsquare.com/article/rs-452520/v1>. Acesso em: 26 jan. 2023.
- GERLACH *et al.* (2010). **Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics!** Mol Ecol 19:3845–3852. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04784>.
- JOMBART T, Devillard S, Balloux F. (2010). **Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations.** BMC Genetics 11:94. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- JOMBART, T., DEVILLARD, S., BALLOUX, F., 2010. **Discriminant analysis of**

- principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations.** BMC Genet. 11, 94–109. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>.
- JOST L. (2008). **G ST and its relatives do not measure differentiation.** Mol Ecol 17:4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
- KRUSKAL, W. H., & WALLIS, W. A. (1952). **Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis.** Journal of the American Statistical Association, 47, 583-621. <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>
- LAAT, D.M. **Contribuição genética de fundadores e ancestrais na raça Campolina.** 2001. 34f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LANDÍNEZ-García RM, Narváez JC, Márquez EJ. (2020) **Population genetics of the freshwater fish *Prochilodus magdalenae* (Characiformes: Prochilodontidae), using species-specific microsatellite loci.** PeerJ. 2020 Nov 11;8:e10327. doi: 10.7717/peerj.10327. PMID: 33240645; PMCID: PMC7666565.
- MARCHIORI, C. M. *et al.* **Linkage disequilibrium and population structure characterization in the cutting and racing lines of Quarter Horses bred in Brazil.** Livestock Science, v. 219, p. 45-51, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.11.013>
- MCKIGTH, PE e NAJAB, J. (2010) **Teste de Kruskal-Wallis.** A Enciclopédia Corsini de Psicologia, 1, 1-10. <https://doi.org/10.1002/9780470479216.corpsy0491>.
- MOUREAUX, S *et al.* **Genetic variability within French race and riding horse breeds from genealogical data and blood marker polymorphisms.** Genet Sel Evol, [S. l.], ano 1996, v. 28, p. 083-102, 1996.
- OKAZAKI, T.I. *et al.* **Genetic characterization of *Brycon hilarii* (Characiformes) populations within the Pantanal: Aspects of their conservation within a globally important neotropical wetland.** J. Ichthyol. 57, 434–444 (2017). <https://doi.org/10.1134/S0032945217030092>
- R CORE TEAM (2022). **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- SANTOS, Bruna A. *et al.* **Genomic analysis of the population structure in horses of the Brazilian Mangalarga Marchador breed.** Livestock Science, v. 229, p. 49-55,2019. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/189660>>.
- SILVA FILHO, E., Schneider, M.P.C., Silva, A.L.C., **Variabilidade genética de equinos baseada em DNA microssatélites,** Rev. Trop. Cienc. Agrar. Biol., v1, p76-87, 2007.
- SILVA, A.C., Paiva S.R., Albuquerque M.S., Egito A.A., Santos S.A., Lima F.C., Castro S.T., Mariante A.S., Correa P.S., McManus C.M., **Genetic variability in local Brazilian horse lines using microsatellite markers,** Genet. Mol. Res., v10, p881-90,

2012b.

SOUZA, Felipe Amorim Caetano. **Parâmetros genéticos de características morfofuncionais e identificação de linhagens na raça Mangalarga Marchador** / Felipe Amorim Caetano de Souza - Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021. 94 p.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. SAS/STAT User’s guide. Cary: **Statistical Analysis System Institute**, 1999. CD-ROM.

VALERA, M. 1997. **Mejora genética del caballo de P.R.E. de estirpe Cartujana**. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.