

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
CURSO DE ZOOTECNIA**

BRUNA VALENZUELA GARCIA

**RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS
MATRILINEAR DO REBANHO BUBALINO DA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL
AGRONÔMICA DA UFRGS**

Porto Alegre

2021

BRUNA VALENZUELA GARCIA

**RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS
MATRILINEAR DO REBANHO BUBALINO DA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL
AGRONÔMICA DA UFRGS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para obtenção
do Grau de Zootecnista, Faculdade de
Agronomia, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

Orientador: Thales Renato Ochotorena de
Freitas

Porto Alegre
2021

BRUNA VALENZUELA GARCIA

**RECONSTRUÇÃO FILOGENÉTICA E IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS
MATRILINEAR DO REBANHO BUBALINO DA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL
AGRONÔMICA DA UFRGS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do Grau de
Zootecnista, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Data de aprovação: ____/____/_____

Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas,
Orientador

Dr^a. Gislene Lopes Gonçalves,
Membro da Banca

Profa. Dra. Elisa Cristina Modesto,
Membro da Banca

“MUCH IN EVOLUTION MAKES EVEN MORE SENSE IN
THE LIGHT OF HISTORICAL GENEALOGY.”
(Avice, 2000, em complemento a Dobzhansky, 1973)

Dedico este trabalho à minha
fonte de amor eterno,
Vó Dalva.

AGRADECIMENTOS

Do lado de fora, a chuva lava as janelas do laboratório. Aqui dentro, estou prestes a terminar meu trabalho de conclusão de curso. Já são mais de cinco anos realizando este sonho que é ser uma estudante de zootecnia da UFRGS. Foram muitos dias de trabalho, sorrisos, conversar até tarde no lab., viagens, estudos e ciência. Ao longo da minha graduação, foram muitos aqueles que contribuíram na conquista dos meus objetivos, que me ajudaram a superar medos e inseguranças. No meu caminho, passaram muitas pessoas importantes, as quais quero agradecer.

Primeiramente, minha família. Mãe, Sandra Elena, e pai, Paulo Ricardo, que me deram o suporte necessário e possível para que eu concluísse mais esta etapa da minha vida. Maninha Larissa Valenzuela, minha maior inspiração, meu colo e meu abrigo, sempre por perto, mesmo estando longe. Ao meu companheiro de vida, meu amor Rafael Carpes, aquele que mais me apoiou nesta reta final, que está sempre ao meu lado, nos momentos difíceis, e acima de tudo, nas minhas conquistas.

Aos melhores amigos do mundo! Karina Munhós e Bianca Saggin, não tenho palavras para traduzir uma vida inteira cheia de bons momentos e lembranças. Jordy Patrick, a amizade mais inesperada e o cara mais gente boa do mundo.

Aos colegas de graduação. Brenda Lana, que é muito mais que apenas colega. É praticamente uma extensão de mim mesma, pela amizade linda que construímos durante este percurso, pelas horas de conversas e companheirismo. Fernanda Fontoura, Jenifer Beretta, Bruna Cony, Cindy Anne, Caio Pegorini e Rodrigo Vogt, todo meu carinho e gratidão, eu amo vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas, sou grata pela oportunidade de ser sua orientada, por toda paciência do mundo e todo incentivo. Obrigada por todos os seus ensinamentos. A todos os meus colegas do Lab, obrigada por todos os momentos do café, palavras cruzadas e risadas.

Em especial, aqueles que colaboraram para a conclusão e desenvolvimento deste trabalho. Cristina Matzenbacher, por todas as conversas fora de hora, todas as correções e parceria. Eu amo muito você. William Peçanha, mestre Jedi, por toda a orientação e ensinamentos. Luiz Ribas, por todas as conversas, debates e suporte. Bruna Synwelski, pela paciência e pelo ensinar. Letícia Orlandi, Lelê para os mais íntimos, e Lorenzo Krolikowski obrigada por tudo.

RESUMO

A aquisição dos búfalos no Brasil inicialmente foi motivada pelo seu exotismo e não pelas suas qualidades zootécnicas. O maior interesse na espécie, particularmente após a década de 80, foi acompanhado de intenso intercâmbio de animais entre os estados brasileiros principalmente por criadores buscando introduzir espécimes de maior pureza racial e de características fenotípicas mais adequadas a seus objetivos de exploração. Essa mistura conferiu uma variabilidade que muitas vezes é observada na conformação corporal desses animais, caracterizando-se como uma variedade distinta. Algumas características exigidas no padrão racial são perdidas e estes indivíduos excluídos, diminuindo o número de animais disponíveis para seleção visando características de interesse econômico. Em casos como estes, a utilização da genética molecular pode ser um instrumento rápido para a identificação de animais que, se bem caracterizados, seriam mais interessantes para serem mantidos como reprodutores, aumentando a eficiência da seleção no gerenciamento dos rebanhos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar um diagnóstico de similaridade genética, a partir da construção de duas árvores filogenéticas, entre o rebanho de bubalinos da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS (EEA) e sequências obtidas no *GenBank* de indivíduos de diferentes espécies e raças bubalinas. Foi realizada extração do DNA total e reações em cadeia da polimerase (PCR) dos genes citocromo *b* (1.140 pb) e citocromo *c* oxidase I (631 pb), sendo posteriormente sequenciados. As filogenias foram reconstruídas utilizando 1.140 e 631 pares de bases dos genes mitocondriais citocromo *b* e citocromo *c* oxidase I respectivamente, e foram incluídas sequências de 14 diferentes espécies/raças de bubalinos obtidas no *GenBank*. Como resultado, em ambas as árvores os espécimes se agruparam com os indivíduos das raças Mediterrâneo, Murrah e Nili-Ravi. Isso representa um panorama de que a linhagem matrilinear do rebanho analisado, quando comparado com os indivíduos de diferentes raças e espécies de bubalinos, tem origem similar aos das raças Mediterrâneo, Murrah e Nili-Ravi.

Palavras-Chave: *Bubalus bubalis*; Citocromo *b*; Citocromo *c* oxidase I; Filogenética

ABSTRACT

The acquisition of buffaloes in Brazil was initially motivated by their exotic but not their zootechnical qualities. The interest in the species, mainly 1980s onwards, was accompanied by an intense exchange of animals between Brazilian states, mainly by breeders, seeking to introduce specimens with greater racial purity and phenotypic features more suited to their exploratory goals. This mixture provided a variability that is often observed in the body conformation of these animals, characterizing itself as a distinct variety. Some features required in the racial pattern are lost, and these individuals are excluded, reducing the number of animals available for selection aiming at features of economic interest. In these cases, molecular genetics can be a quick instrument to identify animals that, if well-characterized, would be more interesting to be kept as breeding animals, increasing the efficiency of selection in the herd's management. Thus, the goal of this study was to carry out a diagnosis of genetic similarity, from the construction of two phylogenetic trees, between the herd of buffaloes from the UFRGS Agronomic Experimental Station and sequences obtained from GenBank of buffaloes of different species and breeds. Phylogenies were reconstructed using 1.140 and 631 base pairs of mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes. Sequences from 14 different species/breeds of associated buffaloes were included in GenBank. As a result, the specimens clustered with individuals of the Mediterranean, Murrah, and Nili-Ravi races in both trees. This represents a panorama in which the matrilineal lineage of the analyzed herd is similar to those of the Mediterranean, Murrah, and Nili-Ravi races, compared to individuals of different races and species of buffaloes.

Keywords: *Bubalus bubalis*; Cytochrome b; Cytochrome c oxidase I; Phylogenetics

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 TAXONOMIA DOS BUBALINOS	14
2.2 EVOLUÇÃO E DISPERSÃO	17
2.3 REBANHO BUBALINO MUNDIAL E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	19
2.4 BUBALINOCULTURA E SUA SITUAÇÃO NO BRASIL	20
2.5 RAÇAS BUBALINAS NO BRASIL	22
2.5.1 Murrah	23
2.5.2 Mediterrâneo	24
2.5.3 Jafarabadi	24
2.5.4 Carabao	25
2.5.5 Variedade tipo Baio	26
2.6 DNA MITOCONDRIAL	28
2.6.1 Citocromo <i>b</i>	29
2.6.2 Citocromo <i>c</i> oxidase I	30
2.7 O ESTUDO DA FILOGENIA MOLECULAR	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	31
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	36

3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CITOCROMO <i>B</i> E COI	36
3.4 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO	37
3.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	37
3.5.1 Diversidade Genética e Relações haplotípicas	39
3.5.2 Reconstrução filogenética	41
4 RESULTADOS	41
4.1 REDE DE HAPLÓTIPOS	41
4.2 ÁRVORE FILOGENÉTICA	45
5 DISCUSSÃO	49
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICE	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Raças bubalinas criadas no Brasil.** Fonte: Andrade; Garcia, 2005..... 23
- Figura 2. Variedades da raça Jafarabadi: Palitana e Gir, respectivamente.** Fonte: ASCRIBU, 2018 e zoovetesmpasion.com..... 25
- Figura 3. Búfalos da Ilha do Marajó.** Fonte: Reprodução TV Globo 27
- Figura 4. Semelhanças e diferenças fenotípicas entre o Tipo Baio (A) e a raça Murrah (B).** Fonte: REIMCHE, 2010..... 28
- Figura 5. Representação gráfica da organização completa do genoma mitocondrial do búfalo de Andaman.** Fonte: KUMAR DE et al., 2019. 29
- Figura 6. Localização da EEA UFRGS em relação ao Centro Histórico de Porto Alegre.** Fonte: Google Maps (acessado em: 01 nov. 2021) 32
- Figura 7. Rebanho bubalino da Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.** Fonte: GEBU, 2021. 33
- Figura 8. Tubos de EDTA com as amostras de sangue juntamente com o kit da Invitrogen para iniciar a extração de DNA.** Fonte: Do autor, 2021. 36
- Figura 9. Relações haplotípicas observadas para as sequências de um fragmento de 1.140 pb do gene mitocondrial *cyt b* de 39 indivíduos. O tamanho dos círculos vermelhos representam a frequência haplotípica. Os círculos em preto indicam os vetores médios. Os passos mutacionais estão indicados ao longo do ramo, na cor roxa. Erro! Indicador não definido.**
- Figura 10. Rede de haplótipos construída a partir do gene mitocondrial parcial do COI com 631 pb, utilizando 36 indivíduos. O tamanho dos círculos legendados representam a frequência haplotípica. Os círculos menores, sem legenda, indicam os vetores intermediários. Os passos mutacionais estão indicados ao longo do ramo, na cor azul. Erro! Indicador não definido.**
- Figura 11. Inserção de adenina nas sequências da leitura de nucleotídeos do gene *cyt b*, de cinco indivíduos do rebanho estudado..... Erro! Indicador não definido.**
- Figura 13. Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança reconstruída com base em sequências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (631 pb), utilizando 18**

**indivíduos do rebanho bubalino da EEA da UFRGS e 19 sequências do GenBank Erro!
Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação científica dos bubalinos.....	15
Tabela 2. Raças registradas da espécie <i>Bubalus bubalis</i> no Brasil e suas aptidões produtivas	22
Tabela 3. Caracterização das amostras e suas respectivas raças	33
Tabela 4. Identificação das sequências provenientes do Genbank e seus respectivos números de acesso	34
Tabela 5. Amostras que foram alinhadas e usadas para a reconstrução filogenética.....	38
Tabela 6. Divisão das populações dentro dos genes <i>cyt b</i> e <i>COI</i>	39
Tabela 7. Compartilhamento de haplótipos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AA - Aminoácido(s)
- ABCB - Associação Brasileira dos Criadores de Búfalos
- AP - Antes do presente
- ASCRIBU - Associação Sulina de Criadores de Búfalos
- BioLib - enciclopédia internacional *Biological Library*
- c. - Por volta de
- COI - Citocromo c oxidase I
- cyt b - Citocromo b
- DNA - Ácido Desoxirribonucleico
- EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EEA - Estação Experimental Agronômica
- FAO - Food and Agriculture Organization. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- GEBU - Grupo de Estudos de Bubalinos da UFRGS
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- IUCN - União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais
- Ka - medida de tempo equivalente a mil anos
- mtDNA - Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial
- pb – Pares de bases
- PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- UniProt - base de dados *Universal Protein*

1 INTRODUÇÃO

Os búfalos são animais domésticos da família dos bovídeos, de origem asiática, utilizados para produzir carne e leite para consumo humano. Estes animais são classificados na subfamília Bovinae, gênero *Bubalus*, sendo a espécie *Bubalus bubalis* dividida em dois grupos principais: *Bubalus bubalis bubalis*, também conhecido como búfalo-do-rio, e o *Bubalus bubalis carabanensis*, conhecidos como búfalo-do-pântano (CARROLL, 1988; CASTILLO 1998). A introdução desses animais no Brasil, primeiramente foi motivada pelas características fenotípicas exóticas e quase nada se sabia sobre suas qualidades zootécnicas. O maior interesse na espécie, particularmente após a década de 80, foi acompanhado de intenso intercâmbio de animais entre os estados brasileiros principalmente por criadores buscando introduzir espécimes de maior pureza racial e de características fenotípicas mais adequadas a seus objetivos de exploração (BERNARDES, 2007).

Para o registro genealógico das raças, é necessário uma série de características fenotípicas instituídas dentro do padrão racial. Existem 72 tipos de raças de búfalos no mundo, dos quais 57 estão na Ásia, e há 22 raças bubalinas que são criadas para a produção de leite (YILMAZ ADKINSON; KONCA, 2021). A Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (ABCB) reconhece quatro raças de búfalos no Brasil: Mediterrâneo, de origem italiana; Carabao, originário do norte das Filipinas; Murrah e Jafarabadi, ambas de origem indiana (ABCB, 2021).

É sabido que determinadas raças de bubalinos têm um maior aproveitamento de sua aptidão leiteira, como a raça Murrah (ABCB, 2021). Contudo, devido aos primeiros rebanhos bubalinos dessa raça no Brasil terem uma base genética bastante estreita, em muitos casos, para resolver este problema foi priorizado o cruzamento entre raças. Essa mistura conferiu uma variabilidade que muitas vezes é observada na conformação corporal desses animais, caracterizando-se como uma variedade distinta (COSTA, 2015). Além disso, em muitas localidades do Brasil a produção bubalina é realizada, em pequenos rebanhos e sem controle genealógico, como atividade secundária à bovinocultura e, ao longo do tempo, as referências de sua formação se perdem (ANDRADE; GARCIA, 2005). Características exigidas no padrão racial são perdidas e estes indivíduos excluídos

diminuindo o número de animais disponíveis para seleção visando características de interesse econômico.

Nas últimas décadas observou-se um progresso na genética molecular que possibilitou a criação de ferramentas importantes para estudos filogenéticos e populacionais, como a taxonomia molecular. E, com isso, nossa capacidade em identificar espécies e caracterizar a biodiversidade de diversos ecossistemas brasileiros foi aumentada (BRASIL, 2009). Assim, como discriminar subdivisões populacionais intraespecíficas de animais silvestres e domésticos de importância econômica com mais eficiência, em alguns casos, que a biometria morfológica (ERIKSSON et al., 2006; GARRIGAN; HAMMER, 2006).

Genes mitocondriais possuem herança exclusivamente materna, além de apresentarem padrão de herança não Mendeliana e não sofrem eventos de recombinação. O citocromo *b* (*cyt b*) e citocromo c oxidase I (COI) são genes mitocondriais frequentemente utilizados em estudos filogenéticos, pois apresentam amplo polimorfismo intraespecífico e evoluem mais rápido que o DNA nuclear (AVISE, 2000). Estes genes podem servir como marcadores genéticos e associados às sofisticadas metodologias estatísticas têm se mostrado bastante eficientes para discriminar subpopulações ou raças (AVISE, 2000; HAMMER, 2006; GODMAN, 1998).

Os estudos de recursos genéticos em animais domésticos estão em evidência. No entanto, a população de bubalinos é pouco caracterizada no Brasil, apesar destes animais desempenharem um papel socioeconômico de destaque para populações das diversas regiões que os utilizam como fonte de subsistência (ZETOUNI, 2013). Aliado ao processo de melhoramento as técnicas de genética molecular, juntamente aos métodos tradicionais do melhoramento genético, possibilitam o estudo da expressão do potencial genético animal. Sua utilização prática na produção animal pode aumentar a eficiência da seleção no gerenciamento dos rebanhos e contribui com o progresso genético da população (CAMPOS, 2011).

Com isso, o presente trabalho buscou realizar um diagnóstico de similaridade genética entre as linhagens matrilinear do rebanho de bubalinos da Estação Experimental Agrônômica da UFRGS e indivíduos de diferentes espécies e raças de bubalinos. Tendo como objetivo buscar uma nova ferramenta que possa ser utilizada no gerenciamento de rebanhos, principalmente auxiliando na seleção de reprodutores, para que atue de forma complementar a seleção clássica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TAXONOMIA DOS BUBALINOS

Segundo Melo (2017), existem contradições na ordem zoológica da espécie e este ainda é um assunto em construção e discussão entre a comunidade científica, associações e criadores. Devido às constantes alterações e revelações no sistema de nomenclatura dos bubalinos sua taxonomia encontra-se em constante modificação e atualmente não possui uma linguagem universal compreendida (MELO, 2017).

Na tabela 1 está representada a classificação científica dos bubalinos. São animais pertencentes ao reino *Animalia*; Classe *Mammalia*; Ordem *Artiodactyla* e Subordem *Ruminantia*. Os bubalinos pertencem à família Bovidae que foi descrita por Gray em 1821. Ela é a maior das 10 famílias existentes em *Artiodactyla* e é conhecida através de registros fósseis do início do Mioceno. Evidências moleculares, morfológicas e fósseis sugerem 8 subfamílias dentro deste grupo. A subfamília que contempla os búfalos é a Bovinae que além destes também inclui os bisões, bois e antílopes de chifres espirais. As espécies de Bovinae são nativas da África, América do Norte, Eurásia, Índia e sul da Ásia. (ALDER, et al., 1995; FELDHAMER, et al., 2007; GENTRY, 2011; KINGDON, 1982a; 1982b; VAUGHN, et al., 2000; WALTHER, 1990).

Tabela 1. Classificação científica dos bubalinos

Classificação	
Reino	<i>Animalia</i> Linnaeus, 1758
Classe	<i>Mammalia</i> Linnaeus, 1758
Ordem	<i>Artiodactyla</i> Owen, 1848
Subordem	<i>Ruminantia</i> Scopoli, 1777
Família	<i>Bovidae</i> Gray, 1821
Subfamília	<i>Bovinae</i> Gray, 1821
Gênero	<i>Bubalus</i> C. H. Smith, 1827
Espécie	<i>Bubalus mindorensis</i> – Tamarau ou Tamaraw (Heude, 1888)
	<i>Bubalus depressicornis</i> – Anoa (C.H. Smith, 1827)
	<i>Bubalus quarlesi</i> – Anoa da Montanha (Ouwens, 1910)
	<i>Bubalus mephistopheles</i> – (Hopwood, 1925)

Bubalus arnee - Búfalo selvagem asiático (Kerr, 1792)

Bubalus bubalis - Búfalo doméstico asiático (Linnaeus, 1758)

Bubalus bubalis subsp. *bubalis* - Búfalo do rio (Linnaeus, 1758)

Bubalus bubalis subsp. *carabanensis* – Búfalo do Pântano (Castillo, 1998)

Bubalus bubalis subsp. *fulvus* (Blanford, 1891)

Bubalus bubalis subsp. *mignona* (Deraniyagala, 1952)

Bubalus bubalis subsp. *theerapati* (Groves, 1996)

Fonte: Adaptado de LINNAEUS, 1758; FRISCH, 1775; LICHTENSTEIN, 1814; GRAY, 1821; SMITH, 1827; LYDEKKE, 1885; MASON et al., 1971; CASTILLO, 1971; COCKRILL, 1974; FISCHER & ULBRICH, 1968.

A tribo Bovini compreende todas as principais espécies de bovinos domésticos, incluindo os búfalos, e além destes, várias espécies selvagens. Estudos moleculares baseados em sequências do gene mitocondrial citocromo b sugeriram uma distinção clara dentro da tribo Bovini, de um lado, todas as espécies de *Bos* (gado) e *Bison* (bisontes), e no outro, todas as espécies de *Bubalus* (búfalos asiáticos) e *Syncerus* (búfalos africanos) (Hassanin; Douzery, 1999). Hassanin e Douzery (1999) definiram três subtribos dentro da tribo Bovini: (I) subtribo Bovina, que contempla todas as espécies dos gêneros *Bos* e *Bison*; (II) subtribo *Pseudoryina*, apenas representado por *P.nhetinhensis*; e (III) subtribo Bubalina, que incorpora todas as espécies de *Bubalus* e *Syncerus*.

A obra *Systema Naturae* de Linnaeus em 1758 incluiu todos os membros pertencentes à família dos bovídeos como sendo do gênero *Bos*, posteriormente devido às diferenças anatômicas existentes, os búfalos foram então classificados no gênero *Bubalus*. Em 1827 H. Smith classificou-os com a terminologia bubalis passando a surgir a espécie *Bubalus bubalis*, sendo esta utilizada para todas as variedades domésticas do búfalo asiático e o termo *Bubalus arnee* (Kerr, 1792), utilizada somente para os búfalos selvagens. O gênero *Bubalus* é um importante clado de Bovinae, é composto pelas espécies selvagens incluindo *Bubalus mindorensis* (Tamarao) (Heude, 1888), *Bubalus depressicornis* (anoas da planície) (C. H. Smith, 1827), *Bubalus quarlesi* (anoas da montanha) (Ouwes, 1910), *Bubalus arnee* (asiático aquático) e espécie domesticada *Bubalus bubalis* (búfalo indiano) (Linnaeus, 1758). No entanto, o cruzamento *B. bubalis* x *B. arnee* produz prole fértil e viável (Cockrill, 1974) e alguns autores denominam as populações selvagens como uma variedade de *B.bubalis arnee* (Lydekker, 1885; Cockrill, 1974; Mason et al., 1977) ou *Bubalus bubalis* Matschie, 1912 ssp. *septentrionalis* (Grubb, 2005).

Dentro da espécie *Bubalus bubalis*, foi observado que a raça carabao apresentava diferenças morfológicas e citológicas em relação ao Murrah, portanto em 1971 Castillo sugeriu dar uma nova denominação à esta variedade. Ramirez e Songsri (1979) publicaram o relatório intitulado “Citologia dos Tipos de Pântano e Rio de Búfalos de Água e Seus Híbridos” apoiando a proposta para a classificação dos carabaos como *Bubalus carabanensis* (Castillo, 1971). Em 1941 MacGregor tentou diferenciar os dois tipos de búfalos de água que encontrou na Malásia. Ele usou o tipo de pântano para carabao e Murrah para o tipo rio da raça indiana. O nome comum do búfalo do pântano na Indonésia é *karbaw*, na Malásia *kerbau* e na Tailândia *Icwai* e nas Filipinas carabao (ou *kabaw* ou *kalabaw*) (CASTILLO, 1998).

Posteriormente, utilizando estudos bioquímicos (AMANO, 1983; BARKER et al., 1997a), moleculares (BARKER et al., 1997b; KIKKAWA et al., 1997; LAU et al., 1998) e morfológicos (MACGREGOR, 1939) *Bubalus bubalis* foi classificado com duas subespécies: búfalo de rio (*Bubalus bubalis bubalis*) encontrado no subcontinente indiano, Oriente Médio e Europa Oriental; e o búfalo de pântano (*Bubalus bubalis carabanensis*) distribuído na China, Bangladesh, Países do sudeste asiático e estados do nordeste da Índia. Estes dois grupos diferem no número de cromossomos: búfalo de pântano, $2n = 48$; búfalo de rio, $2n = 50$ (FISCHER & ULBRICH, 1968), e para frequências de alelos em loci codificadores de proteínas (AMANO, 1983; BARKER et al., 1997a) e em microssatélite loci (BARKER et al. 1997b).

Segundo a base de dados *Universal Protein* (UniProt) e enciclopédia internacional *Biological Library* (BioLib), a subespécie *Bubalus bubalis carabanensis* pode possuir outras sete nomenclaturas sendo elas: (I) *Bubalus carabanensis*, (II) *Bubalus arnee carabanensis*, (III) *Bubalus bubalis carabanensis*, (IV) *Bubalus carabanensis carabanensis*, (V) *carabao*, (VI) *Bubalus bubalis kerabau* e (VII) *kerabau*.

A variedade *Bubalus bubalis fulvus* é o búfalo nativo da região nordeste da Índia, especialmente do Assam, que vive em estado semi-doméstico ou selvagem, sendo um animal de porte menor que os das subespécies *B. bubalis bubalis* e *B. bubalis carabanensis*. É de coloração pardacenta ou avermelhada, com alguma semelhança com o tipo Baio existente no Brasil (MARQUES, 1999; 2000). O *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) lista mais duas subespécies válidas de *Bubalus bubalis*: *B. bubalis fulvus*, *B. bubalis migona* e *B. bubalis theerapati*.

2.2 EVOLUÇÃO E DISPERSÃO

Evidências históricas, anatômicas e arqueológicas apoiam que as duas variedades distintas (rio e pântano) descendem do búfalo asiático selvagem (*Bubalus arnee*) populações que divergiram cerca de 900 ka AP e, em seguida, evoluíram em regiões geográficas separadas (ZHANG et al., 2020). Após a domesticação na região ocidental do subcontinente indiano (c. 6300 anos AP), o búfalo do rio espalhou-se para o oeste até o Egito, os Bálcãs e a Itália. Por outro lado, após a domesticação na região da fronteira China/Indochina ca. de 3.000 a 7.000 anos AP, os búfalos do pântano se dispersaram pelo sudeste da Ásia e pela China até o vale do rio Yangtze (COCKRILL, 1974, 1984; LAU et al., 1998; WANG et al., 2017a, 2017b; LEI et al., 2007; KUMAR et al., 2007a, 2007b; YINDEE et al., 2010; ZHANG et al., 2011, 2016; NAGARAJAN et al., 2015; COLLI et al., 2018; ZHANG et al., 2020).

O tempo de divergência entre os búfalos do rio e do pântano determinado por Lou e colaboradores (2020) sobrepuseram eventos geográficos bem conhecidos, especificamente o declínio do nível do mar durante a penúltima era Glacial, fornecendo uma explicação hipotética para as forças responsáveis por essa divergência. A descida do nível do mar criou um corredor de migração para os búfalos antigos cruzarem a área de fronteira entre Índia e Mianmar, iniciando a separação geográfica e facilitando a fixação de polimorfismos genéticos e variação de número cromossômico nos genomas de duas populações isoladas. Assim, os búfalos em Yunnan, Laos e Mianmar desenvolveram uma zona híbrida abrigando uma mistura genética de búfalos de rio de pântano. Este cenário proposto indica um maior fluxo de genes entre a população de búfalos da região do Sudeste Asiático (LOU et al., 2020).

Contudo, *Bubalus bubalis* foi amplamente domesticado e introduzido por humanos. Como resultado, um número indeterminado de populações de búfalos passou a ocupar regiões que se encontram além da área original de distribuição da espécie (GRUBB, 2005). Tais ocorrências foram algumas vezes erroneamente pensadas como representantes da distribuição natural da espécie (NOWAK, 1999). Como exemplo disso, estudos mostraram que os búfalos da Sri Lanka não são nativos como se pensava, mas sim descendentes selvagens de animais domésticos (BARKER et al., 1997a, 1997b). Segundo Grubb (2005), publicações ainda mais recentes mostraram que a história da domesticação é consideravelmente mais complexa do que se pensava originalmente e que a maioria dos animais domésticos modernos tem múltiplos ancestrais de diferentes áreas geográficas, frequentemente em espécies diferentes.

Segundo dados da IUCN (2010), as populações remanescentes de *B. arnee* ocorrem em pequenas manchas de habitat no sul do Nepal, sul de Butão, oeste da Tailândia, leste de Camboja,

sul de Mianmar e alguns pontos na Índia. O arni parece estar extinto em muitas regiões de sua ocorrência natural, tais como: Bangladesh, Vietnã, Laos, Malásia peninsular e nas ilhas de Java, Sumatra e Bornéu (GROVES, 1996; GRUBB, 2005; IUCN, 2010).

Morfológicamente, o tipo de pântano é mais semelhante a *B. arnee* do que o tipo de rio. Segundo Sarataphan e colaboradores (2017) em seu estudo com mtDNA de um *B. arnee* do santuário de vida selvagem Huai Kha Khaeng, na Tailândia, mostrou ancestralidade de ambos os tipos de rio e pântano, mas uma relação muito mais próxima com o último. Por outro lado, os búfalos selvagens da Reserva de Vida Selvagem Kosi Tappu no Nepal agruparam-se fortemente com raças do tipo rio (ZHANG et al. 2011). Embora esses supostos animais selvagens tenham sido amostrados em santuários de vida selvagem, não se pode desconsiderar a possibilidade que não sejam *B. arnee* puros (ZHANG et al. 2020).

Evidências moleculares e morfológicas indicaram que as populações de búfalos do pântano têm forte diferenciação genética geográfica e falta de fluxo gênico, mas forte uniformidade fenotípica. Em contrapartida, as populações de búfalos de rio mostram uma estrutura filogeográfica mais fraca, mas uma diversidade fenotípica mais alta, se traduzindo em muitas raças. (ZHANG et al., 2020)

2.3 REBANHO BUBALINO MUNDIAL E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O búfalo doméstico asiático (*Bubalus bubalis*) é encontrado em todos os cinco continentes, segundo a FAO (2021) com uma população global de cerca de 207 milhões de cabeças: mais de 97% estão na Ásia; 2% estão na África, principalmente no Egito; 0,7% estão na América do Sul; e menos de 0,2% estão na Austrália e na Europa. Os búfalos constituem um pouco mais de 11,1% da população bovina global. A grande maioria dos búfalos é criada em pequenas fazendas familiares de mão-obra-intensiva, onde fornecem leite e desempenham funções importantes como animais de tração, especialmente na produção de arroz (FAO, 2021).

O arroz é o alimento básico de metade da população humana mundial. Por milhares de anos o búfalo forneceu a força motriz das terras padi (campo de arroz). O sustento de mais pessoas depende dessa espécie do que de qualquer outro animal doméstico (KIERSTEIN, 2004). Os búfalos de rio (*B. bubalis bubalis*) constituem aproximadamente 70% da população mundial de búfalos (FAO, 2021).

O rebanho de *B. bubalis* encontra-se em plena expansão. Segundo as estimativas da FAO, em cerca de meio século, o número desses animais no mundo praticamente dobrou. De 88.505.407 em

1961, para 180.702.923 cabeças em 2008 (FAO, 2010). O crescimento do rebanho bubalino mundial se deve principalmente em decorrência da procura por derivados de leite, os quais possuem ótima aceitação no mercado internacional, em especial à *mozzarella* de búfala (BORGHESE, 2005; BORGHESE et al., 2011).

Os países com maior número de búfalos leiteiros são Índia, Paquistão, China, Egito e Nepal. No Paquistão, Egito e Nepal, há mais búfalos leiteiros do que vacas leiteiras. Os maiores produtores de leite de búfala são a Índia e o Paquistão, onde os búfalos produzem mais leite que o gado. Normalmente, os búfalos produzem entre 1.500 e 4.500 litros de leite por lactação. Eles têm uma vida produtiva significativamente mais longa do que o gado, fornecendo bezerros e leite até os 20 anos de idade. Nas últimas décadas, programas de criação, especialmente na Bulgária, China, Egito, Índia e Paquistão, tentaram melhorar a produção de leite do búfalo do rio. Bem conhecidas raças de búfalos leiteiros especializados incluem: Murrah, Nilli-Ravi, Kundi, Surti, Jaffarabadi, Bhadawari e Mehsana. (FAO, 2021)

A produção mundial de leite bubalino em 2014 foi da ordem de 107,7 milhões de toneladas, sendo o continente asiático o maior produtor com cerca de 104,6 milhões de toneladas. Sendo a Índia responsável por produzir cerca de 74,7 milhões de toneladas de leite, mais de metade da produção mundial, seguido pelo Paquistão, China e Egito com 25,0; 3,1 e 2,9 milhões de toneladas, respectivamente (MELO, 2017)

2.4 BUBALINOCULTURA E SUA SITUAÇÃO NO BRASIL

A aquisição, no Brasil, inicialmente foi motivada pelo seu exotismo e não pelas suas qualidades zootécnicas. Apenas em 1962 e 1986 foram importados animais puros e selecionados respectivamente da Itália e da Índia (SANTIAGO, 2000; BERNARDES, 2007). Acredita-se que os primeiros Búfalos teriam entrado na Amazônia, em torno de 1890, trazidos por condenados foragidos da Guiana Francesa em um barco que aportou na costa norte da Ilha do Marajó. Seriam da variedade Maláia ou da China, mas provenientes de Ilha do Caribe ou das Guianas, onde foram introduzidos pelos colonizadores ingleses e holandeses. Contudo, a mais remota entrada que se tem confirmado, é de uma importação por volta de 1902 para uma fazenda às margens do rio Ararí na Ilha do Marajó, de búfalos de procedência italiana (ABCB, 2016).

Uma das principais ações para organização da cadeia produtiva da Bubalinocultura foi a criação da Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, fundada em 21 de abril de 1960, com o objetivo de incentivar a bubalinocultura no país, por meio da organização dos principais interesses

dos produtores de búfalos além do aprimoramento técnico-científico na criação de bubalino (ABCB, 2021).

O Brasil se encontra em posição bastante privilegiada com relação à bubalinocultura posto que detém o maior rebanho da espécie no Ocidente, dispõe de exemplares com produtividade comparável aos melhores espécimes e, no segmento de corte, a exemplo dos zebuínos, já dispõe de animais com performances bem mais expressivas que as existentes nos países de origem onde a atividade é relativamente pouco explorada (BERNARDES, 2007).

O búfalo usualmente é criado em pequenas e médias propriedades, grandes rebanhos são encontrados principalmente na região Norte (BERNARDES, 2007). O rebanho bubalino efetivo no Brasil é de 1,5 milhões de cabeças. Sendo o estado do Pará responsável por cerca de 40% do rebanho efetivo brasileiro, seguido do Amapá com 20% e São Paulo com 7%. O estado do Rio Grande do Sul possui um rebanho efetivo de 48 mil cabeças, representando 3% do rebanho nacional (IBGE, 2020).

No Brasil ocorrem muitas situações onde o registro de bubalinos se confunde com o de bovinos, como resultado disso a dimensão real do rebanho bubalino parece subestimada. Em 2007 quando o rebanho foi estimado pelo IBGE como sendo de 1,2 milhões de cabeças, a ABCB calculava, por levantamentos indiretos e avaliações de abate e desfrute, que o rebanho bubalino brasileiro atingia cerca de 3,5 milhões de animais. (BERNARDES, 2007)

No país, os búfalos são explorados em sua maioria para a produção de carne. Apesar disso, existem poucas regiões em que a cadeia comercial do produto se encontra plenamente organizada, usualmente os bubalinos abatidos são comercializados como se fossem bovinos. Apesar de produzirem uma carne de excelente qualidade organoléptica e reconhecidas características nutricionais, a relativa desorganização deste mercado, não tem permitido que os criadores transformem tais características em preço e liquidez. (BERNARDES, 2007)

Dentre as aptidões produtivas dos búfalos, a produção leiteira é a que mais se destaca devido às características dos componentes do leite, como gordura, que elevam o rendimento industrial quando este é utilizado para elaboração de derivados (BASTIANETTO et al., 2005). Segundo Seno et al. (2007) e Vieira et al. (2009), a transformação do leite em derivados é mais lucrativa para o produtor, podendo chegar a um aumento do lucro na faixa de 580%. Estima-se que a produção de leite de búfalas no País seja de 92,3 milhões de litros, produzidos por cerca de 82.000 búfalas em 2.500 rebanhos e que existam pelo menos 150 indústrias produzindo derivados de leite de búfalas. É observado que fundamentalmente grande parte da produção leiteira no Brasil vem sendo

explorada por pequenos produtores, com baixo uso de tecnologia ou intensificação e geralmente como atividade complementar a outras atividades agropecuárias. (BERNARDES, 2007)

Em muitas localidades, especialmente no Centro-Sul, pequenos rebanhos bubalinos são formados aleatoriamente, como animais obtidos de diversas fontes, sem controle de sua genealogia. Permanecem, em geral, como atividade secundária à bovinocultura e, ao longo do tempo, as referências de sua formação se perdem. (ANDRADE; GARCIA, 2005)

Segundo Bernardes (2007), um dos grandes desafios que se verifica na bubalinocultura brasileira na atualidade reside na busca da implementação, da melhor organização e do estabelecimento de um maior equilíbrio nas cadeias comerciais de seus derivados, seja na carne, ainda muito incipiente, seja no leite, em que a distribuição da rentabilidade concentra-se hoje principalmente nos setores de distribuição em detrimento da produção primária e de insumos.

2.5 RAÇAS BUBALINAS NO BRASIL

Os búfalos são classificados de maneira sistemática, seguindo algumas características morfológicas raciais como da distribuição dos pelos no corpo, tamanho da cabeça e orelhas, e principalmente pelas características anatômicas dos chifres. De acordo com a ABCB, no Brasil são registradas quatro raças bubalinas (*B. bubalis*) (Fig. 1), descritas na Tabela 2. Nas quais são diferenciadas de acordo com as características relacionadas a cada raça. Existindo o padrão racial estabelecido pela ABCB, no qual é controlado por técnicos especializados e devidamente credenciado, após passar por análise de um conselho deliberativo técnico (ABCB, 2021).

Tabela 2. Raças registradas da espécie *Bubalus bubalis* no Brasil e suas aptidões produtivas

Raça	Origem	Aptidões produtivas
<i>B. bubalis bubalis</i> 2n=50		
MURRAH	Índia	Leite
JAFARABADI	Índia	Leite e carne
MEDITERRÂNEA	Itália	Leite e carne
<i>B. bubalis carabanensis</i> 2n=48		
CARABAO	África e Ásia	Carne e tração

Fonte: ANDRADE; GARCIA, 2005.

Figura 1 - Raças bubalinas criadas no Brasil



MURRAH



JAFARABADI



MEDITERRÂNEA



CARABAO

Fonte: Andrade; Garcia, 2005

2.5.1 Murrah

Originária do Noroeste da Índia, mais precisamente do Estado de Punjab e da cidade de Delhi. Seu nome significa espiral, no qual refere-se a forma de seus cornos. A raça possui pele e pelos de coloração negro-azeviche, cabeça leve e chifres curtos, espiralados, enrodilhando-se em anéis na altura do crânio (CARRAZZONI, 1993). A altura média nas fêmeas adultas é de 132 cm e peso médio 550 kg, os machos possuem altura média 140 cm e peso médio 750 kg. Animais com corpo curto, reto e profundo com conformação média e compacta. Membros curtos, grossos, corretamente aprumados e com unhas pretas. Dentre as raças bubalinas é considerada a de melhor aptidão leiteira em razão de sua conformação e temperamento dócil (ANDRADE; GARCIA, 2005; CAVALI;

PEREIRA, 2020). No Brasil, os animais da raça Murrah, se distribuíram por todas as regiões do país (MANO FILHO, 1985).

Contudo, devido aos primeiros rebanhos bubalinos dessa raça no Brasil terem uma base genética bastante estreita, em muitos casos, para resolver este problema foi priorizado o cruzamento entre raças. Essa mistura conferiu uma variabilidade que muitas vezes é observada na conformação corporal desses animais, caracterizando-se como uma variedade distinta (COSTA, 2015).

2.5.2 Mediterrâneo

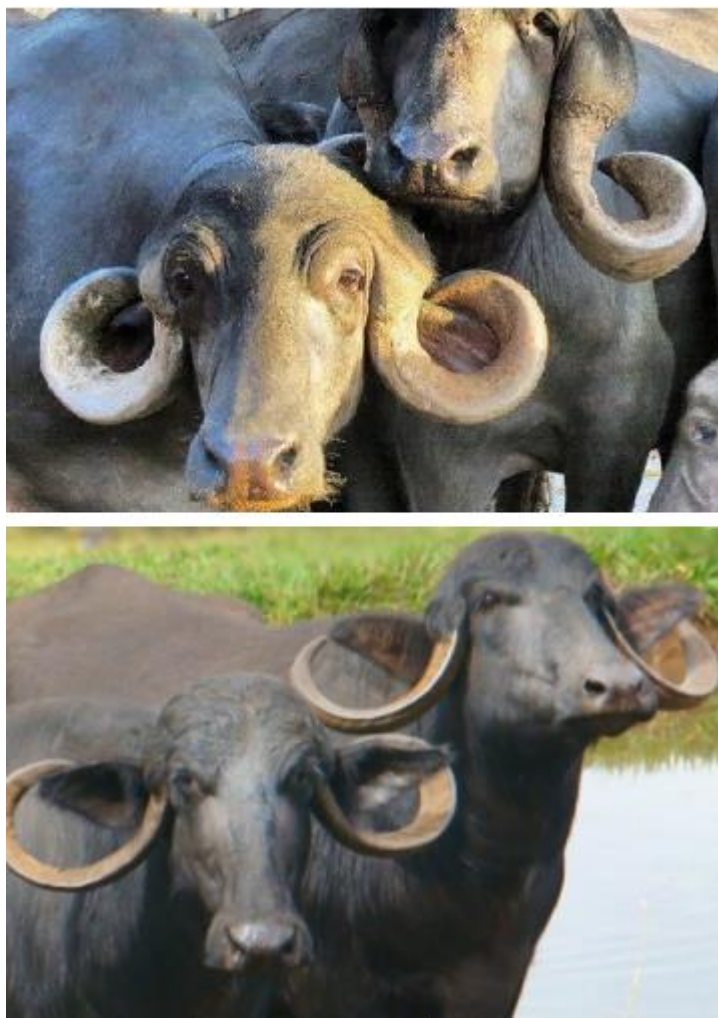
Os animais dessa raça no Brasil são descendentes de indivíduos importados na Itália, sendo utilizada tanto para a produção de leite como para a produção de carne, considerada de dupla aptidão. Atualmente a raça está sendo utilizada principalmente para a produção de carne, tendo os pesos médios dos animais em torno de 750 kg para machos e 550 kg para as fêmeas (PEREIRA et al., 1996; ANDRADE; GARCIA, 2005). Por serem de origem italiana, são conhecidos por búfalo preto ou italiano, com aparência intermediária entre as raças Murrah e Jafarabadi (Fig. 1) (MARQUES, 2000).

Apresentam pelagem e pele totalmente pretas, estendendo-se também aos chifres e os pelos são mais abundantes nos indivíduos mais novos. São animais de porte médio e medianos, com chifres longos, fortes e grossos, dirigidos para trás e para o alto terminando em forma semicircular ou de lira. Podem possuir coloração negra, cinza ou marrom, não sendo aceito manchas brancas. Possui corpo largo em relação ao comprimento. Pernas curtas e robustas. Cabeça longa e estreita com cornos em tamanho médio. (ANDRADE; GARCIA, 2005; COELHO, 2019)

2.5.3 Jafarabadi

A raça Jafarabadi é originária da Floresta do Gir, península Kathiavar, no oeste da Índia. A cidade de Jafarabadi deu origem ao nome dessa raça. É caracterizada pela cor negra, corpo mais longo que a raça Murrah, e pela forma peculiar da cabeça e chifres longos e caídos, com duas variedades bem distintas, a Gir e a Palitana, a primeira um animal mais delicado com ossatura leve e a segunda de ossatura mais pesada com bolsa de gordura acima dos olhos (Fig. 2) (MARQUES, 2000; COELHO, 2019).

Figura 2 - Variedades da raça Jafarabadi: Palitana e Gir, respectivamente



Fonte: ASCRIBU, 2018 e zoovetesmpasion.com.

Seus cornos são pesados e longos e tendem a ir até abaixo da direção dos olhos, terminando em formato espiralado para trás. Essa raça é a maior, quando comparada às demais. Apresenta aptidão tanto para carne quanto para leite. Os machos chegam a atingir o peso de 1.500 kg e as fêmeas 900 kg (COELHO, 2019). São animais de grande porte e considerados de aptidão mista, produção de carne e leite, apresentando pelos pretos em todo o corpo (ANDRADE; GARCIA, 2005). Uma dificuldade encontrada para sua criação está na alimentação mais exigente, devido ao seu maior porte (MANO FILHO, 1985).

2.5.4 Carabao

Este animal é originário da Indochina, no Sudeste da Ásia, onde é chamado o “trator do Oriente” (BERNARDES, 2007). O termo *Carabao* tem origem malaia (kerbao) e refere-se à pequena ilha de Kalabaw, na Baía de Manila, nas Filipinas (COCKRILL, 1974). É conhecido

também como búfalo do Pântano por ser considerado a raça mais adaptada às regiões alagadas e pantanosas e, por isto, apresenta pelagem mais clara. Suas principais características são os chifres largos e abertos, com corte transversal triangular e que fazem um ângulo de 90° aos afastarem da cabeça. São da cor cinza-parda ou rosilho, com manchas brancas na pata em forma de colar. Possui corpo curto e ventre largo, sendo um animal maciço e compacto. Devido a sua rusticidade, essa raça é usada para corte e para trabalho, tanto de tração agrícola quanto de transporte de carga e de sela. Os machos adultos podem chegar até 800 kg e as fêmeas adultas à 600 kg. Possuem porte médio a grande. (ANDRADE; GARCIA, 2005)

Búfalos da raça Carabao são encontrados principalmente na região Norte e destinam-se para produção de carne e também como animal de força e trabalho (ANDRADE; GARCIA, 2005). Essa variedade de Búfalo está em risco de extinção no Brasil, os búfalos da raça Carabao são mantidos em um programa de conservação genética que visa conservar seu patrimônio genético *in situ* e *ex situ*. Indivíduos puros desses animais são encontrados apenas em algumas criações, mantidas principalmente pela EMBRAPA (MARQUES et al., 2003; BARBOSA, 2005; ALBUQUERQUE et al., 2006).

2.5.5 Variedade tipo Baio

Esta variedade no Brasil apresenta um efetivo com poucos animais, um grupo genético com alto risco de extinção e/ou descaracterização. Apresenta cariótipo $2n=50$ cromossomos se caracterizando como *B. bubalis bubalis* (búfalo de rio) (FISCHER & ULBRICH, 1968). Não há padrão racial definido para o tipo Baio pela Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, por não ser reconhecida como uma raça. O peso médio nas fêmeas é de 500 kg e nos machos é 650 kg. Ele tem chifre em forma de caracol e a característica principal desta variedade, como o próprio nome sugere, é a pelagem baia, um castanho meio amarelado (Fig. 3) (GLOBO RURAL; GLOBO AMAZÔNIA, 2010).

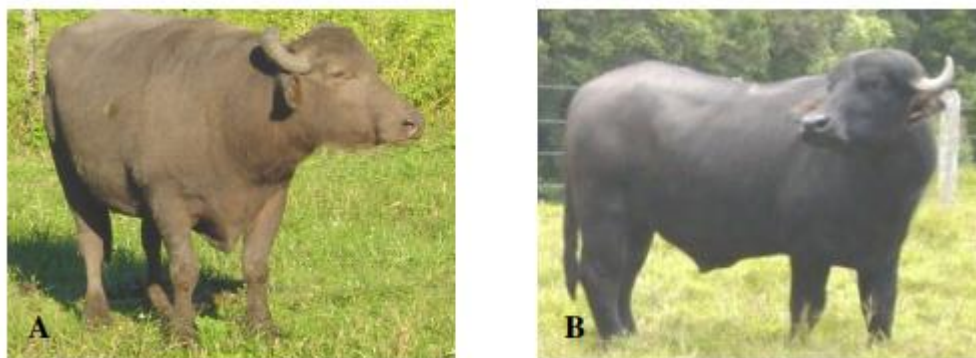
Figura 3 - Búfalos da Ilha do Marajó



. Fonte: Reprodução TV Globo

Os animais do Tipo Baio apresentam semelhanças com o búfalo da região nordeste da Índia descrito como sendo da Variedade *fulvus*, no entanto não há comprovação científica sobre isso (MARQUES et al., 2017). Além disso, essa variedade também apresenta semelhanças com a raça Murrah, diferindo apenas na coloração da pelagem (MARQUES et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2006) (Fig. 4). Porém, estudos realizados no bubalinos com marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) resultou numa divergência genética de 20,42% entre o tipo Baio e a raça Murrah, contrariando a hipótese do tipo Baio pertencer ao grupo Murrah (ALBUQUERQUE, 2005).

Figura 4 - Semelhanças e diferenças fenotípicas entre o Tipo Baio (A) e a raça Murrah (B)



Fonte: REIMCHE, 2010.

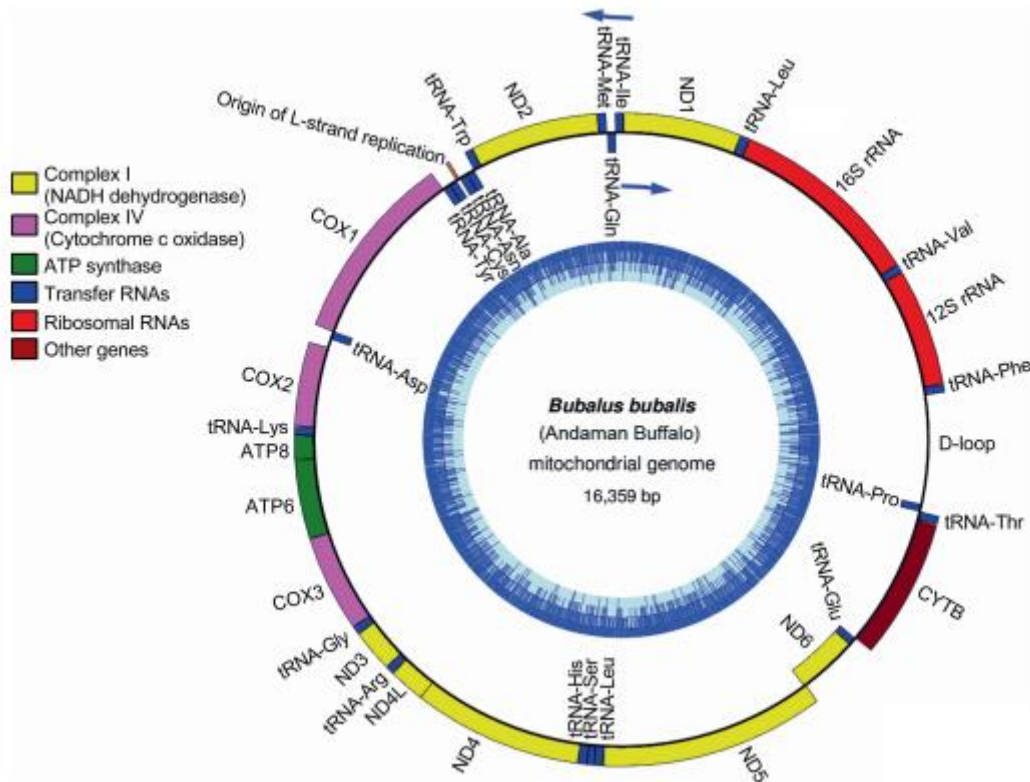
Assim como os animais da raça Carabao, os animais tipo Baio também são mantidos em conservação na ilha do Marajó, onde ambos constituem pequenas populações, com um número muito reduzido de exemplares. Apesar de possuírem números cromossômicos diferentes, os búfalos de rio e de pântano podem cruzar entre si, gerando um híbrido F1 fenotipicamente similar aos búfalos de pântano. A hibridização entre estas duas variedades: Carabao ($2n=48$) e tipo Baio ($2n=50$), resulta em exemplares férteis com $2n=49$ que apresentam na descendência a formação de animais $2n=48$, 49 ou 50 . (DEGRANDI, 2013)

2.6 DNA MITOCONDRIAL

Além do genoma nuclear, os Búfalos, assim como todos Eucariotos, possuem também um genoma organelar, independente do nuclear, denominado DNA mitocondrial (DNAMt), e está presente nas mitocôndrias. Por ser um genoma organelar apresenta um padrão de herança uniparental, onde a progênie herda os genes de organelas exclusivamente de um dos genitores, mas não do outro. No DNA mitocondrial, na maior parte dos casos, o genitor é a mãe, um padrão denominado herança materna. (GRIFFITHS et al., 2019)

O DNA mitocondrial animal é uma molécula de fita dupla circular que codifica cerca de 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria. O DNA mitocondrial dos búfalos tem cerca de 16.359 de comprimento (Fig. 5), esse padrão de comprimento é observado em várias raças de búfalos relatadas na literatura (PARMA et al. 2004; WANG et al. 2017; KUMAR DE et al., 2019). O genoma mitocondrial completo do búfalo codifica um total de 37 genes, dos quais 13 são PCGs, 22 tRNA e dois genes rRNA, além de uma região controladora rica em AT (D-loop), que é tipicamente observado em vertebrados (SARVANI et al., 2018; KUMAR DE et al., 2019).

Figura 5 - Representação gráfica da organização completa do genoma mitocondrial do búfalo de Andaman



Fonte: KUMAR DE et al., 2019.

Uma característica marcante do DNAm é a sua alta taxa de evolução, quando comparada às taxas de evolução do DNA nuclear, fazendo do DNAm um importante marcador para estudos de elucidação da relação evolutiva entre indivíduos, espécies e populações (MATIOLLI, 2001).

O sequenciamento de genes mitocondriais é a ferramenta molecular mais sensível, disponível até o presente. As regiões do genoma mitocondrial evoluem em diferentes taxas, o que permite escolhas específicas, dependendo das questões a serem abordadas. Regiões como o citocromo *b* (*cyt b*) e citocromo oxidase I (COI), são geralmente utilizadas em estudos de variabilidade genética e filogenia molecular. (ANVISE, 2000; TOBE; LINACRE, 2008)

2.6.1 Citocromo *b*

O citocromo *b* (*cyt b*) é a subunidade catalítica central da ubiquinol citocromo *c* reductase, um gene mitocondrial, com cerca de 1.143 pb, responsável por codificar a apoenzima citocromo *b* (Cob) permitindo a liberação gradativa de energia que está presente na cadeia respiratória, todos os

organismos eucariotos necessitam do citocromo b para a conversão de energia. (MEYER, 1994; BOORE, 1999).

O uso deste marcador mitocondrial se justifica pela taxa mutacional mais elevada que outros genes mitocondriais comumente usados e presença de regiões conservadas, as quais contêm sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos, inclusive em táxons intimamente relacionados. Sendo este considerado excelente marcador molecular em estudos sobre a biologia evolutiva das espécies. (KOCHER et al, 1989; PESOLE et al., 1999; RANDI et al., 2001; SATISH et al., 2009; GUPTA et al., 2012; ORREGO, 2012)

2.6.2 Citocromo c oxidase I

A subunidade I da citocromo c oxidase é uma das três subunidades codificadas pelo DNA mitocondrial do complexo respiratório IV, uma grande proteína transmembrana, altamente conservada entre as espécies, que desempenha a fosforilação oxidativa para o metabolismo. Este gene tem cerca de 1.542 pb e é frequentemente usado pois possui vantagens como a possibilidade de utilização de um primer universal para a maioria dos animais, maiores taxas de sinal filogenético e evolução que auxiliam na discriminação de grupos muito próximos (FOLMER et al., 1994; WARES; CUNNINGHAM, 2001; HEBERT et al., 2003; WAUGH, 2007).

O COI é reconhecido pelo método do DNA Barcode proposto por Herbert et al. (2003), uma ferramenta de identificação que utiliza um curto segmento padronizado de aproximadamente de 648 pares de bases da extremidade 5' do gene. Essa sequência nucleotídica do COI seria suficiente para distinguir indivíduos de uma mesma espécie, devido a variação genética entre espécies ser maior do que a variação dentro das espécies.

2.7 O ESTUDO DA FILOGENIA MOLECULAR

A filogenia molecular é um ramo da filogenia que analisa as diferenças moleculares hereditárias, principalmente nas sequências de DNA, para obter informações sobre as relações evolutivas entre os organismos. O resultado de uma análise de filogenia molecular expressa-se numa árvore filogenética, e a qualidade dessa estimativa vai depender da qualidade da amostragem e das sequências amostradas (MATA et al., 2009; CALDART et al., 2016)

Para se trabalhar com reconstrução filogenética baseada em dados moleculares é preciso conhecer algumas propriedades das sequências a serem comparadas. Estas amostras necessariamente precisam ser homólogas, ou seja, apresentar ancestralidade em comum. Apenas

sequências ortólogas poderão fornecer informações filogenéticas na história de organismos, quando as sequências têm um único e mesmo ancestral comum. (FERNANDES; MATIOLI, 2001)

Metodologias filogenéticas são essencialmente estatísticas e podem ser classificadas em dois grupos principais, de acordo com seus critérios: quantitativos (métodos de distância) ou qualitativos (métodos de parcimônia e verossimilhança). Um dos métodos mais empregados nos critérios qualitativos é a Máxima Verossimilhança (*Maximum-Likelihood*), ela baseia-se em modelos evolutivos explícitos de substituição de nucleotídeos, esses modelos são avaliados quanto a sua probabilidade de explicar um conjunto de dados de forma que reflita a história evolutiva mais verossímil. (FERNANDES; MATIOLI, 2001)

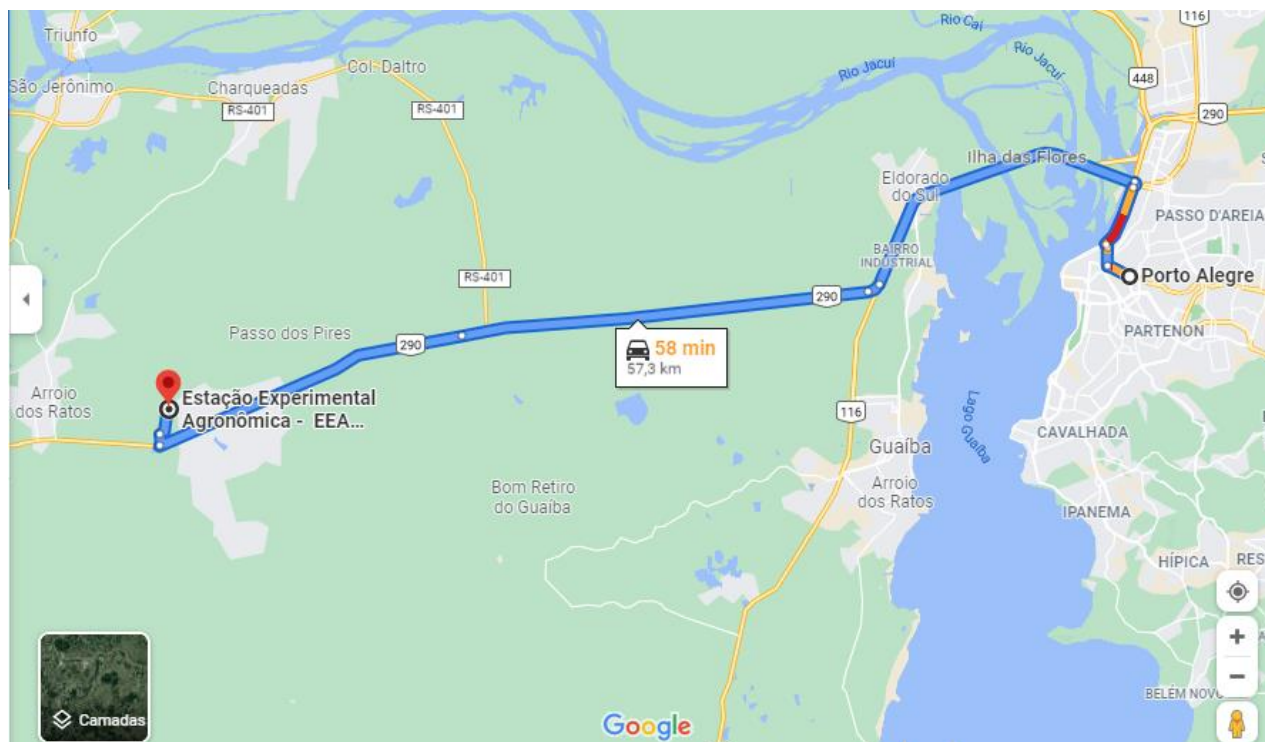
A análise do DNA mitocondrial é uma ferramenta importante para avaliar a origem materna e a filogenia de animais domésticos. Existem diversos trabalhos utilizando sequenciamento de genomas mitocondriais para realizar a análise filogenética de espécies e raças bubalinas (TANAKA et al., 1996; KIKKAWA et al., 1997; LAU et al., 1998; KUMAR et al., 2007; LEI et al., 2011; AMIN et al., 2015; MISHRA et al., 2015; LI et al., 2020; YOUSSEF et al., 2021), e que utilizam a metodologia de Máxima Verossimilhança (*Maximum-Likelihood*) (YUE et al., 2013; PÉREZ-PERDAL et al., 2017; WANG et al., 2017; SUN et al., 2020; SUN et al., 2020).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras deste trabalho incluem material biológico do rebanho bubalino pertencente à Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA- UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul - RS, uma distância de 57 km do Centro Histórico da capital de Porto Alegre (Fig. 6).

Figura 6 - Localização da EEA UFRGS em relação ao Centro Histórico de Porto Alegre



• Fonte: Google Maps (acessado em: 01 nov. 2021)

O rebanho estudado é composto por 30 animais (Fig. 7), sendo em sua maioria de raça indefinida (mestiços) como representado na Tabela 3. Para amostragem, foi coletado cerca de 2 ml de sangue dos animais. A coleta foi realizada via veia caudal ou mamária, o sangue foi depositado em tubos de EDTA (Fig. 8), devidamente identificados com o número do brinco de cada animal e o número do tubo. Os tubos foram armazenados em caixa de isopor refrigerada e transportada até o laboratório para a realização da extração de DNA.

O material que foi utilizado é o mesmo que está vinculado aos projetos: N° 40325 intitulado “Fêmeas bubalinas da raça Mediterrâneo x Murrah mantidos em Campo Nativo e MG 12 Paredão na região da Depressão Central do Rio Grande do Sul” e N° 38119 intitulado “Proteínas alergênicas do leite: estudo exploratório sobre a beta-caseína A1 e A2 em búfalos leiteiros, ambos sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Figura 7 - Rebanho bubalino da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Fonte: GEBU, 2021.

Tabela 3. Caracterização das amostras e suas respectivas raças

Tabela de identificação das amostras			
Amostra	Sexo	Mãe	Raça
Z006-1	Fêmea		Indefinida
Z001-2	Fêmea		Indefinida
T357-3	Macho		Murrah
Z002-4	Fêmea		Indefinida
Z009-5	Fêmea		Indefinida
Z007-7	Fêmea		Indefinida
A011-8	Macho	Z001	Indefinida
Z008-9	Fêmea		Indefinida
Z003-10	Fêmea		Indefinida
A010-11	Macho	Z002	Indefinida

Z004-12	Fêmea		Indefinida
B033-13	Fêmea		Mediterrâneo
B023-14	Fêmea	Z011	Indefinida
Z010-15	Fêmea		Murrah
B027-16	Fêmea	Z003	Mediterrâneo
B025-17	Fêmea	Z012	Indefinida
B026-18	Macho	Z001	Indefinida
A017-19	Fêmea	Z007	Indefinida
A014-20	Fêmea	Z002	Indefinida
A019-21	Fêmea	Z006	Indefinida
Z011-22	Fêmea		Murrah PO
A015-23	Fêmea	Z012	Murrah
A016-24	Fêmea	Z003	Indefinida
Z012-25	Fêmea		Murrah
B031-26	Fêmea	Z009	Indefinida
B024-27	Macho	Z004	Mediterrâneo
A022-28	Fêmea	Z008	Indefinida
A013-29	Fêmea	Z010	Murrah
A018-30	Fêmea	Z005	Indefinida

Fonte: Do autor, 2021

Para o gene mitocondrial *cyt b* foram adicionadas 29 sequências e para o COI foram adicionadas 18 sequências, todas disponíveis no *Genbank* (Tabela 4).

Tabela 4. Identificação das sequências provenientes do Genbank e seus respectivos números de acesso

Espécies- nome popular - raça	Número de acesso	
	Cytb	COI
Bubalus arnee – Búfalo asiático selvagem	D32193	NC_057438
Bubalus bubalis – Búfalo asiático doméstico	NC_049568	NC_049568

Bubalus bubalis - Andaman	MK234704	MK234704
Bubalus bubalis carabanensis – Búfalo asiático do pântano	NC_006295	NC_006295
Bubalus bubalis carabanensis - Haikou	AY702618	AY702618
Bubalus bubalis - Fuzhong	MTI86720	MTI86720
	MN756623	MN756623
Bubalus bubalis - Fuling	KX758298	KX758298
Bubalus bubalis - Jafarabadi	SAMN00004269	SAMN00004269
Bubalus bubalis – Mediterraneo	MN756622	MN756622
	SAMN08640746	SAMN08640746
Bubalus bubalis - Murrah	MN488587	MN488587
	SAMN00008878	SAMN00008878
Bubalus bubalis – Nili-Ravi	MN481528	MN481528
	EU807964	
	EU807963	
	JF946525	
	JF946524	
	JF946523	
	JF946522	
	JF946521	
	JF946520	
	JF946519	
Bubalus bubalis - Xilin	MT186743	MT186743
Bubalus depressicornis – Búfalo anão da planície	EF536351	EF536351
	D82890	
Bubalus mindorensis – Búfalo anão de Mindoro	D82895	
Bubalus quarlesi – Búfalo anão da montanha	D82891	MK995024
Syncerus caffer – Búfalo africano	NC_020617	NC_020617

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA foi extraído do sangue coletado no Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS, através do protocolo do kit de extração da PureLink Genomic DNA (Invitrogen, Life Technologies) (Fig. 8), seguindo instruções do fabricante. A integridade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%.

Figura 8 - Tubos de EDTA com as amostras de sangue juntamente com o kit da Invitrogen para iniciar a extração de DNA



Fonte: Do autor, 2021.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES CITOCROMO *B* E COI

O gene mitocondrial *cyt b* (1,140 pb) foi amplificado utilizando os primers iniciadores: MVZ05 (5' CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG 3') e MVZ23 (5' TACTCTCTTCCTCCACGAAACAGGNTC 3'); os primers reversos: MVZ16 (5' AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTTRAT 3') e MVZ14 (5' TTCATCTCCGGTTTACAAGAC 3') desenvolvidos por Smith and Patton (1993). Estes primers formam dois conjuntos utilizados: MVZ05-MVZ16, amplificando cerca de 800 pb, e MVZ23-MVZ14 amplificando cerca de 600 pb.

A fase de amplificação parcial (631 pb) do gene COI foi realizada utilizando o conjunto de primers: iniciador LCO1490 (5' GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3') e reverso

HCO2198 (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3') desenvolvidos por Folmer e colaboradores (1994).

Para ambos os genes, o volume total das reações de PCR foi de 20 µL sob as seguintes condições: 12,7 µL de água destilada; 2 µL de tampão (10X), 1,5 µL de MgCl₂ (50mM); 0,2 µL MVZ05 ou MVZ23 (0,4pmol / µL) de cada iniciador e primers reversos 0,2 µL MVZ16 ou MVZ14 (0,4pmol / µL); 0,2 µL de dNTP (0,4 mM); 0,2µL de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 3 µL do DNA extraído (20 ng/ µL). O programa de amplificação de PCR (reação em cadeia da polimerase) incluiu: desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C, seguida por 35 ciclos de desnaturação de 15 segundos a 94 °C, anelamento de 30 segundos a 47 °C e extensão de 30 segundos a 72 °C, e uma extensão final de 7 minutos a 72 °C.

Os produtos de amplificação obtidos foram verificados em gel de agarose 1% com tampão TBE (Tris-borato-EDTA), corado com 2µL de azul bromofenol 3% contendo 1µL de GelRed (Biotium). As bandas de alto peso molecular foram reveladas e fotografadas sob luz UV para registro dos resultados positivos.

3.4 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR foram enviados a empresa Macrogen (Coréia do Sul) para purificação e sequenciamento em sequenciador automático com os mesmos primers iniciadores (MVZ05, MVZ023 e LCO 1490).

3.5 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

Os cromatogramas foram checados no programa *BioEdit* v7.2.5, posteriormente, editadas e alinhadas manualmente no MEGA 7 (TAMURA et al., 2013), juntamente com as sequências obtidas no *GenBank*

Nem todas as amostras (Tabela 3) foram incluídas nos alinhamentos para a realização das redes de haplótipos e reconstruções filogenéticas, em ambos os genes. Para o gene *cyt b* foram utilizadas 11 amostras no alinhamento e para o COI foram utilizadas 18 amostras (Tabela 5). Com o uso do DNA mitocondrial, e devido a esta informação genética ser herdada integralmente da progenitora, os genes mitocondriais da prole são cópias idênticas da sua progenitora. Este é um dos motivos para que algumas amostras não tenham sido incluídas nos alinhamentos, além deste, algumas amostras foram excluídas por apresentarem ruídos dificultando a leitura no cromatograma.

A amplificação do gene COI, no rebanho bubalino estudado, foi realizada a partir da posição 91 da fase de leitura dos nucleotídeos até a posição 722 do gene, totalizando em 631 pb. Como o início do gene não foi amplificado, esta informação foi perdida e o alinhamento foi realizado com todas as 37 sequências, do rebanho bubalino e das sequências obtidas no GenBank (Tabelas 4 e 5), a partir da posição 91 do alinhamento.

Tabela 5. Amostras que foram alinhadas e usadas para a reconstrução filogenética

Amostra	Gene(s)	Mãe	Raça
Z006-1	<i>Cyt b</i>		Indefinida
Z001-2	<i>Cyt b</i>		Indefinida
T357-3	COI		Murrah
Z002-4	COI		Indefinida
Z009-5	<i>Cyt b</i>		Indefinida
Z007-7	<i>Cyt b</i> ; COI		Indefinida
A011-8	COI	Z001	Indefinida
Z008-9	<i>Cyt b</i> ; COI		Indefinida
Z003-10	<i>Cyt b</i> ; COI		Indefinida
A010-11	COI	Z002	Indefinida
Z004-12	<i>Cyt b</i>		Indefinida
B033-13	COI		Mediterrâneo
B023-14	COI	Z011	Indefinida
Z010-15	<i>Cyt b</i> ; COI		Murrah
B027-16	COI	Z003	Mediterrâneo
B025-17	COI	Z012	Indefinida
B026-18	COI	Z001	Indefinida
A017-19		Z007	Indefinida
A014-20		Z002	Indefinida
A019-21	COI	Z006	Indefinida
Z011-22	<i>Cyt b</i>		Murrah PO
A015-23		Z012	Murrah

A016-24		Z003	Indefinida
Z012-25	Cyt <i>b</i> ; COI		Murrah
B031-26	COI	Z009	Indefinida
B024-27	COI	Z004	Mediterrâneo
A022-28		Z008	Indefinida
A013-29		Z010	Murrah
A018-30	Cyt <i>b</i> ; COI	Z005	Indefinida

Fonte: Do autor, 2021.

3.5.1 Diversidade Genética e Relações haplotípicas

Através dos softwares DnaSP v6 (*DNA Sequence Polymorphism*) (LIBRADO; ROZAS, 2009) e Arlequin 3.1 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2005) foram estimadas a diversidade haplotípica (H_d) e as frequências haplotípicas (H). As relações entre os haplótipos foram estimadas utilizando a abordagem por *median joining* (BANDELDT et al., 1999), implementada no programa Network 10.2.0.0 e por fim as redes de haplótipos foram editadas no programa PopART 1.7 (*Population Analysis with Reticulate Trees*) (LEIGH, JW; BRYANT D, 2015).

As relações haplotípicas foram realizadas em ambos os genes. A análise da sequência de 1.140 pb do gene mitocondrial *cyt b* de 39 indivíduos, foi dividida em 22 populações (Tabela 6). As relações entre os haplótipos do gene COI foi estimada utilizando 631 pb de 36 indivíduos e foram divididos entre 19 populações (Tabela 6).

Tabela 6. Divisão das populações dentro dos genes *cyt b* e COI

Populações	Amostras	
	Cytb	COI
B. arnee	D32193	NC_057438
B. bubalis	NC_049568	NC_049568
Andaman	MK234704	MK234704
Carabanensis	NC_006295	NC_006295
Haikou	AY702618	AY702618

Fuzhong a	MTI86720	MTI86720
Fuzhong b	MN756623	MN756623
Fuling	KX758298	KX758298
Jafarabadi	SAMN00004269	SAMN00004269
Mediterraneo a	MN756622	MN756622
Mediterraneo b	SAMN08640746	SAMN08640746
Murrah a	MN488587	MN488587
Murrah b	SAMN00008878	SAMN00008878
Nili-Ravi a	MN481528	MN481528
Nili-Ravi b	EU807964	
	EU807963	
Nili-Ravi c	JF946525	
	JF946524	
	JF946523	
	JF946522	
	JF946521	
	JF946520	
	JF946519	
Xilin	MT186743	MT186743
B. depressicornis a	EF536351	EF536351
B. depressicornis b	D82890	
B. mindorensis	D82895	
B. quarlesi	D82891	MK995024
Syncerus caffer	NC_020617	NC_020617
Rebanho EEA	Z006-1	
	Z001-2	
		T357-3
		Z002-4
	Z009-5	
	Z007-7	Z007-7
		A011-8
	Z008-9	Z008-9
	Z003-10	Z003-10
		A010-11
	Z004-12	
		B033-13
		B023-14
	Z010-15	Z010-15

	B027-16
	B025-17
	B026-18
	A019-21
Z011-22	
Z012-25	Z012-25
	B031-26
	B024-27
A018-30	A018-30

3.5.2 Reconstrução filogenética

A história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) baseado no modelo General Time Reversible (Nei M.; Kumar S., 2000). A confiabilidade da topologia da árvore foi avaliada em 1.000 replicações de bootstrap. Foram aplicados os algoritmos Neighbour-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando uma abordagem de Máxima Verossimilhança Composta (MCL). Uma distribuição Gama e evolutivamente invariável (G+I) foi usada para modelar as diferenças de taxa evolutiva com 5 categorias de taxa. As posições de códon incluídas foram 1^a + 2^a + 3^a + não codificantes. Todas as posições contendo lacunas e dados faltantes foram eliminadas. As análises evolutivas foram conduzidas utilizando o programa MEGA 7 (KUMAR et al., 2016).

Para enraizar a árvore de ambos os genes (*cyt b* e COI) foi utilizado a sequência do búfalo africano, *Syncerus caffer* com número de acesso no *GenBank*, para ambos os genes, NC_020617 (Tabela 4).

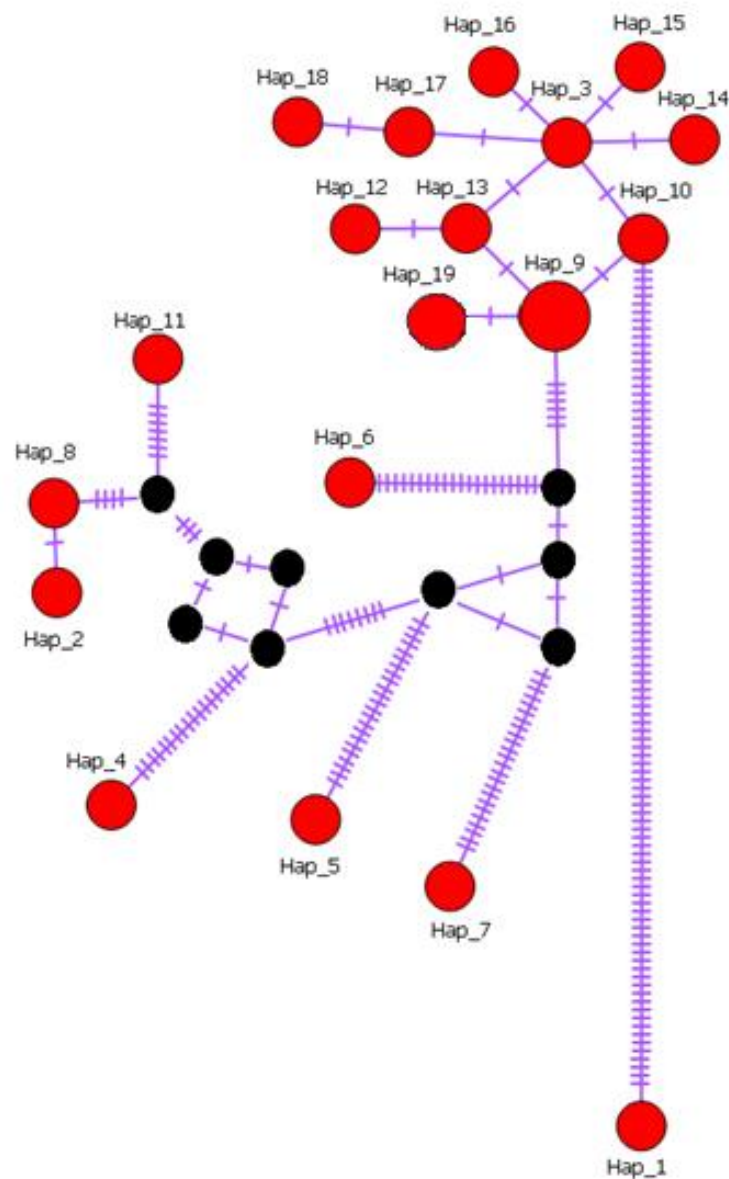
4 RESULTADOS

4.1 REDE DE HAPLÓTIPOS

As relações haplotípicas do gene *cyt b* resultou em 19 haplótipos, sendo estes definidos por 176 sítios polimórficos (Fig. 9). O haplótipo mais comum (H9) foi compartilhado entre 11 amostras das raças Murrah, Mediterrâneo, Nili-Ravi e indivíduos do rebanho estudado. O haplótipo H19 foi o segundo mais frequente, juntamente com o haplótipo H8, onde ambos foram compartilhados entre

5 amostras. O haplótipo H19 foi compartilhado apenas com indivíduos do rebanho estudado (Tabela 7). A diversidade haplotípica (Hd) total encontrada foi de 0,894 e a diversidade haplotípica dos indivíduos do rebanho da EEA apresentou um valor de 0,545.

Figura 9 - Relações haplotípicas observadas para as seqüências de um fragmento de 1.140 pb do gene mitocondrial *cyt b* de 39 indivíduos. O tamanho dos círculos vermelhos representam a frequência haplotípica. Os círculos em preto indicam os vetores médios



As relações entre os haplótipos do gene COI foi estimada, resultando em 9 haplótipos com 84 sítios polimórficos (Fig. 10). As amostras do rebanho de bubalinos da EEA não compartilharam

haplótipos com nenhum outro indivíduo. O haplótipo H9 foi compartilhado apenas entre os indivíduos da população do rebanho estudado (Tabela 7). A diversidade haplotípica (Hd) do rebanho estudado foi nula e a diversidade haplotípica total encontrada foi de 0,715.

Figura 10 - Rede de haplótipos construída a partir do gene mitocondrial parcial do COI com 631 pb, utilizando 36 indivíduos. O tamanho dos círculos legendados representam a frequência haplotípica. Os círculos menores, sem legenda, indicam os vetores

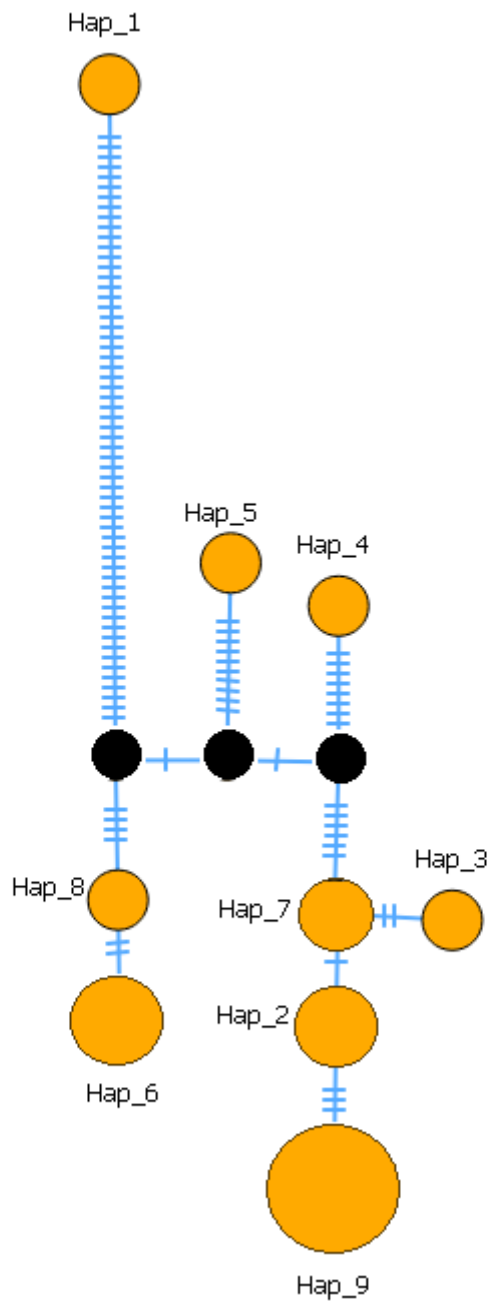


Tabela 7. Compartilhamento de haplótipos

Haplótipo	Cyt <i>b</i>	COI
H_1	<i>Syncerus caffer</i> (NC_020617)	<i>Syncerus caffer</i> (NC_020617)
H_2	<i>B. arnee</i> (D32193)	<i>B. arnee</i> (NC_057438), Murrah (SAMN00008878), Mediterranean (MN756622, SAMN08640746) e Nili-Ravi (MN481528).
H_3	<i>B. bubalis</i> (NC_049568)	<i>B. bubalis</i> (NC_049568)
H_4	<i>B. mindorensis</i> (D82895)	<i>B. depressicornis</i> (EF536351)
H_5	<i>B. depressicornis</i> (D82890)	<i>B. quarlesi</i> (MK995024)
H_6	<i>B. depressicornis</i> (EF536351)	<i>Carabanensis</i> (NC_006295), Fuzhong (MTI86720, MN756623), Murrah (MN488587), Haikou (AY702618) e Fuling (KX758298).
H_7	<i>B. quarlesi</i> (D82891)	Jaffrabadi (SAMN00004269) e Andaman (MK234704).
H_8	<i>Carabanensis</i> (NC_006295), Fuzhong (MTI86720, MN756623), Murrah (MN488587) e Haikou (AY702618).	Xilin (MT186743)
H_9	Murrah (SAMN00008878), Mediterranean (MN756622, SAMN08640746), Nili-Ravi (MN481528, EU807963) e RebanhoEEA (Z008-9, Z004-12, Z010-15, Z011-22, Z012-25, A018-30).	RebanhoEEA (T357-3, Z002-4, Z007-7, A011-8, Z008-9, Z003-10, A010-11, B033-13, B023-14, Z010-15, B027-16, A019-21, Z012-25, B031-26, B024-27 e A018-30).
H_10	Jaffrabadi (SAMN00004269), Andaman (MK234704) e Nili-Ravi (EU807964),	
H_11	Xilin (MT186743)	
H_12	Nili-Ravi (JF946525)	
H_13	Nili-Ravi (JF946524)	
H_14	Nili-Ravi (JF946523)	
H_15	Nili-Ravi (JF946522)	
H_16	Nili-Ravi (JF946521)	
H_17	Nili-Ravi (JF946520)	
H_18	Nili-Ravi (JF946519)	

H_19 RebanhoEEA (Z006-1, Z001-2, Z009-5,
Z007-7, Z003-10)

4.2 ÁRVORE FILOGENÉTICA

Foi encontrado em cinco amostras do rebanho estudado, nas sequências da leitura de bases de nucleotídeo, uma inserção de adenina na posição 692 do alinhamento do gene *cyt b* (Apêndice A, Fig. 11). Esta inserção não foi observada em nenhuma outra sequência do alinhamento, das sequências obtidas no *GenBank* e nem no restante dos indivíduos do rebanho bubalino da EEA.

Figura 11 - Inserção de adenina nas seqüências da leitura de nucleotídeos do gene *cyt b*, de cinco indivíduos do rebanho estudado

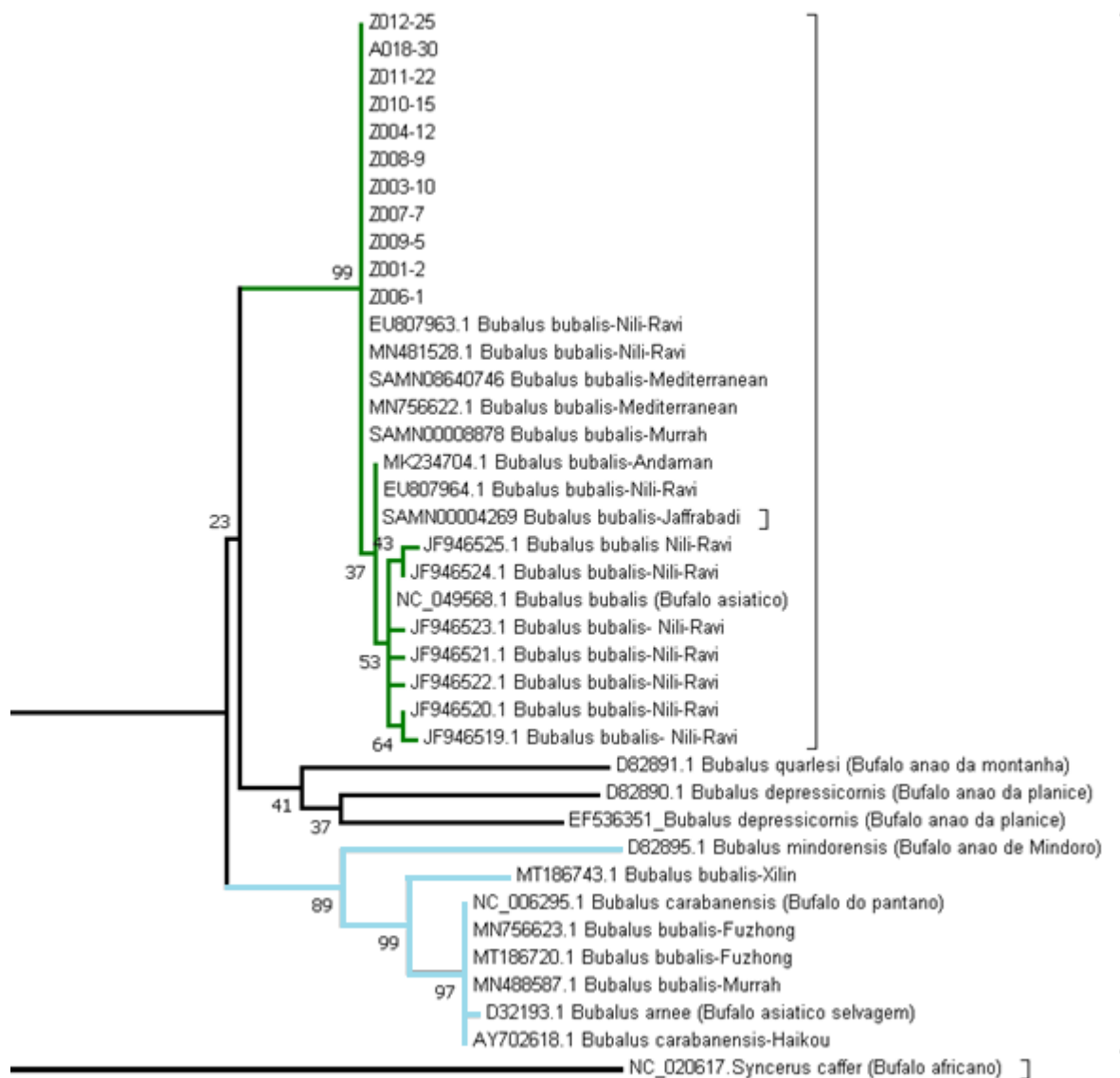
DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abl	Gro	*	*
9. MN75662		T	T
10. MT18674		T	T
11. MN4885		T	T
12. SAMN00		T	T
13. MN7566		T	T
14. SAMN08		T	T
15. SAMN00		T	T
16. AY70261		T	T
17. MK23471		T	T
18. MT18674		T	T
19. KX75829		T	T
20. MN4815		T	T
21. EU80791		T	T
22. EU80791		T	T
23. JF94652		T	T
24. JF94652		T	T
25. JF94652		T	T
26. JF94652		T	T
27. JF94652		T	T
28. JF94652		T	T
29. JF94651		T	T
30. Z006-1		T	T
31. Z001-2		T	T
32. Z009-5		T	T
33. Z007-7		T	T
34. Z003-10		T	T
35. Z008-9		T	T
36. Z004-12		T	T
37. Z010-15		T	T
38. Z011-22		T	T
39. Z012-25		T	T
40. A018-30		T	T

with w/o Gaps

A partir de seqüências do gene citocromo *b* (*cyt b*) e seqüências parciais do gene citocromo *c* oxidase I (COI) foram obtidas duas árvores filogenéticas.

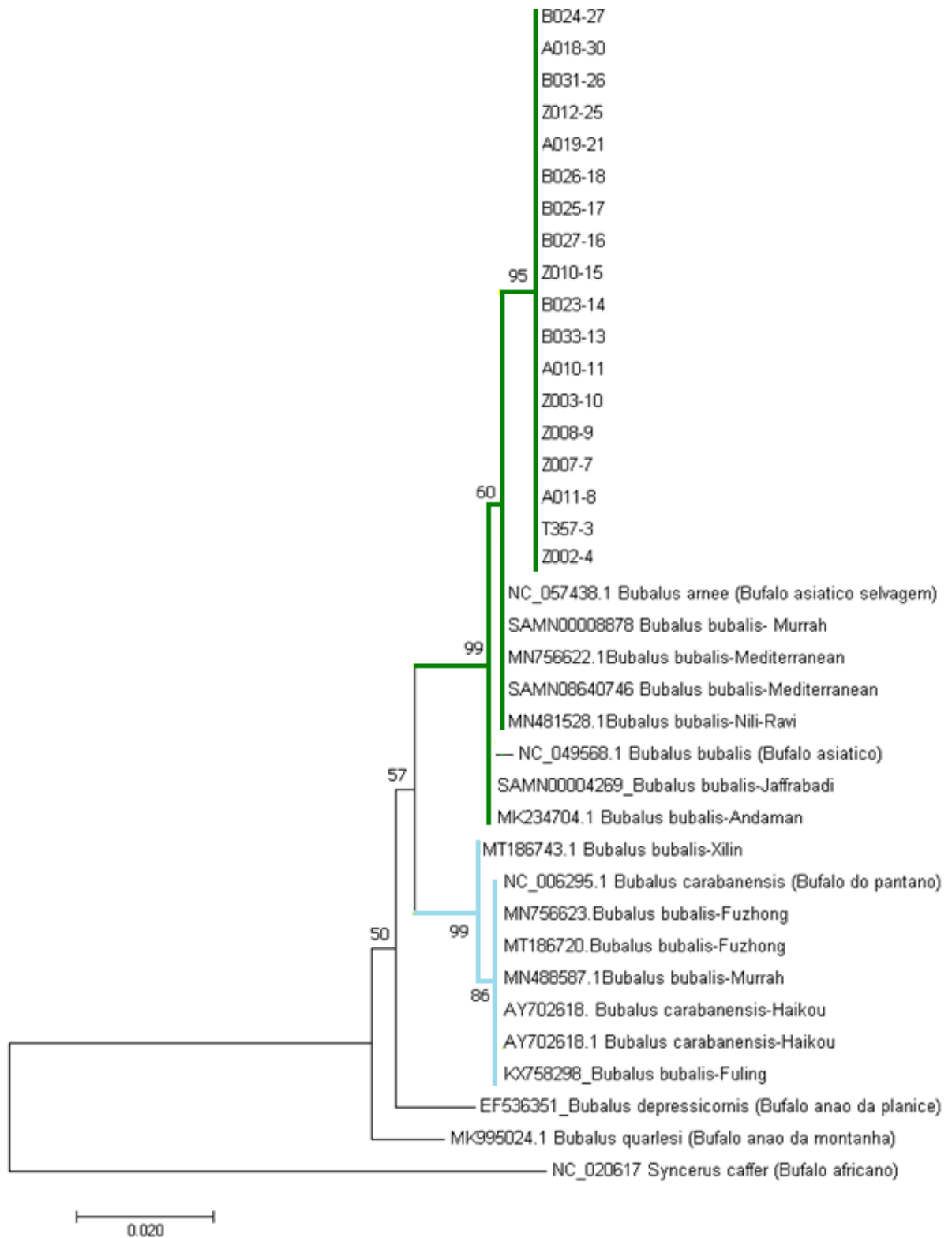
Dentro da filogenia proposta neste trabalho, utilizando o gene citocromo *b* (Fig. 12), foi possível observar a construção de três grupos: o primeiro, demarcado com a cor verde, búfalos-de-rerio (*B. bubalis bubalis*); o segundo, na cor preta e mais central, búfalos selvagens; e o terceiro, demarcado com a cor azul, na grande maioria, búfalos-de-pântano (*B. bubalis carabanensis*). Na reconstrução filogenética utilizando o *cyt b*, os indivíduos do rebanho de bubalinos da EEA se agruparam no mesmo clado, com alto suporte de ramo (0,99), que os espécimes das raças Nili-Ravi, Murrah e Mediterrâneo.

Figura 12 - Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança reconstruída com base em sequências do gene mitocondrial citocromo b (1.140 pb), utilizando 11 indivíduos do rebanho bubalino da EEA da UFRGS e 28 sequências do GenBank



Como resultado, na árvore filogenética consenso com base no gene parcial do COI (631 pb), um grupo foi formado apenas com os indivíduos do rebanho bubalino da EEA da UFRGS, se diferenciando, com valor de ramo significativo (0,95), das demais sequências obtidas pelo Genbank (Fig. 13). Além disso, pôde se observar dois grupos, com alto suporte de ramo (0,99): o primeiro, na cor verde, onde o rebanho estudado se agrupou com raças de búfalos-de-rio (*B. bubalis bubalis*) e búfalo asiático selvagem (*Bubalus arnee*); o segundo, na cor azul, agrupou em sua maioria raças de búfalos-de-pântano (*B. bubalis carabanensis*).

Figura 13 - Análise filogenética pelo método de máxima verossimilhança reconstruída com base em seqüências do gene mitocondrial citocromo c oxidase I (631 pb), utilizando 18 indivíduos do rebanho bubalino da EEA da UFRGS e 19 seqüências do GenBank



5 DISCUSSÃO

A diversidade haplotípica (*Hd*) do mtDNA é um importante índice para acessar polimorfismos populacionais e diferenciações genéticas (BRUFORD *et al.*, 2003). O gene parcial do COI com 631pb, apresentou apenas um haplótipo dentro dos indivíduos do rebanho estudado e com isso, variedade haplotípica nula. O gene *cyt b* se mostrou mais polimórfico e apresentou dois haplótipos dentro do grupo de animais da EEA, com variedade haplotípica de 0,545. Estes valores, quando comparados com as variedades haplotípicas totais encontradas, se mostraram baixas. O que pode ser explicado devido à falta de variabilidade genética dos primeiros rebanhos bubalinos no Brasil e a priorização do cruzamento entre as raças, em busca da ampliação da base genética destes rebanhos (COSTA, 2015).

A divergência nas redes haplotípicas entre *B. bubalis carabanensis* e *B. bubalis bubalis*, onde os alelos compartilhados entre indivíduos de raças da variedade do búfalo-do-pântano não ocorreram com indivíduos de raças da variedade do búfalo-do-rio, foi observada. Estes resultados ratificaram os estudos de Youssef e colaboradores (2020). Toda via, em ambas as análises, rede de haplótipos e árvores filogenéticas, a sequência do animal da raça Murrah com número de acesso MN488587, se agrupou com os indivíduos das raças pertencentes à variedade de búfalo-de-pântano, confirmando com o trabalho publicado por Li e colaboradores (2020). Diferente do observado neste e em estudos anteriores, onde os indivíduos de búfalo-do-pântano (*B. bubalis carabanensis*) sempre foram agrupados separadamente de indivíduos de búfalo-do-rio (*B. bubalis bubalis*) (TANAKA *et al.*, 1996; KIKKAWA *et al.*, 1997; LAU *et al.*, 1998; LEI *et al.*, 2007; KUMAR *et al.*, 2007; HUSSAIN *et al.*, 2009; SHAARI *et al.*, 2019). Este agrupamento incomum, búfalos-de-pântano e búfalos-de-rio, foi observado em animais mestiços, cruzamento entre machos da raça Murrah e fêmeas de búfalo-do-pântano (SHAARI *et al.*, 2019).

O mtDNA tem sido amplamente utilizado no estudo filogenético por ser herdado diretamente da mãe, portanto nenhuma alteração é feita na cópia que o torna uma ferramenta adequada para ser usada no estudo da relação de indivíduos na mesma espécie ou mesmo em espécies diferentes (SHAARI *et al.*, 2019). Neste estudo ambas as árvores apresentaram um panorama onde a linhagem matrilinear do rebanho bubalino estudado, quando comparados com as demais raças, tem origem similar a raças de *B. bubalis bubalis*, especialmente com alguns indivíduos das raças Mediterrâneo, Murrah e Nili-Ravi.

Apesar da raça Nili-Ravi não ter ocorrência no Brasil, os indivíduos do rebanho bubalino da EEA da UFRGS ficaram no mesmo clado, em ambas as filogenias, que alguns indivíduos da raça Nili-Ravi. Esta é uma raça de búfalo doméstico que está distribuído principalmente no Paquistão e

na Índia. É conhecido por ser uma raça semelhante à raça de búfalos Murrah e é criado principalmente para o uso leiteiro (MOIOLI; BORCHESE, 2005). Indicando assim que possivelmente houve uma introgressão do mt DNA de Nili-Ravi em alguns indivíduos da EEA.

A inserção de adenina no gene *cyt b*, observada em algumas amostras do rebanho da EEA, não foi encontrada em nenhum outro animal do gênero *Bubalus* utilizado neste estudo (Apêndice A, Fig.9), ela não se mostrou representativa a ponto de afetar a estruturação da árvore. Quando a inclusão de adenina foi excluída em uma nova análise, apenas houveram pequenas diferenças nos valores do ramo (Apêndice B).

A grande maioria das raças bubalinas reconhecidas no Brasil possuem características fisiológicas que as permitem produzir satisfatoriamente, tanto carne quanto leite (MARQUES, 2000). Ainda assim, a raça Murrah é a que tem maior demanda no país, por ser considerada de melhor aptidão leiteira em razão da sua conformação e de seu temperamento dócil (ZAVA, 1987; CAVALI; PEREIRA, 2020). Entretanto, no Brasil os programas de melhoramento genético são realizados por poucos criadores, conseqüentemente em um número pequeno de animais (SANTOS, 2019). Agregado a isso, muitos animais apresentam uma variabilidade em sua conformação corporal que difere daquelas exigidas nos padrões raciais, essa variedade distinta pode ser explicada pela possível introdução de genes da raça Mediterrâneo, para aumentar a base genética do rebanho Murrah no Brasil (MARQUES et al., 2003; COSTA, 2015). Com isso, assim como ocorre em outras espécies de animais de produção, algumas características exigidas no padrão racial são perdidas e estes indivíduos excluídos dos programas de melhoramento genético (SILVA et al., 2012), diminuindo o número de animais disponíveis para seleção visando características de interesse econômico. Em casos como estes, a utilização da genética molecular, pode ser um instrumento para identificação de animais que, se bem caracterizados, seriam mais interessantes para serem mantidos no rebanho como reprodutores (ROSA et al., 2013).

6 CONCLUSÃO

As árvores filogenéticas usando os genes *cyt b* e COI, apresentaram um panorama onde a linhagem matrilinear do rebanho bubalino analisado, quando comparada às demais raças, têm origem similar a alguns indivíduos das raças Mediterrâneo, Murrah e Nili-Ravi. Indicando que esta linhagem é mais semelhante aos indivíduos de raças de dupla aptidão ou aptidão leiteira, característica das raças reconhecidas no Brasil, da variedade do *B. bubalis bubalis*.

Foi possível identificar neste estudo uma escassez de sequências identificadas ao nível de raça, dentro da espécie bubalina, para ambos os genes, no *GenBank*. Como as amostras utilizadas nesse estudo são limitadas a poucos representantes de algumas raças de bubalinos, mais estudos abrangentes são necessários a este respeito para explorar melhor a filogenia desses animais.

Na intenção de um panorama da similaridade da linhagem matrilinear do rebanho analisado com as sequências incluídas no alinhamento, o gene parcial do COI com 631 pb, foi pouco informativo pois a região estudada não foi polimórfica. A busca por marcadores moleculares com regiões polimórficas dentro do grupo dos bubalinos, e a inclusão de uma maior amostragem de rebanhos brasileiros, se faz necessária para conseguir ter uma compreensão mais abrangente sobre a variabilidade genética e a estruturação das raças de búfalos no Brasil.

A identificação da origem dos bubalinos, principalmente de suas raças, é de suma importância, pois com o conhecimento da filogenia é possível melhorar a produtividade e auxiliar no redirecionamento dos rebanhos para a otimização de suas aptidões. Como perspectivas futuras devemos analisar a região controladora do DNAm_t visando encontrar, no rebanho da EEA-UFRGS, uma diversidade maior. Ao mesmo tempo estudar outros rebanhos para tentar obter um padrão genético do rebanho no sul do Brasil.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, M. S. M. et al. Conservação e caracterização de búfalos no Brasil: uma revisão da literatura. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (documentos 166).

ALBUQUERQUE, M. S. M. Marcadores moleculares e variabilidade genética em búfalos no Brasil. 111 f. Tese (Doutorado em Genética) - Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP, 2005.

ALDER, P., R. ESTES, D. SCHLITTER, B. MCBRIDE. 1995. National Audubon Society Field Guide to African Wildlife. New York: Chaticlerr Press.

AMANO T. (1983) Genetic differences between swamp and river buffaloes in biochemical and immunological characteristics. In: Proceedings of the Preconference Symposium of the 5th World Conference on Animal Production, Tsukuba, Japan (ed. by H. Shimizu), pp. 131–5.

ANDRADE, V. J., GARCIA, S. K. Padrões raciais e registro de bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.39-45, jan./mar. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. 2016. Disponível em: <https://www.bufalo.com.br/home/wp-content/uploads/2016/01/historico_bufalos.pdf> Acessado em: 5 set. 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **ABCB**. Disponível em: <<https://www.bufalo.com.br/home/acbc/>>. Acessado em: 5 set. 2021.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE BÚFALOS - ABCB. **ABCB**. Disponível em: <<https://www.bufalo.com.br/home/o-bufalo/>>. Acessado em: 5 set. 2021.

Associação Brasileira de Criadores de Búfalos - ABCB. Disponível em <<http://www.bufalo.com.br>>. Acesso em 28 de julho de 2021.

AVISE, J. C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 2000. 447p.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; ROHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, v.16, p. 37-48, 1999.

BARBOSA, N. G. S. Bubalinocultura no Estado do Pará. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.29, n.1, p.34-38, jan./mar. 2005.

BARKER J.S.F., MOORE S.S., HETZEL D.J.S., EVANS D., TAN S.G. & BYRNE K. (1997b) Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and a comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics* 28, 103–15.

BARKER J.S.F., TAN S.G., SELVARAJ O.S. & MUKHERJEE T.K. (1997a) Genetic variation within and relationships among populations of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics* 28, 1–13.

BASTIANETTO, L.; ESCRIVÃO, E.S.C.; OLIVEIRA, D.A.A. Influência das características reprodutivas da búfala na produção, composição e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.1, p. 49-52. 2005.

BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.293-298, 2007.

BIANCA MOIOLI, ANTONIO BORGHESE (2005). Buffalo Breeds and Management Systems. In Antonio Borghese (editor) (2005). Buffalo Production and Research. REU Technical Series 67. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Pages: 51–76.

BIOLIB, Biological Library. Available in: <<https://www.biolib.cz/en/taxon/id726111/>> Accessed in: 26 oct. 2021

BOORE, J. L. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, v.27, n. 8. 1767-1780, 1999.

BORGHESE, A. Buffalo Production and Research: Reu technical series. Roma: FAO, 2005, v.67, p.1-315.

BORGHESE, A.; TERZANO; MAZZI, M. Buffalo Breeding Development in Italy. Seminar: Dan Lokakarya Nasional, Kerbau, 2011.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**, Planaltina - DF, 2009. 33 p.

BRUFORD, M., BRADLEY, D. & LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. *Nat Rev Genet* 4, 900–910 (2003). <https://doi.org/10.1038/nrg1203>

CAMPOS M. A. S. F., GUILHERMINO M. M., FAÇANHA D. A. E., LARA M. A. C., RANGEL A. H. N. Caracterização genética de vacas leiteiras por meio de marcadores moleculares e suas implicações na composição e qualidade do leite. 2011. Dissertação (Mestrado em Produção Animal (Ufrn/ Ufersa)). Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

CARROLL, R. L. (1988) **Vertebrate Paleontology and Evolution**. W. H. Freeman and Company, New York.

CASSIANO, L.A.P.; MARIANTE, A.S.; MCMANUS, C. et al. Caracterização fenotípica de raças bubalinas nacionais e do tipo Baio. **Pesq. Agrop. Bras.**, v.38, n.11, p.1337-1342, 2003.

CASTILLO, L.S. Proposal. New Scientific name for carabao *Bubalus carabanensis* (Linn.). In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 5., 1983, Tokyo. Proceedings... Tokyo: WAAP, 1983. v.2. p. 87-88.

CAVALI, J; PEREIRA, R. G. de A. Produção leiteira de búfalos. In: SALMAN, A. K. D.; PFEIFER, L. F. M. (Ed.). *Pecuária leiteira na Amazônia*. Brasília, DF: Embrapa, 2020. Cap. 17, p. 391-399.

COCKRILL W.R. (1984) Water buffalo. In: *Evolution of Domesticated Animals* (Ed. by I.L. Mason), pp 52– 63. Longman, London.

Cockrill W.R. (Ed.) (1974) *The Husbandry and Health of the Domestic Buffalo*. FAO, Rome.

COCKRILL, W.R. *The husbandry and health of the water buffalo*. Rome: FAO, 1974.

COLLI L., MILANESI M., VAJANA E. et al. (2018) New insights on water buffalo genomic diversity and post-domestication migration routes from medium density SNP chip data. *Frontiers in Genetics* 9, 53.

COSTA, L. A. M.; Análise do polimorfismo no gene da Leptina em búfalas da raça Murrah nos Estados de Pernambuco e Alagoas e na sua relação com a produção leiteira. 2015. Dissertação (Mestre em Ciência Animal tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/4690/2/Luciana%20Amaral%20de%20Mascena%20Costa.pdf>> Acessado em: 5 set. 2021.

DE, ARUN & PONRAJ, PERUMAL & MALAKAR, DHRUBA & MUTHIYAN, RAMACHANDRAN & KUNDU, ANANDAMOY & BHATTACHARYA, DEBASIS. (2019). Complete mitogenome sequencing of Andaman buffalo: an endangered germplasm of Andaman and Nicobar Islands, India. *Journal of Genetics*. 98. 97. 10.1007/s12041-019-1140-z.

DEGRANDI. Tiago Marafiga. Caracterização cromossômica e molecular de bubalinos da raça carabao, do tipo baio e híbridos, mantidos em conservação no Brasil. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pampa, Campus São Gabriel. São Gabriel, 2013.

ERIKSSON, J.; AFFARA, N. A. Spermatogenesis and sex chromosome gene content: an evolutionary perspective. **Human Fertility (Cambridge)**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2006.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform.*, v. 1, p. 47-50, 2005.

FAO (2000) *World Watch List for Domestic Animal Diversity*, 3rd edn (Ed. by B.D. Scherf). FAO, Rome.

FELDHAMER, G., L. DRICKAMER, S. VESSEY, J. MERRITT, C. KRAJEWSKI. 2007. *Mammalogy: Adaptation, Diversity, Ecology*. Baltimore, MD: The Johns Hopkins University Press.

FERNANDES F. M. de C., MATIOLI R. S., *Biológico*, São Paulo, v.63, n.1/2, p.37-38, jan./dez., 2001

FISCHER H.; ULBRICH F. (1968) Chromosomes of the Murrah buffalo and its crossbreds with the Asiatic swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* 84, 110–4.

FOLMER, O., M. BLACK, W. HOEH, R. LUTZ & R. VRIJENHOEK. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. *Livestock Systems: Buffaloes*. Disponível em: <<https://www.fao.org/livestock-systems/global-distributions/buffaloes/en/>>. Acessado em: 12 set. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA/visualize>>. Acessado em 13 set. 2021.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Gateway to dairy production and products: Buffaloes. Disponível em: <<https://www.fao.org/dairy-production-products/production/dairy-animals/buffaloes/en/>>. Acessado em: 12 set. 2021.

GARRIGAN, D.; HAMMER; M. F. Reconstructing human origins in the genomic era. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 669-690, 2006.

GENTRY, A. 2001. Bovidae. Pp. 363-465 in T Harrison, ed. *Paleontology and Geology of Laetoli: Human Evolution in Context. Volume 2: Fossil Hominins and the Associated Fauna*. New York, NY: Springer.

GOODMAN, S. J. Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. **Molecular Genetics and Evolution**, v. 15, n. 2, p. 104 – 118, 1998.

GRAY, J. E. 1821. On the natural arrangement of vertebrate animals. *London Medical Repository* 15:296–310.

GRUBB, P. Artiodactyla. In: WILSON, E.D.; REEDER, D.M. (Eds.), Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference. 3.ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005. p. 637-722.

HAMMER, M. F.; KARAFET, T. M.; REDD, A. J.; JARJANAZI, H.; SANTACHIARA-BENERECETTI, S.; SOODYALL, H.; ZEGURA, S. L. Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 7, p. 1189-1203, 2001.

HASSANIN, A., DOUZERY, E.J.P., 1999. The tribal radiation of the family Bovidae (Artiodactyla) and the evolution of the mitochondrial cytochrome b gene. *Mol. Phylogenetics Evol.* 13, 227–243.

HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. BALL & J. R. DEWAARD. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 313-321.

HUSSAIN, TANVEER & BABAR, MASROOR & NADEEM, ASIF & JABEEN, RAHILA & ALI, AHMAD. (2009). Phylogenetic Analysis of Kundi Buffalo Breed of Pakistan Through Mitochondrial D-Loop Region. *Pakistan journal of zoology*. 341-246.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. 2020. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/18/0>> Acessado em: 5 set. 2021.

IRMNG (2021). *Bubalus* Smith, 1827. Disponível em: <<https://www.irmng.org/aphia.php?p=taxdetails&id=1278269>> Acessado em: 28 out. 2021.

ITIS Results of: Search in every Kingdom for Scientific Name containing 'Bubalus' Archived March 12, 2009, at the Wayback Machine. Integrated Taxonomic Information System. Available in: <https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=552476> Accessed in: 20 ago. 2021

KIERSTEIN, G.; VALLINOTO, M.; SILVA, A.; SCHNEIDER, M.P.; IANNUZZI, L.; BRENIG, B. Analysis of mitochondrial D-loop region casts new light on domestic water buffalo (*Bubalus bubalis*) phylogeny. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2004**, 30, 308–324

KIKKAWA Y., YONEKAWA H., SUZUKI H. & AMANO T. (1997) Analysis of genetic diversity of domestic water buffaloes and anoas based on variations in the mitochondrial gene for cytochrome b. *Animal Genetics* 28, 195–201.

KINGDON, J. 1982a. East African Mammals: Part C. Chicago: The University of Chicago Press.

KINGDON, J. 1982b. East African Mammals: Part D. Chicago: The University of Chicago Press.

KUMAR S., NAGARAJAN M., SANDHU J.S., KUMAR N. & BEHL V. (2007b) Phylogeography and domestication of Indian river buffalo. *BMC Evolutionary Biology* 7, 186–93.

KUMAR S., NAGARAJAN M., SANDHU J.S., KUMAR N., BEHL V. & NISHANTH G. (2007a) Mitochondrial DNA analyses of Indian water buffalo support a distinct genetic origin of river and swamp buffalo. *Animal Genetics* 38, 227–32.

LAU C.H., DRINKWATER R.D., YUSOFF K., TAN S.G., HETZEL D.J.S. & BARKER J.S.F. (1998) Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Animal Genetics* 29, 253–64.

LEI C.Z., ZHANG W., CHEN H. *et al.* (2007) Independent maternal origin of Chinese swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Genetics* 38, 97–102.

LEIGH, JW, BRYANT D (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25, p. 1.451-1.452, 2009.

LINNAEUS, C. 1758. *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*. Tomus I. Editio decima, reformata Laurentii Salvi, Stockholm, 824 pp.

LODOVINO, R.M.R **Agricultura e pecuária em manejo (Pará-Brasil): diagnóstico dos sistemas de produção da agricultura familiar**. 1996. 174p. Dissertação (Mestrado) – Instituto Superior de Agronomia Lisboa/ Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 1996.

LUO, X.; ZHOU, Y.; ZHANG, B.; ZHANG, Y.; WANG, X.; FENG, T.; LI, Z.; CUI, K.; WANG, Z.; LUO, C.; *et al.* Understanding divergent domestication traits from the whole-genome sequencing of swamp-and river-buffalo populations. *Natl. Sci. Rev.* **2020**, 7, 686–701.

LYDEKKER, R. Catalogue of the ungulate mammals in the Britis Museun. London, v.30, n.3, p.28-29. 1885.

MACGREGOR R. (1939) The domestic buffalo. Thesis presented to the Royal College of Veterinary Surgeons (quoted by I.L. Mason in Cockrill (1974), 1–47).

MARQUES J. R., SALES R. L., DIAS J. C., SILVA C. A., LEAL R. P., TEIXEIRA L. C., MARQUES L. C., MIRANDA B. R., SILVA C. S., COSTA J. S. Núcleo de conservação de búfalos Tipo Baio (*Bubalus bubalis bubalis*) na Embrapa/Bagam, Ilha do Marajó, Pará, Brasil. 2017. XVIII Simposio Iberoamericano sobre la conservación y utilización de recursos zoogenéticos.

MARQUES, J. R. F. Búfalos: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa - SCT; Embrapa- CPATU, 2000. 176 p. (Coleção 500 Perguntas, 500 respostas. Embrapa - SCT)

MARQUES, J. R. F. et al. Conservation of genetic resources of the small populations of domestic animal of the Amazon Region in Brazil. In: GALAL, S.; BOYAZOGLU, J. Animal genetic resources information. Rome: FAO, 2003. v. 33. P. 31-40.

MARQUES, J. R. F. Programa de melhoramento genético da Embrapa Amazônia Oriental. Belém, PA: EAO, 1999. 49 p. (EAO. Documentos, 29).

MASON, I.L. Species, types and breeds Genetics. In: COCKRILL, R. W. (Ed.). The Water Buffalo. Rome: FAO, 1977.

MATA H., FONTANA C.S., MAURÍCIO G.N., BORNSCHEIN M.R., DE VASCONCELOS M.F. & BONATTO S.L. 2009. Molecular phylogeny and biogeography of the eastern Tapaculos (Aves: Rhinocryptidae: Scytalopus, Eleoscytalopus): Cryptic diversification in Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 53(2): 450-462. DOI:10.1016/j.ympev.2009.07.017.

MELO, B. A. de L. Associação entre produção de leite, duração da lactação, primeiro intervalo de parto e intervalo de parto com a morfometria de búfalas mestiças da raça Murrah por meio de análise multivariada. 2017. 100 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2017.

NAGARAJAN M., NIMISHA K. & KUMAR S. (2015) Mitochondrial DNA variability of domestic river buffalo (*Bubalus bubalis*) populations: genetic evidence for domestication of river buffalo in Indian subcontinent. *Genome Biology and Evolution* 7, 1252–9.

NOWAK, R.M. Walker's mammals of the world. 6. ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1999. 2 v

PARMA P.; ERRA-PUJADA M.; FELIGINI M.; GREPPI G. & ENNE G. 2004 Water buffalo (*Bubalus bubalis*): complete nucleotide mitochondrial genome sequence. *DNA Seq.* 15, 369–373.

PEIXOTO JOELE, M.R.S. et al. Sistemas silvipastoril e tradicional na Amazônia Oriental – produção e qualidade da carcaça e carne de búfalos. **Ciências Agrárias**, v.34, n.5, p.2457-2464, 2013.

PRIYONO DS, SOLIHIN DD, FARAJALLAH A, ARINI DID. 2018. Anoa, dwarf buffalo from Sulawesi, Indonesia: Identification based on DNA barcode. *Biodiversitas* 19: 1985-1992.

REHMAN, SU; HASSAN, F.-U.; LUO, X.; LI, Z .; LIU, Q. Whole-Genome Sequencing and Characterization of Buffalo Genetic Resources: Recent Advances and Future Challenges. *Animals* **2021**, *11*, 904

REIMCHE B. R. Caracterização e comparação citogenética dos bubalinos Carabao, Murrah e Tipo Baio. 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal do Pampa.

ROSA, A. do N.; MARTINS. E. N.; MENEZES, G. R. de O.; SILVA, L. O. C. da (Ed.). Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus-Embrapa. Brasília, DF: Embrapa; Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2013. Capítulo 2, p. 11-26.

SANTIAGO, A.A. Introdução dos búfalos no Brasil, 2000. Disponível em: <http://www.bufalo.com.br/info_criador/historico_bufalos.pdf> Acessado em: 15 jun. 2021.

SARATAPHAN N., NARONGWANICHGARN W. & MANEERAT S. (2017) Phylogenetic analysis of a Thai wild water buffalo (*Bubalus arnee*) through mitochondrial control region. *International Journal of Conservation Science* **8**, 105– 12.

SARVANI R. K.; PARMAR D. R.; TABASUM W.; THOTA N.; SREENIVAS A.; GAUR A. 2018 Characterization of the complete mitogenome of Indian Mouse Deer, *Moschiola indica* (Artiodactyla: Tragulidae) and its evolutionary significance. *Sci. Rep.* **8**, 2697

SENO, L.O; CARDOSO, V.L.; TONHATI, H. Valores econômicos para as características de produção de leite de búfalas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.6, p.2011-2016, 2007.

SHAARI, N. A. L., JAOI-EDWARD, M., LOO, S. *et al.* Karyotypic and mtDNA based characterization of Malaysian water buffalo. *BMC Genet* **20**, 37 (2019). <https://doi.org/10.1186/s12863-019-0741-0>

SILVA, P. H. T. da; FACO, O.; SILVA, K. de M.; LANDIM, A. V. Padrão racial e seu impacto sobre o melhoramento genético da Raça Morada Nova, 2012. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/952833/padrao-racial-e-seu-impacto-sobre-o-melhoramento-genetico-da-raca-morada-nova>> Acessado em: 10 set. 2021.

SMITH, C. H. 1827. The Animal Kingdom Arranged in Conformity with Its Organization, by the Georges Baron Cuvier, with additional descriptions by E. Griffith and E. Pidgeon, 4: 1-291 (London, G. B. Whittaker).

SONGSRI, S. AND D. A. RAMIREZ. 1979. The cytology of swamp and river type of water buffaloes and their hybrids. *Philippine Agriculturist*. **62**:262-275.

TOBE, S. S.; LINACRE, A. M. A multiplex assay to identify 18 European mammal species from mixtures using the mitochondrial cytochrome b gene. *Electrophoresis*, v. 29, n. 2, p. 340-347, 2008.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M.F.C.; DUARTE, J.M.C. et al. Parâmetros genéticos para a produção de leite, gordura e proteína em Bubalinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, n.6, p.2051-2056 (Supl.), 2000.

TONHATI, H.; MUÑOZ, M.F.C.; DUARTE, J.M.C. et al. Estimates of correction factors for lactation length and genetic parameters for milk yield in buffaloes. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.2, p.251-257, 2004.

TONHATI, H.; VASCONCELLOS, B.F.; ALBUQUERQUE, L.G. Genetic aspects of productive and reproductive traits in a Murrah buffalo herd in São Paulo, Brazil. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.117, n.5, p.331-336, 2000.

UNIPROT, Universal Protein. Available in: < <https://www.uniprot.org/taxonomy/346063>>
Accessed in: 26 oct. 2021

VAUGHN, T., J. RYAN, N. CZAPLEWSKI. 2000. *Mammalogy*. Philadelphia, PA: Saunders College.

VIEIRA, M.C. et al. Viabilidade econômica da implantação de uma unidade industrial para produção de mozzarella e de massa coagulada, fermentada e congelada de leite de búfala. **Informação Econômica**, v.39, n.10, p.32-42, 2009.

WALTHER, F. 1990. Bovids. Pp. 288-324, 338-339, 354-355, 432-433, 460-461- 482-483 in S Parker, ed. *Grzimek's Encyclopedia of Mammals*, Vol. 5, 1 Edition. New York: McGraw-Hill.

WANG G., HAO L., CHENG Y. *et al.* (2017b) Effects of GnRHR polymorphisms on sperm quality in Chinese water buffalo. *Animal Reproduction Science* 186, 37– 43.

WANG S., CHEN N., CAPODIFERRO M. R., ZHANG T., LANCIANI H., ZHANG H. et al. 2017 Whole mitogenomes reveal the history of swamp buffalo: initially shaped by glacial periods and eventually modelled by domestication. *Sci. Rep.* 7, 4708

WANG S., CHEN N., CAPODIFERRO M.R. *et al.* (2017a) Whole mitogenomes reveal the history of swamp buffalo: initially shaped by glacial periods and eventually modelled by domestication. *Scientific Reports* 7, 4708.

WARES, J. P. & C. W. CUNNINGHAM. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 12: 2455-2469.

Yılmaz Adkinson, A., Konca, Y. "Sütçü Manda Irklarının Performans ve Verimliliğini Etkileyen Faktörler ve Türkiye'deki Geleceği". *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi* (2021): 498-508

YINDEE M., VLAMINGS B.H., WAJJWALKU W. *et al.* (2010) Y-chromosomal variation confirms independent domestications of swamp and river buffalo. *Animal Genetics* 41, 433– 5.

ZETOUNI, L. *et al.* "**Polymorphisms In the Mtrn1a Gene and Their Effects On the Productive and Reproductive Traits In Buffaloes.**" *Tropical animal health and production*, v. 46,.2 pp. 337-340, 2013.

ZHANG Y, COLLI L, BARKER JSF. 2020. Asian water buffalo: domestication, history and genetics. *Anim Genet.* 51(2):177–191.

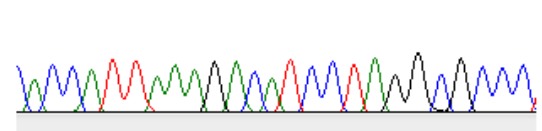
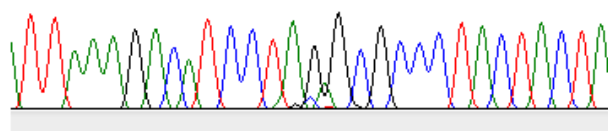
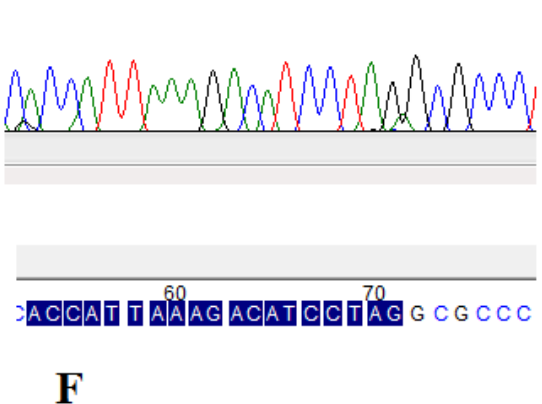
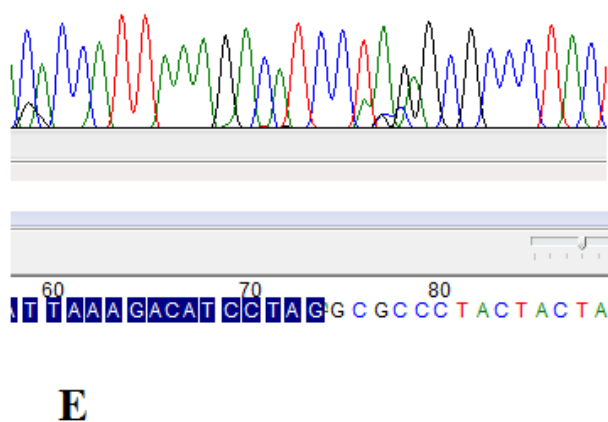
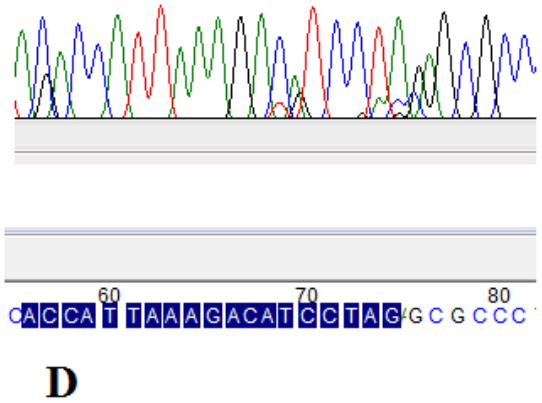
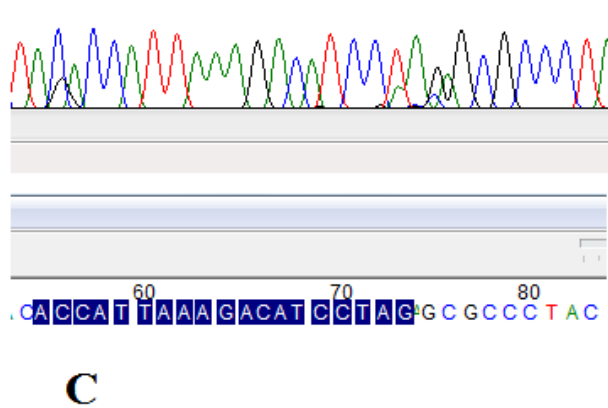
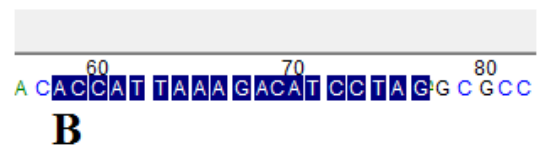
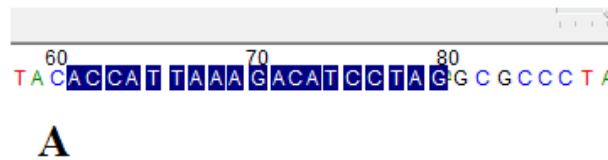
ZHANG Y., COLLI L. & BARKER J. S. F. (2020) Asian water buffalo: domestication, history and genetics. *Stichting International Foundation for Animal Genetics*, 51, 177-191.

ZHANG Y., SUN D., YU Y. & ZHANG Y. (2006) A Y-linked SNP in SRY gene differentiates Chinese indigenous swamp buffalo and introduced river buffalo. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 19, 1240– 4.

ZHANG Y., VANKAN D., ZHANG Y. & BARKER J.S.F. (2011) Genetic differentiation of water buffalo (*Bubalus bubalis*) populations in China, Nepal and south-east Asia: inferences on the region of domestication of the swamp buffalo. *Animal Genetics* 42, 366– 77.

APÊNDICE

- A. Cromatograma com a inclusão de adenina no gene *cyt b*, na posição 692 do alinhamento, em cinco animais do rebanho estudado. Amostra Z006-1 (A); amostra Z001-2 (B); amostra Z009-5 (C); amostra Z007-7 (D); amostra Z003-10 (E); ausência da inclusão de adenina, padrão de cromatograma encontrado nas demais amostras (F).



B. Repetição da reconstrução filogenética com o gene *cyt b*. Exclusão da inclusão de adenina das amostras.

