



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE RAÇAS ASININAS CRIADAS NO BRASIL,
BASEADA NA ANÁLISE DE LOCOS MICROSSATÉLITES E DNA
MITOCONDRIAL**

LEONARDO DANIEL DE ALMEIDA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2009**



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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE RAÇAS ASININAS CRIADAS NO BRASIL,
BASEADA NA ANÁLISE DE LOCOS MICROSSATÉLITES E DNA
MITOCONDRIAL**

ALUNO: Leonardo Daniel de Almeida

ORIENTADOR: Dr. Arthur da Silva Mariante

CO-ORIENTADORA: Dra. Andréa Alves do Egito

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 16/2009

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2009**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ALMEIDA, L. D. **Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 83 p. Dissertação de Mestrado.

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

FICHA CATALOGRÁFICA

ALMEIDA, L. D. Diversidade genética de raças asininas criadas no Brasil, baseada na análise de locos microssatélites e DNA mitocondrial. Orientador: Arthur da Silva Mariante Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009. 83p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

**1. Jumentos. 2. Estrutura genética 3. Origem. 4. d-loop.
5. STR. I. Mariante, A. II. PhD**

CDD ou CDU

Agris / FAO

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE RAÇAS ASININAS CRIADAS NO BRASIL,
BASEADA NA ANÁLISE DE LOCOS MICROSSATÉLITES E DNA
MITOCONDRIAL**

LEONARDO DANIEL DE ALMEIDA

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

APROVADA POR:

**ARTHUR DA SILVA MARIANTE, Doutorado (EMBRAPA Recursos Genéticos e
Biotecnologia - CENARGEN)
(ORIENTADOR)**

**CONCEPTA MARGARET MCMANUS PIMENTEL, Pós-doutorado
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**MARIA CLORINDA SOARES FIORAVANTI, Doutorado (UFG - Universidade
Federal de Goiás)
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 29 DE JUNHO DE 2009

*Ao meu filho,
A razão da minha vida,
Pois tudo que faço é pensando nele e para ele.*

*À minha família,
Que é a minha base de sustentação,
Sem ela eu desmoronaria.*

*Ao meu querido avô,
Que Deus o tenha,
Tudo que sou devo a você.*

*A minha querida amiga,
Orientadora e mãe,
Você é muito especial na minha vida.*

*Aos meus amigos,
Que sempre me incentivaram,
E nunca deixaram de acreditar em mim.*

Agradecimentos

À Deus por nos conceder o dom da vida, acompanhar e nos guiar por todos os caminhos percorridos ao longo deste mestrado.

À UnB pelo espaço concedido, por todo trabalho desenvolvido durante o curso e toda sua equipe de trabalho aos funcionários e professores, que nos guiaram por todo esse caminho e nos passaram além de conhecimento científico, sua experiência de vida.

À EMBRAPA, que me acolheu como a quem acolhe um filho, e me propiciou o espaço para que eu pudesse me aprimorar profissionalmente.

À minha mãe pelo seu apoio, financeiro, moral e por tudo, para ela não tenho nem palavras.

Ao meu filho, que sempre foi meu maior incentivador e motivador, pelo seu amor e compreensão.

A Manoel Daniel (*in memoriam*) e a Luiz Carlos Batalha por me terem como filho e me passarem suas experiências de vida para que os meus erros fossem minimizados.

À minha família, minha irmã Ana Beatriz, meu padrasto Antônio Maria Machado e minha querida avó Maria Paulina.

À Kátia Vanessa, pelo período de compreensão, companheirismo e apoio ao meu lado durante esta jornada.

À minha orientadora Andréa Alves do Egito, a quem costumo me referir como mãe, então nem preciso quantificar sua importância na minha vida.

Ao meu orientador Arthur da Silva Mariante, por ter me orientado e encarado esta batalha ao meu lado.

Aos meus grandes irmãos, César Petrolí, Gabriel Botta, Carla dos Anjos, Stephan Ramos, Wellington Silva. Vocês são os maiores e melhores, espero que possamos continuar sempre juntos.

Às minhas amigas Luciana Martins de Medeiros e Aline Chaves Marinho, por terem me encaminhado para a este fantástico mundo científico.

Ao Dr. Geraldo Magela, da Embrapa Meio-Norte e aos criadores Marco Antônio de Andrade, da Fazenda Mula Preta, Uberaba – MG e Haroldo Pereira da Rocha, do Criatório Marju, Vassouras – RJ, que tiveram uma colaboração fundamental para o desenvolvimento deste.

Aos pesquisadores da EMBRAPA, Maria do Socorro Maués Albuquerque, Alexandre Floriani, Samuel Rezende Paiva e Silvia Tereza Castro pela compreensão e apoio.

Às minhas companheiras de jornada, Vanessa Carvalho, Juliana Portuêez e Mariana Marzullo que fizeram parte intensamente deste trabalho.

Ao professor Dr. Alexandre Caetano e a Dra. Patrícia Ianella, pelos conselhos e por sua colaboração, providencial para o desenvolvimento deste.

Aos meus mais que amigos, Murilo da Silva, Bruna Pena, Carolina Dias, Vanessa Chaves, Ligia Seabra, Ailton Matos, Alexandre Alves, Ed, Kéliton dos Santos, Edward Higino, Roberto Pereira e os demais que sabem que estão no meu coração.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de tabelas	x
Índice de Figuras	xi
Resumo	xii
Abstract	xiv
Capítulo I	1
1. Introdução Geral	1
1.1. Problemática e Relevância	2
2. Objetivos	4
3. Revisão de literatura	5
3.1. Origem e Domesticação dos Asininos	5
3.2. Os Asininos no Brasil	6
3.2.1. Jumento Nordestino	6
3.2.2. Jumento Brasileiro	7
3.2.3. Jumento Pega	9
3.3. Conservação Genética	10
3.4. Caracterização Genética	12
3.5. Caracterização Genética dos Asininos	15
Capítulo 2. Diversidade nucleotídica e ancestralidade materna de raças asininas naturalizadas brasileiras baseadas na análise do DNA mitocondrial	18
Resumo	19
Abstract	21
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	24
2.1. Local de desenvolvimento	24
2.2. Animais e raças analisadas	24
2.3. Amplificação da região controle do mtDNA	25
2.4. Análise estatística	26
3. Resultados e discussão	27
3.1. Diversidade genética das raças de asininos naturalizados pela análise do DNA mitocndrial.	27
3.2. Evidências genéticas da origem das raças de asininos criadas no Brasil	30
4. Conclusões	34
5. Referências Bibliográficas	35
Capitulo 3. Diversidade genética de 3 raças asininas criadas no Brasil por meio de marcadores microssatélites	38
Resumo	39
Abstract	41
1. Introdução	42
2. Material e Métodos	44
2.1. Animais e raças analisadas	44
2.2. Locos microssatélites tipados	45
2.3. Análises estatísticas	48
3. Resultados e discussão	50

4. Conclusões	59
5. Referências Bibliográficas	60
Capítulo 4: Considerações finais	63
Referências Bibliográficas	65
Anexos	
Anexo 1. Frequências alélicas observadas para os locos analisados nas raças em estudo	71

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Efetivo populacional de Asininos por região e total no Brasil	2
Tabela 2: Número e situação mundial das raças de Asininos por região.	11

Capítulo 2

Tabela 1. Amostras obtidas no <i>GenBank</i> de acordo com as suas regiões de origem, o número de animais representados e seu número de acesso .	25
Tabela 2: Haplótipos observados na região d-loop do DNA mitocondrial nas raças asininas brasileiras, com a posição de seus sítios nucleotídicos polimórficos e número de animais observados em cada uma das raças analisadas, presentes nas raças naturalizadas de asininos.	28
Tabela 3: Diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica estimada a partir da região d-loop do mtDNA, para cada uma das raças brasileiras naturalizadas.	29
Tabela 4: Análise da variância molecular (AMOVA) nos diferentes níveis hierárquicos entre e dentro das raças asininas estudadas baseada na distância de Kimura 2P.	31

Capítulo 3

Tabela 1. Dados descritivos da amostra analisada contendo a raça, o código da mesma, número de populações e animais analisados, localidade e ano da coleta.	44
Tabela 2. Condições de amplificação e multiplexes formados para os quinze locos microssatélites amplificados.	46
Tabela 3. Locos microssatélites analisados, par de <i>primers</i> utilizado para sua amplificação e referências.	47
Tabela 4. Estatísticas descritivas para os quinze locos microssatélites analisados para as três raças naturalizadas de asininos.	51
Tabela 5. Resumo estatístico dos parâmetros genéticos populacionais observados para as três raças de Asininos e uma raça de Equino estudadas, baseado na média obtida com os quinze locos microssatélites .	53
Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estruturação entre e dentro das três raças de Asininos e raça Árabe de Equino estudadas.	55
Tabela 7. Estimativa aos pares de diferenciação genética e distância genética entre todas as três raças naturalizadas de asininos e a raça equina Árabe.	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Foto Jumento Nordestino	7
Figura 2. Foto Jumento Brasileiro	9
Figura 3. Foto Jumento Pega	10

Capítulo 2

Figura 1. Rede (<i>Network</i>) contraída formada pelo método de median-joining (Bandelt <i>et al.</i> , 1999) demonstrando as linhagens de mtDNA observadas nas três raças asininas naturalizadas.	30
Figura 2. <i>Network</i> formada pelo método de median-joining demonstrando as linhagens de mtDNA observadas para as raças asininas em estudo.	32
Figura 3. Árvore filogenética demonstrando a relação existente entre as raças dos diferentes continentes analisadas, inferida a partir da análise da seqüência do <i>d</i> -loop de 299bp baseada na distância de Kimura 2p e agrupamento pelo método de Neighbor-joining.	32

Capítulo 3

Figura 1. Padrão de peso molecular interno utilizado marcado com a fluorescência Rox.	46
Figura 2. Dendrograma gerado utilizando-se o método de UPGMA a partir dos 15 locos analisados.	57
Figura 3. Agrupamento individual dos 215 indivíduos das três raças asininas brasileiras, inferido pelo método estatístico Bayesiano utilizando-se o programa STRUCTURE.	57
Figura 4. Magnitude de ΔK em função de K dada pela média das 7 corridas independentes com 500.000 interações cada e período de <i>burn-in</i> de 50.000.	58

RESUMO

DIVERSIDADE GENÉTICA DE RAÇAS ASININAS CRIADAS NO BRASIL, BASEADA NA ANÁLISE DE LOCOS MICROSSATÉLITES E DNA MITOCONDRIAL

Autor: Leonardo Daniel de Almeida¹

Orientador: Dr. Arthur da Silva Mariante^{1,2}

¹UNB – Universidade de Brasília, Brasília – DF

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF

O melhoramento genético e, por conseguinte, o progresso da pecuária está intimamente correlacionado com a variabilidade genética das espécies animais. Desta forma, a perda dessa variabilidade poderá restringir as opções, não previstas, para os trabalhos de melhoramento animal. O estudo da diversidade e da variabilidade genética da espécie asinina poderá auxiliar nas tomadas de decisão a respeito de quais populações devem ou não ser conservadas, quando os recursos são escassos, evitando a duplicação de esforços na manutenção das amostras. Da mesma forma, poderá ainda evitar que populações de uma mesma raça, que possuam características particulares, sejam descartadas durante o processo de conservação. Este trabalho teve como objetivo estimar a variabilidade genética, entre e dentro, de três raças asininas mais comuns no Brasil visando à obtenção de um panorama geral da diversidade genética desta espécie, a análise de sua unicidade e estrutura populacional, bem como o estudo de suas relações genéticas pelo uso de marcadores de DNA nucleares e citoplasmáticos. Com os locos microsatélites analisados foi possível montar um painel de marcadores eficientes para testes de exclusão de paternidade na espécie asinina. Observou-se um total de 91 alelos para todos os locos analisados. As estimativas das frequências alélicas de diferentes marcadores microsatélites e os índices de diversidade demonstraram ser possível monitorar, preservar e caracterizar geneticamente os recursos genéticos asininos. A raça Nordestina foi a que apresentou o maior número de alelos, e a maior estimativa de endogamia. O menor índice de endogamia foi detectado na raça

Brasileira. As distâncias genéticas mais altas foram observadas entre as raças Brasileira e Nordestina (0,2197), enquanto que as menores distâncias foram observadas entre as raças Pêga e Nordestina (0,0868). Mediante o seqüenciamento e a análise de 596bp da região controle do DNA mitocondrial foi possível observar que, à exceção da raça Brasileira, as demais raças asininas estudadas possuem uma alta diversidade nucleotídica. As raças asininas brasileiras possuem haplótipos de origem em comum com raças asiáticas e européias, oriundas do tronco *somaliensis*. Verificou-se ainda a existência de uma subdivisão no tronco *somaliensis*, o que sugere a existência de dois haplogrupos distintos ou ainda um maior número de centros de domesticação.

Palavras-chave: jumentos, genética populacional, d-loop, variabilidade genética, STRs

ABSTRACT

GENETIC DIVERSITY OF THE DONKEY BREEDS CREATED IN BRAZIL, BASED ON ANALYSIS OF MICROSATELLITE LOCI AND MTDNA

Animal breeding and therefore the progress of the livestock industry is closely related with the genetic variability of animal species. Thus, the loss of this variability may limit the unpredicted options for animal improvement. The study of diversity and genetic variability of donkeys can assist in the decision making about what populations should be included in a conservation program, when financial resources are scarce, avoiding the duplication of efforts in maintaining the samples. Similarly, the study of diversity can ensure that stocks of the same breed, which have particular characteristics, are not discarded during the conservation process. This work aimed to optimize the genotyping systems based on the fluorescent detection of microsatellite polymorphisms for donkeys with which will be analyzed the genetic variability within and between three donkey breeds raised in Brazil. With the use of microsatellite markers it was possible to assemble an efficient panel of markers for tests of exclusion of paternity. There were a total of 91 alleles for all studied loci. Estimates of allele frequencies of different microsatellite markers and indices of diversity reveal valuable information that will allow to monitor, maintain and genetically characterize donkey genetic resources. The Northeastern breed had the highest number of alleles, however the higher inbreeding estimate. The lowest rate of inbreeding was detected in the Brazilian breed. The highest genetic distances were observed between the Brazilian and the Northeastern breeds (0.2197), whereas the lowest distances were observed between the Pega and Northeastern donkeys (0.0868). By sequencing and analyzing 596bp of the control region of mitochondrial DNA it could be observed that with the exception of the Brazilian breed, the other breeds of

donkeys studied have high nucleotide diversity. The donkey breeds from Brazil have haplotypes in common with Asian and European donkey breeds, originally from the somaliensis cluster. It was also observed the existence of a subdivision in the somaliensis cluster, suggesting either the existence of two distinct haplogroups or more centers of domestication.

Keywords: donkeys, population genetics, d-loop, genetic variability, STRs

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos o número de asininos vem diminuindo na Brasil (tabela 1) e em todo o mundo, principalmente devido à mecanização do setor rural, o que levou a uma redução na utilização da espécie em sua principal atividade. Isto vem gerando uma preocupação, pois a perda da diversidade genética animal poderá ameaçar a sustentabilidade da pecuária, diminuindo a possibilidade de os produtores fazerem frente a alterações nas condições ambientais, como novas enfermidades, mudanças no clima e nos sistemas de produção, bem como preferências dos consumidores e segurança alimentar (Mariante *et al.*, 2004).

A diversidade genética entre indivíduos de uma população é um fator importante para a sobrevivência às condições ambientais em constantes mudanças. Devido à diminuição na diversidade biológica, indivíduos perdem suas plasticidades evolutivas, tornando-se mais suscetíveis às influências negativas do ambiente (Bannikova & Zubareva, 1995).

A conservação de recursos genéticos animais, deve ter uma alta prioridade e deve incorporar a preservação de populações destas raças e seu uso sustentável (Mariante & Egito, 2002).

O elemento chave para estratégias de conservação deve ser a caracterização das raças e populações de modo a fornecer um quadro geral da diversidade genética existente. A caracterização dos recursos genéticos animais baseou-se durante muito tempo em descritores morfológicos e produtivos (fenotípicos), os quais muitas vezes são insuficientes para distinguir raças puras, podendo ser influenciados pelo ambiente. Esta caracterização preliminar necessita de maiores refinamentos, pois estratégias de conservação e

melhoramento ideais devem ser baseadas na combinação de dados fenotípicos e genotípicos (Egito *et al.*, 1999).

Tabela 1. Efetivo populacional de Asininos por região e total no Brasil

Região	2002	2003	2004	2005	2006	2007
Norte	41.884	42.05	43.349	41.038	41.3	39.708
Nordeste	1.115.485	1.106.510	1.092.301	1.085.775	1.080.158	1.063.012
Sudeste	41.406	41.463	41.88	45.651	46.156	41.976
Sul	5.372	5.44	5.108	5.022	5.074	4.442
Centro-Oeste	12.975	13.197	13.686	14.047	14.731	14.178
Brasil	1.217.122	1.208.660	1.196.324	1.191.533	1.187.419	1.163.316

Com o avanço da biologia molecular, novas metodologias surgiram para a caracterização genética de organismos superiores. Pelo estudo de DNA pode-se verificar a existência de um grande número de marcadores genéticos polimórficos, os quais possuem um vasto potencial de utilização, tal como identificação de paternidade, mapeamento genético, taxonomia molecular, introgressão de genes úteis, estudos evolucionários, diagnóstico genético precoce e seleção assistida por marcadores (Egito, 1995).

1.1. Problemática e Relevância

Os asininos estão associados a um vasto patrimônio de importância social, cultural, econômica e ecológica. Sua utilização baseia-se principalmente na agricultura, porém, são utilizados também na alimentação humana, produção de híbridos e para os serviços de carga e transporte (AEPGA, 2007).

Contudo, devido principalmente à mecanização do setor rural que vem ocorrendo nas últimas décadas, o número de animais desta espécie vem diminuindo

substancialmente, o que gera uma grande preocupação, pois a diminuição do número destes animais pode gerar perda da variabilidade genética da espécie, o que restringe a capacidade de adaptação e evolução da espécie (Nobre, 1980).

O estudo da diversidade e da variabilidade genética das principais raças naturalizadas de asininos do Brasil poderá auxiliar nas decisões a respeito de quais populações devem ser conservadas, principalmente quando os recursos são escassos, evitando a duplicação de esforços na manutenção de amostras que podem ser semelhantes. Por outro lado, pode ainda assegurar a manutenção da variabilidade genética, evitando que populações de uma mesma raça, que possuam características particulares, sejam descartadas durante o processo de conservação (Egito, 1995).

Técnicas que auxiliem a análise de parentescos e a identificação genética de um indivíduo podem ser utilizadas para a implementação bem sucedida e o monitoramento de programas de conservação *ex situ* (Hanotte & Jianlin, 2005). Com estas informações é possível promover o direcionamento dos acasalamentos visando favorecer a manutenção da variabilidade genética, escolher indivíduos genotipicamente menos similares para a formação de um novo núcleo de conservação ou analisar a eficiência do trabalho realizado, em prol da manutenção da variabilidade nos núcleos de conservação ao longo dos anos (Lara *et al.*, 1998; Egito *et al.*, 1999; Spritze *et al.*, 2003; Egito *et al.*, 2005b; Egito *et al.*, 2005c; Oliveira *et al.*, 2005)

Pelo seqüenciamento do DNA mitocondrial (mtDNA) é possível elucidar questões relacionadas a origem das raças de jumentos que hoje ocorrem no Brasil, uma vez que não existem dados históricos confiáveis que possam fornecer subsídios necessários que esclareçam esta questão (Bruford *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estimar a variabilidade genética dentro das raças asininas mais comuns no país (Pêga, Brasileiro e Nordestino), bem como estudar a origem das raças criadas no Brasil pelo seqüenciamento da região controle do mtDNA.

2.2. Específicos

Estudar a relação genética existente entre as diferentes raças mediante estimativas de distâncias genéticas e análise da estrutura populacional da espécie;

Avaliar a unicidade das três raças e/ou populações naturalizadas;

Construção de um banco de dados de perfis multiloco e frequências alélicas que poderá ser utilizado para a proteção, monitoramento, certificação e rastreamento de asininos;

Montar um painel de marcadores microsatélites adequado para testes de exclusão de paternidade para a espécie.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Origem e Domesticação dos Asininos

Os asininos pertencem ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, a classe *Mammalia*, da ordem dos *Perissodáctilos*, família *Equidae*, gênero *Equus*, espécie *Equus asinus* (Domingues, 1968).

Existem diversas teorias a respeito da origem dos asininos domésticos. Darwin (1859) admite a teoria de os jumentos, terem um único tronco africano comum de origem. Existem também autores (Sotillo & Serano, 1985; Lorenzo, 1997) que acreditam que a origem dos asininos é comum de dois ancestrais, sendo um o *Equus asinus africanus*, nativo da região nordeste da África, e outro o *Equus asinus europeus*, originário da bacia do Mediterrâneo. Entretanto, a maioria dos autores (Adametz, 1943; Epstein, 1984; Clutton-Brock, 1987; Camac, 1989, Beja-Pereira *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2005; Aranguren-Mendez *et al.*, 2004) indicam que a origem dos asininos deriva de dois ancestrais, o Asno de Nubian (*Equus asinus africanus*) nativo da bacia do Nilo, e o Asno Somaliense (*Equus asinus somaliensis*).

Quanto a sua domesticação prevalece a idéia de que o jumento, embora de utilização posterior ao cavalo, na Europa, foi utilizado mais remotamente na África e na Ásia. Os mais antigos monumentos egípcios apresentam figuras de jumentos e a partir da viagem de Abraão ao Egito, o jumento é citado em cada página do Gêneses, enquanto que sobre o cavalo, só há referência na época de José (Domingues, 1968). Assim de acordo com Domingues (1968), prevalece a opinião de que o jumento foi domesticado anteriormente ao cavalo há aproximadamente seis mil anos. Segundo Saint-Hilaire (1861) e Godron (1858), a domesticação dos asininos ocorreu na África, e não na Europa.

3.2. Os Asininos no Brasil

Acredita-se que os asininos tenham sido introduzidos no Brasil por volta de 1534, trazidos dos Arquipélagos da Madeira e das Canárias. Em 1549, Thomé de Souza trouxe de Cabo Verde mais animais para o estado da Bahia (Mariante & Cavalcante, 2006). Segundo Torres & Jardim (1984) ainda no tempo colonial deve ter havido introduções de jumentos portugueses, espanhóis e africanos.

As raças naturalizadas de asininos do Brasil, que se desenvolveram a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses, foram submetidas à seleção natural em diferentes ambientes, para os quais desenvolveram características específicas de adaptação. Assim, a diversidade genética dentro das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variação presente dentro de cada uma (Egito *et al.*, 1999).

No Brasil, destacam-se três raças de asininos, originadas das raças trazidas pelos colonizadores e do processo de seleção natural: jumento Nordestino, jumento Brasileiro e jumento Pêga (Mariante & Cavalcante, 2006).

3.2.1. Jumento Nordestino

Altamente rústico e adaptado às condições adversas no semi-árido brasileiro, o jumento Nordestino (Figura 1) é o animal usado pelo homem do Nordeste brasileiro em uma variedade de atividades (Nobre, 1980). Na segunda metade do século XX, a população de jumentos Nordestinos sofreu uma redução de aproximadamente 75% da população, passando de 2.7 milhões de cabeças em 1967, a aproximadamente 700 mil em 1981, sendo esta uma redução de aproximadamente 75% da população efetiva. A razão principal para esta redução, foi o abate indiscriminado de animais de todas as idades, para a exportação da carne e dos derivados, especialmente para Japão e Europa. Preocupada com o desaparecimento da raça a EMPARN (Empresa de Pesquisa do Rio Grande do Norte) manteve durante algum tempo um Núcleo de Conservação desta raça (Mariante & Cavalcante, 2006). Entretanto, com a diminuição da utilização destes animais pelo homem do Nordeste brasileiro, os mesmos passaram a ser abandonados a deriva, o que fez com que se reproduzissem indiscriminadamente, e hoje são encontrados em grande número, porém vistos como problema, devido principalmente por serem causa de acidentes de trânsito nas estradas daquela região.



Figura 1: Jumentos Nordestinos (Foto: Geraldo Magela)

As características do jumento Nordestino se enquadram dentro do seguinte tipo:

Porte: Altura mínima de 1,10m para macho e fêmea.

Cabeça – Média, bem proporcionada e ligeiramente alongada.

Pescoço – Fino, bem atado a cabeça e embutido nas espáduas.

Corpo – Alongado, linha dorso-lombar reta, garupa oblíqua e afinada na parte posterior..

Membros –Secos, desencarnados, bem apumados, cascos pequenos, talões altos e resistentes.

Pelagem – Cardã, ruça, pelo de rato, roxa, apatacada.

3.2.2. Jumento Brasileiro

Acredita-se que os jumentos da raça Brasileira (Figura 2), originada dos animais trazidos da Itália, predominantemente da Sicília, tenham uma relação genética muito próxima aos jumentos africanos. No Brasil, foram cruzados com os jumentos de Portugal ou de suas colônias africanas. Os núcleos formados no estado de São Paulo, passaram a ser

denominados de jumentos Paulista (Mariante *et. al.*, 2004). Esta raça é conhecida por suportar o trabalho duro nos campos e grandes caminhadas, quando usada sob a sela. Em 1939 foi fundada, a associação da raça denominada de Associação dos Jumentos Brasileiros (Torres & Jardim, 1987; Mariante & Cavalcante, 2006).

São os seguintes os caracteres típicos fixados e exigidos pela Associação e que passaram a constituir o tipo padrão:

Cabeça – De perfil retilíneo ou sub-convexilíneo, apresentando a linha da fronte e do chanfro pouco convergente com a do bordo inferior da mandíbula. A cabeça, observada de perfil, nunca deverá ser acentuadamente afunilada. Nos machos, será relativamente grande e máscula, sendo, nas fêmeas, mais leve, com expressão feminina. Os olhos devem ser relativamente pequenos, oblíquos e vivos. As arcadas orbitárias bem salientes.

Pescoço – Reforçado, grosso, bem implantado no tronco, dando boa inserção à cabeça.

Orelhas – Grandes, eretas, bem implantadas, dirigidas para cima e com as pontas recurvadas (atezouradas).

Tronco – Compacto e de bom comprimento, com linha dorso-lombar tanto quanto possível reta e harmoniosamente ligada à garupa.

Garupa – Acompanhando a linha dorso-lombar, comprida, musculosa e esse comprimento deve ser sempre igual ou superior à sua largura nas ancas.

Membros – Reforçados e enxutos, com articulações largas e fortes, tendo os cascos lisos, de altos talões. Bons aprumos.

Pelagem – Qualquer. É mais apreciada a pelagem denominada ruã. Pêlos curtos, lisos ou levemente ondulados.

Altura – No início do registro, os adultos deverão medir 1,20m para os machos e 1,15m para as fêmeas.



Figura 2. Jumento da raça Brasileira (Foto: Arthur Mariante)

3.2.3. Jumento Pêga

Como as demais raças de animais domésticos encontrados no Brasil, os asininos da raça Pêga (Figura 3) seriam de procedência ibérica. Estudos históricos demonstram que esta raça tem seu tronco étnico originário do *Equus asinus africanus*, do qual muito se aproxima. Esta raça se desenvolveu principalmente em Minas Gerais pela sua utilização na indústria da mineração onde era a raça de jumento preferida no cruzamento com éguas de diversas raças para a produção de híbrido (burros e mulas) com indiscutível capacidade para trabalhos diversos (Mariante *et. al.*, 2004).



Figura 3. Animal da raça Pêga (Foto: Arthur Mariante)

As características do jumento Pêga se enquadram dentro do seguinte tipo:

Cabeça – Fina, descarnada, “afunilando” para o focinho, orelhas grandes, estreitas, bem implantadas e dirigidas.

Pescoço – Longo, largo, musculoso.

Corpo – Fino, provido de boa massa muscular, comprido, traseiro cheio, garupa inclinada.

Membros – Altos e bem implantados, ossatura forte, quartelas um tanto inclinadas, cascos fortes e altos.

Pelagem – Clara, às vezes com uma tonalidade ruana; pelos curtos.

3.3. Conservação Genética

Programas mundiais de preservação têm sido desenvolvidos devido à preocupação com a perda da diversidade genética causada pela extinção de raças e populações. Como o progresso e o desenvolvimento futuro da pecuária estão relacionados com a variabilidade genética, sua perda poderá restringir as opções, não previstas, para os trabalhos de melhoramento animal (Mariante & Egito, 2002).

Diversas instituições estão envolvidas no trabalho de conservação das raças de asininos. Em 1991, com o auxílio de várias organizações e de diversos países (entre os quais o Brasil) a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) iniciou um

levantamento mundial sobre a situação das sete principais espécies de animais domésticos (Tabela 2¹). Após este levantamento a FAO incluiu diversas raças de asininos na lista de raças de animais domésticos recomendados para conservação (Aranguren-Méndez *et. al*, 2004).

Tabela 2: Número e situação das raças asininas no mundo separada por região.

Região	Número de Raças Catalogadas	Número de Raças em Risco de Extinção	Número de Raças Sem Levantamento Populacional
África	26	1	12
Ásia e Pacífico	32	2	6
Europa	54	23	19
América do Sul e Caribe	24	1	19
Oriente	47	2	30
América do Norte	5	1	4

Acompanhando a proposta mundial, a Embrapa passou a contemplar em sua programação de pesquisa, desde 1981, projetos relacionados à conservação de raças de animais domésticos, de interesse agropecuário, em risco de extinção. Para isso foi criado um Programa de Conservação de Recursos Genéticos Animais, que é coordenado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia. A conservação vem sendo realizada por diversos Centros de Pesquisa da Embrapa em parceria com Universidades, Empresas de Pesquisa Estaduais e produtores privados (Egito *et al.*, 2002a). O programa inclui as seguintes etapas: (a) identificação das populações em adiantado estado de diluição genética; (b) caracterização fenotípica e genética do germoplasma; e (c) avaliação do potencial produtivo (Mariante *et al.*, 2004). A conservação está sendo realizada em Núcleos de Conservação localizados nos habitats onde os animais foram submetidos à seleção natural (*in situ*), e pelo armazenamento de sêmen, embriões, DNA e tecido (*ex situ*).

Assim como as demais espécies que tiveram sua introdução à época da colonização, os jumentos das raças naturalizadas fazem parte dos projetos de conservação desenvolvidos pela EMBRAPA, cujo objetivo é a preservação, conservação e a disponibilidade para as cadeias produtivas da diversidade genética das espécies domésticas do Brasil ameaçadas de extinção (Egito *et al.*, 1999).

A partir dos resultados dos estudos de caracterização genética das espécies incluídas no programa, será possível comparar as raças naturalizadas e estimar distâncias genéticas entre as mesmas, dirimindo dúvidas que possam existir a respeito de suas

¹ Tabela obtida a partir de consulta realizada à página do DAD-IS (<http://dad.fao.org>) no dia 07/06/2009.

unicidades, bem como auxiliar no monitoramento e na manutenção da máxima variabilidade genética nos Núcleos de Conservação (Egito *et al.*, 2002b).

3.4. Caracterização Genética

Segundo a FAO 2000, elementos importantes nos programas nacionais de conservação incluem o inventário, a caracterização e a documentação dos dados obtidos. A sugestão de aplicar a caracterização genética nos programas de conservação de RGA não é recente (Mariante & Trovo, 1989; Fitzhugh & Strauss, 1992; Barker, 1994; Egito *et al.*, 1999). Em 1992, Hetzel & Drinkwater já afirmavam que as técnicas moleculares, baseadas em polimorfismos de DNA para a análise da variabilidade genética eram essenciais para os programas de conservação e melhoramento racionais, uma vez que estes devem estar fundamentados na combinação dos dados fenotípicos e genéticos. Bjornstad *et al.* (2000) consideram a caracterização como o primeiro passo para a conservação de raças nativas. Em termos de pesquisa, a prioridade deve ser dada à caracterização e à avaliação das populações nativas e a mensuração das diferenças entre e dentro das populações (Fitzhugh & Strauss, 1992), embora Barker (1994) cite que representantes de raças comuns e economicamente importantes devam ser incluídas, em adição às raras, com o intuito de se obter uma visão geral da diversidade genética existente dentro de cada espécie.

Estudos das relações genéticas em raças de asininos têm ocorrido principalmente devido a sua importância (Tambasco & Trovo, 1985). O conhecimento de que as características fenotípicas são herdáveis, levou o homem a utilizar marcadores morfológicos como parâmetro para a seleção de reprodutores e controle dos acasalamentos visando à manutenção das características de interesse zootécnico e comercial (Rosa, 1997).

A partir dos anos 50, as proteínas se tornaram úteis neste processo, por meio das análises isoenzimáticas e, com o advento da eletroforese protéica, um maior número de marcadores polimórficos (diferença existente entre indivíduos ou populações na seqüência de DNA em um determinado loco) pôde ser utilizado, para selecionar características de interesse. O fato de detectar-se apenas o produto final de genes funcionais pode subestimar a variabilidade genética destas populações, pois somente um número limitado de sistemas polimórficos (de 10 a 20%) é geralmente visualizado em cada espécie (Cunningham, 1990; Hetzel & Drinkwater, 1992; Arranz *et al.*, 1996).

Com o avanço das pesquisas em biologia molecular, novas técnicas surgiram para a caracterização genética de organismos superiores. Através do estudo do DNA pode-se verificar a existência de um grande número de marcadores genéticos polimórficos, os quais possuem um vasto potencial de utilização (Gibson & Smith, 1989).Dentre as vantagens de se utilizar os polimorfismos de DNA podem-se citar as seguintes: (i) são altamente polimórficos; (ii) a mesma técnica pode ser utilizada para qualquer segmento de DNA; (iii) a automatização é fácil e (iv) existem diferentes tipos de marcadores cada qual com seu mérito (Cavalli-Sforza 1998; Hanotte & Jianlin, 2005). Muitos destes estudos tornaram-se possíveis ou simplificados devido ao desenvolvimento de uma técnica *in vitro* de amplificação enzimática de segmentos alvo-específicos do DNA. O método foi denominado de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Marcadores moleculares com padrões de herança mendeliana distintos podem elucidar questões diferentes e importantes para a tomada de decisões na conservação de RGA (Recursos Genéticos Animais). A diferença na transmissão e nos padrões de evolução fazem com que marcadores citoplasmáticos, como o DNA mitocondrial (mtDNA), e os genes e seqüências do DNA nuclear reflitam aspectos diferentes da biologia e da história de uma população (Sunnucks, 2000).

Marcadores autossômicos, com herança bi-parental, como os microssatélites, são comumente utilizados para a identificação genética de indivíduos e análises de parentesco (Paiva *et al.*, 2004; Egito *et al.*, 2005a; Egito *et al.*, 2005c; Lara *et al.*, 2005), estimação da diversidade populacional e endogamia do rebanho (Giovambattista *et al.*, 2001; Toro *et al.*, 2003), diferenciação de populações, cálculos de distância genética, para elucidar a relação entre diferentes raças e suas origens (MacHugh *et al.*, 1998; Brenneman *et al.*, 2001; Mateus *et al.*, 2004); bem como estimar possíveis misturas raciais (Freeman *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2006).Pelas suas características os microssatélites tornaram-se rapidamente o marcador preferido nos estudos envolvendo a análise de estruturas populacionais, principalmente em projetos de conservação de RGA. Existem em abundância no genoma e estão amplamente reportados, possuem um alto grau de polimorfismos, são facilmente automatizados e utilizados em sistemas multiplexes (vários locos sendo analisados de uma única vez). Além disto, são altamente sensíveis a eventos de *bottlenecks* e a seleção (Brufort *et al.*, 2003), possuem seleção neutra, sendo a diversidade observada consequência da deriva genética e da mutação (Canon *et al.*, 2001).

Os microssatélites de DNA são sistemas polialélicos altamente variáveis compostos por DNA repetitivo *em tandem* em cada loco. As repetições *em tandem* são,

usualmente, simples dinucleotídeos – como (CA) n – mas podem ter até seis nucleotídeos de comprimento, estando distribuídos por todo o genoma (Litt & Luty, 1989; Moore *et al.*, 1991; Hetzel & Drinkwater, 1992). Os polimorfismos são gerados pelo número de vezes em que a seqüência se repete, sendo o comprimento do alelo determinado por PCR utilizando-se *primers* que flanqueiam a seqüência repetitiva. As diferenças no número de seqüências repetitivas podem ser facilmente distinguíveis, sendo que suas variações são herdadas como alelos de um loco genético simples (Barker, 1994). Os microssatélites formaram a base da maioria dos mapas genéticos das diferentes espécies animais que existem atualmente (Hetzel, 1993; Barker, 1994; Bruford *et al.*, 2003). Somado a este fato, está comprovada a conservação destas seqüências entre espécies altamente relacionadas, o que significa que estes marcadores podem ser compartilhados entre espécies diferentes (ex. bovinos, ovinos, caprinos e bubalinos), mediante a utilização de *primers* heterólogos (Moore *et al.*, 1991; Hetzel, 1993).

Sendo essencialmente haplóides e transmitidos uniparentalmente, o mtDNA e o cromossomo Y abriram uma nova perspectiva no estudo da genética de populações. Não existe recombinação em ambos compartimentos genômicos e, além disto, a informação que os mesmos fornecem é complementar. Enquanto o mtDNA informa sobre a contribuição materna na evolução da população em análise, o cromossomo Y fornece informações sobre a contribuição paterna (Bruford *et al.*, 2003).

O mtDNA é o marcador molecular mais utilizado em estudos de domesticação (Bruford *et al.*, 2003). Mais especificamente, o mtDNA é utilizado para identificar os prováveis ancestrais selvagens, o número de linhagens maternas na população em estudo e sua origem geográfica (Hanotte & Jianlin, 2005). Com estes dados pode-se traçar um padrão geográfico da diversidade e evolução de uma espécie, a dispersão e o fluxo gênico, verificar as expansões demográficas, a deriva genética e a miscigenação (Bruford *et al.*, 2003).

O mtDNA é formado por uma fita simples de DNA circular – assemelha-se a um plasmídeo – possui menos que 20kb na maioria dos mamíferos e está localizado no citoplasma celular, dentro da mitocôndria (organela celular responsável pela produção de energia). Possui três características fundamentais para este tipo de estudo: (i) permite à identificação da população ancestral que deu origem a população em estudo; (ii) é variável e estruturado geograficamente de forma a permitir a localização aproximada do ponto de domesticação e (iii) já que sua evolução é rápida e em uma taxa constante, é possível a datação da origem de determinado polimorfismo (Bruford *et al.*, 2003).

Embora seja extremamente informativo em estudos evolutivos, o mtDNA possui suas limitações. Por se portar como um único loco (haplótipo) e ser um marcador

extranuclear com uma dinâmica própria, não é um bom indicador para inferir a respeito da diversidade genética total. Além disto, devido à sua herança materna não se detecta o fluxo gênico mediado pelo macho, o qual tem fundamental importância na evolução dos animais domésticos e na dinâmica dos rebanhos na atualidade (Bruford *et al.*, 2003).

Como é possível verificar, existem diversos tipos de marcadores moleculares disponíveis atualmente. Com a intenção de uniformizar os dados gerados pelos diferentes laboratórios ao redor do mundo, visando à comparação entre laboratórios e a obtenção de um panorama geral da diversidade mundial, em 1995 a FAO, juntamente com a International Society of Animal Genetics (ISAG), criou um grupo de consultores que elaborou diretrizes e recomendações técnicas para a mensuração da diversidade genética em diversas espécies. O projeto, denominado MoDAD (Measurement of Domestic Animal Diversity; FAO, 1998), traçou uma estratégia para a estimativa da diversidade genética global em bovinos, ovinos, suínos e aves, a partir da recomendação de conjuntos de marcadores microssatélites, para cada espécie, tornando possível a comparação entre os diversos laboratórios. Em 2004, foram incluídas novas espécies, como por exemplo, os asininos, sendo também adicionados novos marcadores microssatélites às listas recomendadas anteriormente (FAO, 2004).

3.5. Caracterização Genética dos Asininos

Existem poucos trabalhos de caracterização desenvolvidos com a espécie asinina até o momento, sendo que as raças espanholas foram as mais estudadas. Os primeiros estudos de caracterização de asininos utilizaram polimorfismos protéicos para avaliar a diversidade da espécie (Niece & Kracht, 1967; Mengozzi *et al.*, 1982; Bowling & Nichel, 1985; Ketchum & Cothran, 1967), porém estes apresentaram um número limitado de marcadores polimórficos o que restringia a utilização destes marcadores.

Breen *et al.* (1994) utilizaram um conjunto de treze *locos* de marcadores microssatélites, isolados para eqüinos, em *Equus przewalskii*, e mais cinco espécies de *Equus*, dentre as quais o *Equus asinus* (asno doméstico). As amostras foram amplificadas via PCR, e foi verificado que este conjunto de marcadores poderia ser utilizado para estudo de diversidade genética com asininos, haja vista, seu sucesso de amplificação.

Aranguren-Mendez *et al.* (2001), analisaram a estrutura genética de cinco raças espanholas de asininos, baseado na análise de 13 marcadores microssatélites e verificaram que o número de alelos, a distribuição das frequências genotípicas e a heterozigosidade média foi similar entre as raças analisadas. Os dados indicaram que a diferença genética entre as raças

estudadas era de apenas 3,6%, enquanto que, dentro destas, era de aproximadamente 96%. Além disso, verificaram que o conjunto de marcadores utilizados era suficiente para testes de exclusão paternidade.

Em outro momento, Aranguren-Mendez *et al.*, (2002a), analisaram a estrutura populacional de cinco raças de asininos espanhóis (Andaluza, Catalana, Mallorquina, Encartaciones e Zamorano-Leonesa), uma raça de asinino africana (Moroccan) e ainda uma raça de equino (Merens), que foi utilizada no trabalho com *outgroup*. Assim, encontraram que a diferença genética entre as raças estudadas era de apenas 4,1%. Baseado na análise de 15 marcadores microssatélites, e a partir disso obtiveram um dendrograma onde as raças Andaluza e Moroccan, se agruparam separadamente dos demais asininos o que coincide com dados obtidos histórica e arqueologicamente.

Ainda em (2002b), Aranguren-Mendez *et al.*, analisaram a estrutura genética de 513 indivíduos das cinco raças espanholas citadas acima, baseando-se na análise de quinze marcadores microssatélites, confirmando a diferenciação genética das raças pelo agrupamento em diferentes *clusters*. O estudo demonstrou também, que a raça Catalana mostrou-se como a mais conservada, devido à sua alta variabilidade genética.

Jordana & Folch (1997) estudando a raça Catalana com doze marcadores microssatélites e sete marcadores protéicos, verificaram que o coeficiente de endogamia dentro das populações não foi estatisticamente significativo. Destacaram também que os marcadores microssatélites oferecem um maior conteúdo informativo perante aos marcadores protéicos. Além disso, verificaram que o conjunto de marcadores utilizados não foram suficientes para serem utilizados em testes de exclusão de paternidade.

Ivankovic *et al.* (2002) analisaram a diversidade genética de três populações de asininos da Croácia e verificaram que, baseado em oito *locos* microssatélites, apenas 2,7% da variação observada era devida a diferenças entre as populações. Os mesmos autores analisando a seqüência d-loop do mtDNA observaram a presença de 19 haplótipos os quais se agrupavam em três haplogrupos denominados Y, W e Ws.

A diversidade na seqüência do mtDNA, também foi analisada em seis raças de asininos espanhóis e duas raças de asininos africanas (Aranguren-Mendez *et al.*, 2004). Nesse trabalho, os pesquisadores analisaram a região do citocromo b obtendo seis haplótipos, sendo o SPAN-2, característico das raças africanas. Analisando a região D-LOOP do mtDNA, foram identificados sete haplótipos, dos quais se dividem em dois *clusters* principais, um composto pelos haplótipos (ATI 6; ATI 7; ATI 2 e ATI 4), encontrado somente em raças espanholas. Enquanto que, no outro *cluster*, formado por três haplótipos (ATI 5; ATI 3 e ATI 1), foi

dividido entre as raças espanholas e as raças africanas, encontrando apenas o haplótipo ATI 5 nas raças espanholas (Andaluza e Majorera) e os dois haplótipos restantes (ATI 1 e ATI 3) característico das raças africanas. Puderam concluir também que, os asininos descendem de duas linhagens maternas de origem, o *Equus asinus africanus* e o *Equus asinus somaliensis*, como descrito por outros autores (Adametz, 1943; Epstein, 1984; Clutton-Brock, 1987; Camac, 1989; Beja-Pereira, *et al.* 2004).

Em um estudo sobre a filogenia dos eqüídeos, comparou-se a variabilidade haplotípica do gênero *equus*, obtendo-se uma clara separação das espécies e subespécies (*E. caballus caballus*; *E. ferus przewalskii*; *E. asinus africanus*; *E. asinus somaliensis*; *E. hemionus onager*; *E. hemionus kulan*; *E. hemionus luteus*; *E. kiang holderi*; *E. hippotiris burchelli*) utilizando o estudo do mtDNA por Kruger *et al.* (2005).

A diferença entre asininos e eqüinos foram estudadas por, Xu *et al.*, (1996), sendo encontrado apenas 6.9% de diversidade nucleotídica entre as duas espécies, utilizando análise de mtDNA. Os dados concluem que essas espécies se divergiram a aproximadamente nove milhões de anos, sendo que, a domesticação dos asininos foi feita a aproximadamente seis milhões de anos atrás, dados que corroboram com outros autores.

Em um estudo sobre a diversidade do mtDNA e a estrutura populacional de quatro raças chinesas, Chen *et al.* (2006), obtiveram dois troncos de origem materna, baseadas na análise do mtDNA para as raças *Equus asinus africanus* e o *Equus asinus somalinsis* confirmando a teoria mais aceita pelos autores, de origem dos asininos domésticos. Beja-Pereira *et al.* (2004), estudando uma gama maior de raças oriundas da Ásia e África concluíram que os asnos atuais derivam dois troncos de origem materna sendo um o *Equus asinus africanus* e o outro *Equus asinus somalinsis*

No Brasil, a caracterização das diferentes raças de asininos domésticos existentes, baseia-se, quase que exclusivamente, em dados fenotípicos. Em contrapartida, a caracterização genética é livre de influências do ambiente, propiciando uma maior acurácia dos dados gerados, importante nas decisões a serem tomadas em programas de conservação ou na sua futura utilização (Fitzhugh & Strauss, 1992).

O estudo aprofundado da espécie asinina poderá auxiliar na preservação e conservação do germoplasma. Os ganhos na eficiência econômica podem ser resultado da utilização desse material genético, superando os custos requeridos na conservação destas raças. Algumas delas, que foram economicamente importantes em outro momento, coexistem raramente, ainda que possuam características com valores potenciais (Hall & Bradley, 1995).

**CAPÍTULO 2: DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA E ANCESTRALIDADE
MATERNA DE RAÇAS ASININAS PELA ANÁLISE DA
REGIÃO CONTROLE DO mtDNA**

RESUMO

Marcadores moleculares citoplasmáticos, com padrões de herança distintos podem elucidar questões diferentes e importantes para a tomada de decisões na conservação de Recursos Genéticos Animais. A diferença na transmissão e nos padrões de evolução faz com que estes marcadores, reflitam aspectos diferentes da biologia e da história de uma população. Os asininos estão associados a um vasto patrimônio de importância social, cultural, econômica e ecológica. Sua utilização baseia-se principalmente na agricultura, porém também são utilizados em serviços de carga e transporte, na produção de híbridos, bem como na alimentação humana em alguns países. Diversas são as teorias a respeito da origem dos asininos domésticos, sendo que a maioria dos autores indica que a existência de dois troncos ancestrais, um na região nordeste da África e outro na região do Oriente Médio. Acredita-se que os asininos tenham sido introduzidos no Brasil por volta de 1534, trazidos pelos colonizadores portugueses. Um total de 59 indivíduos de raças brasileiras de maior ocorrência foram incluídos: (jumento Brasileiro $n = 20$, jumento Nordestino $n = 19$ e jumento Pega $n = 20$) foram incluídos neste estudo. Analisando em um primeiro momento apenas as raças brasileiras, observou-se 23 sítios polimórficos, que se agruparam em 16 haplótipos. A diversidade haplotípica média observada foi de $0,769 \pm 0,052$. A raça Brasileira apresentou apenas um haplótipo, enquanto que a raça Nordestina apresentou 10 haplótipos, com diversidade haplotípica de $0,854 \pm 0,069$ e diversidade nucleotídica de 0,01283. Já na análise da raça Pega, sete haplótipos foram detectados, com diversidade haplotípica de $0,853 \pm 0,043$ e diversidade nucleotídica de 0,01748. Os haplótipos observados distribuíram-se em dois grandes haplogrupos, onde o jumento Brasileiro ficou mais próximo do jumento Pega. O jumento Nordestino mostrou-se mais distante das demais raças. Quando foram adicionadas as demais seqüências de outras regiões (África, Europa e Ásia) bem como dos eqüinos utilizados como *outgroup*, os resultados obtidos confirmaram a possível existência de dois troncos de origem dos asininos, sendo um asiático e outro africano. Pela análise molecular de variância

(AMOVA) encontrou-se que a variação entre as raças foi responsável por 28% do polimorfismo encontrado, sendo os 72% restantes explicados devido à variação dentro das raças. As raças brasileiras agruparam-se com as raças asiáticas e européias, ficando distantes do tronco de origem africana. Dados históricos demonstram que as raças naturalizadas de asininos derivam principalmente de raças ibéricas. Verificou-se ainda a existência de uma subdivisão entre os haplótipos asiáticos e, por conseguinte, entre os haplótipos brasileiros, o que sugere a existência de dois haplogrupos distintos de origem asiática.

Palavras-chave: jumentos, d-loop, raças crioulas, diversidade haplotípica.

ABSTRACT

Cytoplasmatic molecular markers, with different patterns of inheritance can explain different issues and important for the decision making in the conservation of animal genetic resources. The difference in transmission and in the patterns of evolution makes these markers reflect different aspects of biology and history of a population. The donkeys are associated with a vast heritage of social, cultural, economic and ecological importance. Their utilization is based mainly on agriculture, but they are also used for draft and transport, as well as for the production of hybrids, and as human food in some countries. There are several theories about the origin of domestic donkeys, and the majority of authors indicate that the existence of two ancestral trunks, a region in Northeastern Africa and another in the Middle East. It is believed that the donkeys have been introduced in Brazil around the year of 1534, brought by Portuguese settlers. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of three naturalized donkey breeds from Brazil, and verify its origin, by sequencing and analyzing the control region (d-loop) of mitochondrial DNA. A total of 59 individuals of Brazilian donkey breeds of higher occurrence were included: (Brazilian donkey $n = 20$; Northeastern donkey $n = 19$; and Pega donkey $n = 20$) were included in this study. Besides these, 70 sequences deposited in GenBank representing Asia, Africa and Europe continents, plus an outgroup (horse) were also included. Looking at first only the Brazilian breeds, 23 polymorphic sites were observed, grouped in 16 haplotypes. The average haplotypic diversity observed was 0.769 ± 0.052 . The Brazilian breed had only one haplotype, while the Northeastern donkey presented ten haplotypes, with an haplotypic diversity of 0.854 ± 0.069 and a nucleotide diversity of 0.01283. In the analysis of the Pega breed, seven haplotypes were detected, with an haplotypic diversity of 0.853 ± 0.043 and nucleotide diversity of 0.01748. The observed haplotypes are distributed in two major haplogroups, with the Brazilian donkey closer to the Pega donkey. The Northeastern donkey was the more distant

from the other breeds. When the sequences of the breeds from other regions were added (Africa, Europe and Asia), as well as the horses used as outgroup, the results confirmed the possible existence of two origin trunks of the donkeys, one Asian and one African. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the variation between breeds accounted for 28% of the polymorphisms found and the remaining 72% were explained by the variation within breeds. The Brazilian breeds grouped together with the Asian and European breeds, and were distant from the trunk of African origin. Historical data show that the naturalized donkey breeds are derived mainly from Iberian breeds. It was also found that there was a division between the Asian haplotypes, and therefore, among Brazilian haplotypes, suggesting the existence of two distinct haplogroups of Asian origin.

Keywords: donkeys, d-loop, Creole breeds, different haplotypes.

1. INTRODUÇÃO

Os asininos estão associados a um vasto patrimônio de importância social, cultural, econômica e ecológica. São utilizados para produção de híbridos e para os serviços de carga e transporte, bem como para a alimentação humana em alguns países (Cruz, 2002). Os asininos têm estado em contato com o homem ao longo de sua história, sendo um dos primeiros animais a ser domesticado (Pinzon, 1995). Diversas são as teorias a respeito da origem dos asininos domésticos, sendo a mais aceita a que indica a existência de dois troncos ancestrais, sendo um na região da bacia do Nilo e outro na região da bacia do Mediterrâneo (Beja-Pereira *et al.* 2004).

As raças brasileiras naturalizadas de asininos desenvolveram-se a partir de raças trazidas pelos colonizadores e foram submetidas à seleção natural em diferentes ambientes, para os quais desenvolveram características específicas de adaptação, sendo a presença e a frequência das formas alélicas a base da variação genotípica. Acredita-se que foram introduzidos no Brasil por volta de 1534, trazido das ilhas da Madeira e das Canárias (Mariante & Cavalcante, 2006). Segundo Torres & Jardim (1987) no tempo colonial podem ter havido introduções de jumentos portugueses, espanhóis e africanos.

Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética e averiguar a origem materna de três raças asininas de maior ocorrência no Brasil, mediante o sequenciamento e a análise de parte da região controle (*d*-loop) do DNA mitocondrial.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local de desenvolvimento

O estudo foi desenvolvido nas dependências do Laboratório de Genética Animal, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

2.2. Animais e raças analisadas

Foram analisadas amostras provenientes de 59 animais das três raças asininas naturalizadas sendo estas, a Brasileira (N=20), a Nordestina (N=19) e a Pêga (N=20).

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras sanguíneas processadas em até cinco dias após sua coleta em tubos contendo o EDTA a 10% como anticoagulante. O DNA genômico total foi extraído utilizando um procedimento inorgânico com altas concentrações salinas (Miller *et al.*, 1988).

Trinta e três seqüências da região controle do mtDNA depositadas no GenBank, representando um *outgroup* além de raças asininas originárias da África, Ásia e Europa foram incluídas nas análises, com o intuito de investigar a relação existente entre estas e as raças brasileiras (Tabela1).

Tabela 1. Amostras obtidas no *GenBank* de acordo com as suas regiões de origem, o número de animais representados e seu número de acesso .

Localidade	Sigla	N	Referência	Acessos
Europa	EUR	2	Ivankovic <i>et al.</i> , 2002	AF403063.1; AF403064.1
África	AFR	3	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2004	AY569545.1; AF532122.1; AF532126.1 AF532119.1; AF532122.1; AF532126.1; AY666165.1; DQ368560.1; DQ368566.1; DQ368596.1; DQ448879.1; DQ448881.1; DQ448895.1; DQ448902.1; DQ448952.1; DQ448955.1 a DQ448958.1; DQ448961.1; DQ448973.1; EF056055.1; EF056082.1; EF056083.1; EF056087.1; EF056093.1; EF056095.1; EF056100.1; EF056117.1
Ásia	ASI	23	Chen <i>et al.</i> 2006 Lei,C.Z <i>et al.</i> , 2002	
Equino	CAV	3	Beja-Pereira <i>et al.</i> , 2004	AY569548.1; AY569549.1; AY569550.1;

2.3. Amplificação da região controle do mtDNA

Uma seqüência de 643bp localizada na região controle (d-loop) foi amplificada utilizando-se os primers, j-dloop2 (5'-GCCCATTTCTTTCCCCTTAAA-3') e j-dloop4 (5'-GGGTTTGGCAAGATTGTGTT-3'), desenhados a partir da seqüência GI_1805746, descritas por Xu *et al.* (1996), nas seguintes condições: 1,5mM de MgCl₂, 0,25 µM de cada *primer*; 200µM de cada dNTP, 9-15ng de DNA e 1UI de Taq DNA polimerase. As PCRs foram realizadas seguindo a programação de 94°C/5' seguido de 30 ciclos a 94°C/1', 61°C/1' e 72°C/1', com extensão final de 72°C/30'. A amplificação dos fragmentos foi confirmada pela corrida em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídeo, com posterior visualização sob luz UV, de uma alíquota da PCR (3µl).

Após esta primeira amplificação as amostras foram purificadas de acordo com Werle *et al.*, (1994) utilizando as enzimas exonuclease I (exoI) e fosfatase alcalina de camarão (sAP). A exoI digere o excesso de *primers* da reação enquanto a sAP defosforila o excesso de dNTPs. As enzimas foram adicionadas à reação de amplificação na proporção de 1:1 (0,5UI de cada uma) e incubadas a 37° C por 30 minutos, seguidos de 20 minutos a 80° C.

A reação de seqüenciamento foi realizada pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (Sanger, 1988). Foi utilizado o kit Big Dye v.3 (Applied Biosystems) sendo a reação preparada em um volume final de 10µl com 1,6µM de *primer* e aproximadamente 10ng do DNA purificado com ExoI-sAP. A amplificação foi realizada em um termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700

(Applied Biosystem) programado para 96° C por 1 minuto, 25 ciclos a 96° C por 10 segundos, 50° C por 5 segundos e 60° C por 4 minutos.

As reações foram purificadas novamente antes de serem seqüenciadas utilizando EDTA e etanol. A eletroforese foi realizada em um seqüenciador automático ABI PRISM 3130.

2.4. Análise estatística

As seqüências foram alinhadas e editadas pelo programa SeqScape v 2.5 (Applied Biosystems) tendo como seqüência referência a seqüência GI_1805746 depositada no *GenBank*. As seqüências consenso, obtidas a partir do SeqScape, foram alinhadas posteriormente às demais obtidas no *GenBank* mediante o uso do programa MEGA v.3.0 (Kumar *et al.*, 2004) sendo o alinhamento checado posteriormente com o uso do programa DNA *alignment* (www.fluxus-engineering.com/align.htm). Nas análises realizadas as amostras foram agrupadas por continente.

Os índices de diversidade nucleotídica, a diversidade haplotípica e as distâncias dentro, entre e para toda a população foram obtidos mediante o uso dos programas Mega 3 (Kumar *et al.*, 2004), o ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000) e DNASP (Rozas *et al.*, 2003). A matriz de distância gerada baseou-se no modelo de substituição de Kimura 2-parâmetros. O dendrograma foi construído utilizando-se o agrupamento de *Neighbor-Joining* (*Consensus Network*), levando em consideração a possibilidade de miscigenação entre as populações (*Hybridization Network*). Esta análise foi implementada pelo programa SplitTree4 (Huson & Bryant, 2006). A filogenia das raças analisadas também foi verificada pela construção de uma rede haplotípica, pelo método de *median-joining* (MJN) (Bandelt *et al.*, 1999), utilizando-se o programa NETWORK 4.1.0.8. A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando-se o programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000).

3. Resultados e Discussão

3.1. Diversidade genética das raças de asininos naturalizados pela análise do DNA mitocondrial.

Pela análise da sequência de 596pb da região D-loop do DNA mitocondrial, observou-se 16 haplótipos nas 59 amostras utilizadas, sendo estes definidos por 23 sítios polimórficos, sendo 22 transições e uma transversão (Tabela 2). A raça Brasileira foi a que apresentou menor número de haplótipos, apresentando apenas um o qual também foi compartilhado com as demais raças em estudo. Na raça Nordestina foram detectados dez haplótipos sendo que nove destes foram específicos desta raça, enquanto que na raça Pêga foram encontrados sete haplótipos sendo seis destes específico para a raça (Tabela 2).

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou que a maior variação ocorre dentro das populações asininas (56,06%) enquanto que a variação entre raças é de 43,94% ($p < 0,001$), sendo o valor de F_{ST} observado de 0,4391. A diversidade nucleotídica interpopulacional foi de $0,005 \pm 0,001$ enquanto a diversidade total foi de $0,015040 \pm 0,001730$. Foi possível observar que não existe diversidade nucleotídica dentro da raça Brasileira enquanto que nas raças Nordestina e Pêga a diversidade nucleotídica foi de $0,017827 \pm 0,009841$ e de $0,023854 \pm 0,012821$, respectivamente (Tabela 3).

As raças naturalizadas de asininos apresentaram uma maior diversidade nucleotídica quando comparadas aos resultados de outros estudos. Esta maior diversidade é explicada pelo número de haplótipos encontrados nas raças naturalizadas. A exceção foi a raça Brasileira que apresentou apenas um único haplótipos, o que pode ser explicado pelo fato de que todas as amostras desta raça, incluídas neste estudo, serem oriundas de apenas um núcleo de conservação, situado em colina e pertencente ao Instituto de Zootecnia de São Paulo.

Tabela 3: Diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica estimada a partir da região d-loop do mtDNA, para cada uma das raças brasileiras naturalizadas.

Raça	Número de indivíduos	Número de Haplótipos	Diversidade Haplotípica	Diversidade Nucleotídica
Brasileiro	20	1	0,000 +/- 0,000	0.000000 +/- 0.000000
Nordestino	19	10	0,854 +/- 0,069	0.017827 +/- 0.009841
Pêga	20	7	0,853 +/- 0,043	0.023854 +/- 0.012821
Total	59	16	0,769 +/- 0,052	0,015040 +/- 0,001730

A maior distância genética foi observada entre as raças Brasileira e Nordestina (0,022) enquanto que a menor distância foi entre as raças Brasileira e Pêga (0,014). A distância genética observada para as raças Nordestina e Pêga foi de 0,018. A análise de *Network* revelou que as raças brasileiras se dividem em dois haplogrupos onde o jumento Brasileiro aparece próximo ao jumento Pêga sendo ambos encontrados principalmente na região Sudeste do Brasil (Figura 1).

Estes dados estão de acordo com a distribuição geográfica das raças, ou seja, as raças que estão geograficamente mais próximas estão geneticamente mais próximas. Estes dados sugerem a possível existência de mais de uma origem materna para a formação das raças naturalizadas, ou ainda que podem ter existido momentos distintos de introgressão de asininos no País.

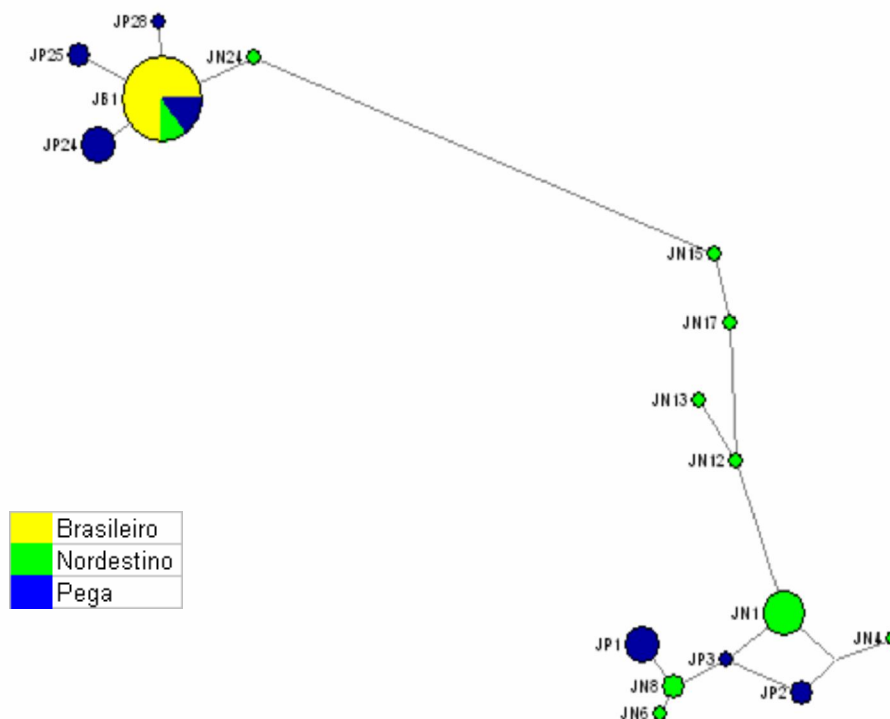


Figura 1. Rede (*Network*) contraída formada pelo método de median-joining (Bandelt *et al.*, 1999) demonstrando as linhagens de mtDNA observadas nas três raças asininas naturalizadas. Os círculos representam a frequência do haplótipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo.

3.2. Evidências genéticas da origem das raças de asininos criadas no Brasil

Pela análise molecular de variância (AMOVA) foi possível verificar que a variação entre as raças dos diferentes continentes foi responsável por 13,73% do polimorfismo encontrado, sendo o restante explicado pela variação dentro das raças. Nas análises aos pares (Tabela 5), verificou-se que não houve diferenciação significativa entre as raças brasileiras e os haplótipos asiáticos e europeus. Já em relação aos haplótipos africanos esta diferença foi significativa ($p < 0,001$).

A análise da sequência da região *d*-loop do DNA mitocondrial de raças naturalizadas de asininos, representa um primeiro passo na elucidação de questões a respeito da origem desta espécie no Brasil, já que a mesma foi realizada em comparação com sequências de raças de asininos da Ásia, Europa e África. Com isto foi possível verificar que

as raças de asininos naturalizados não se diferenciaram significativamente, quando comparadas às raças asiáticas e européias. Já em relação aos haplótipos africanos houve uma diferenciação significativa.

Dados históricos demonstram que as raças de asininos brasileiras derivam principalmente de raças ibéricas. Estudos relatam que a maioria das raças européias tem origem a partir do tronco asiático (Adametz, 1943; Epstein, 1984; Camac, 1989), o que elucidaria esta proximidade das raças naturalizadas com as raças asiáticas.

Tabela 4: Análise da variância molecular (AMOVA) nos diferentes níveis hierárquicos entre e dentro das raças asininas estudadas baseada na distância de Kimura 2P. (GL – graus de liberdade; * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).

Estrutura	Fonte de variação	GL	Varição (%)	Índice de fixação
Todas as Sequências	Entre populações	3	13,73	FST = 0,13733*
	Dentro das populações	88	86,27	
Brasil + Europa	Entre populações	1	11,87	FST = 0,11866
	Dentro das populações	59	88,13	
Brasil + Ásia	Entre populações	1	6,04	FST = 0,06042
	Dentro das populações	83	93,96	
Brasil + África	Entre populações	1	37,45	FST = 0,37454**
	Dentro das populações	62	62,55	

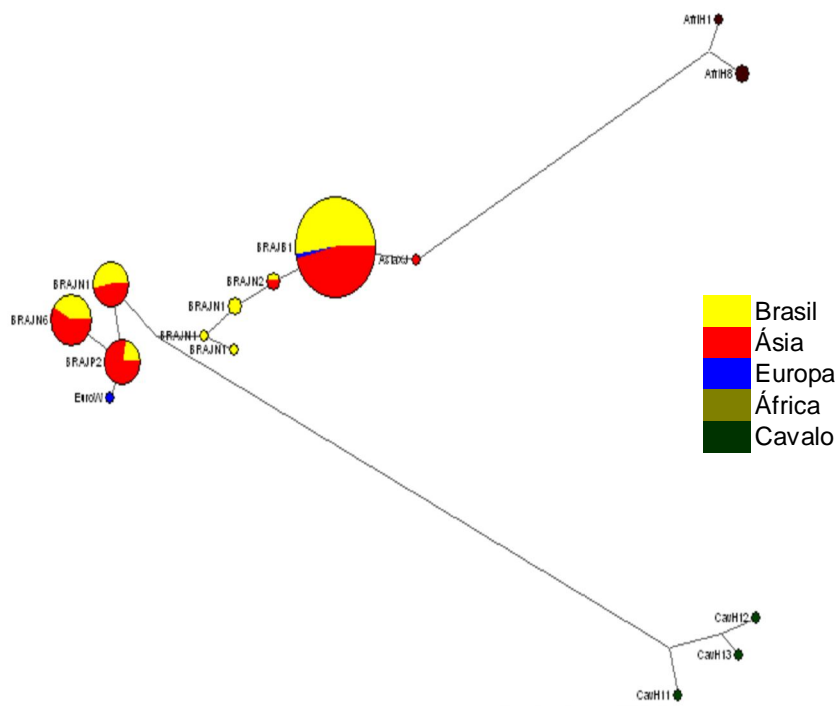


Figura 2. *Network* formada pelo método de median-joining demonstrando as linhagens de mtDNA observadas para as raças asininas em estudo. Os círculos representam as seqüências haplotípicas, sendo a área dos mesmos proporcionais à freqüência do haplótipo. O comprimento das linhas está relacionado aos passos mutacionais que separam cada haplótipo.

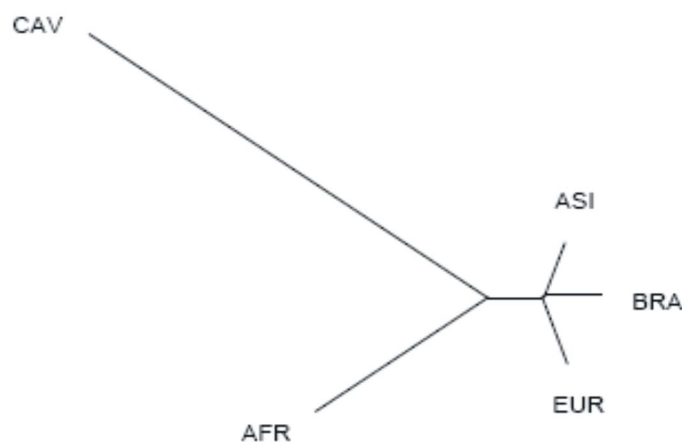


Figura 3. Árvore filogenética demonstrando a relação existente entre as raças dos diferentes continentes analisadas, inferida a partir da análise da seqüência do *d*-loop de 299bp baseada na distância de Kimura 2p e agrupamento pelo método de Neighbor-joining. ASI – Ásia; BRA – Brasil; EUR – Europa; AFR – África e CAV – *outgroup* eqüino.

Pelas análises filogenéticas foi possível observar a existência de dois troncos de origem, o que corrobora com a hipótese da maioria dos autores (Sotillo & Serano, 1985; Lorenzo, 1997, Adametz, 1943; Epstein, 1984; Clutton-Brock, 1987; Camac, 1989), sendo um compartilhado pelas raças brasileiras, européias e asiáticas, e outro dos haplótipos africanos (Figuras 2 e 3). Alguns autores (Beja-Pereira *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2005; Aranguren-Mendez *et al.*, 2004), descreveram esta existência de dois troncos de origem sendo um o Asno de Nubian (*Equus asinus africanus*) nativo da bacia do Nilo, e o outro o Asno Somaliense (*Equus asinus somaliensis*).

Pela análise de *network* verificou-se ainda a existência de uma subdivisão entre os haplótipos asiáticos e, por conseguinte, entre os haplótipos brasileiros, o que sugere a existência de dois haplogrupos distintos de origem asiática.

4. CONCLUSÕES

À exceção da raça Brasileira, as demais raças asininas estudadas possuem uma alta diversidade nucleotídica na região controle do mtDNA.

As raças asininas brasileiras possuem haplótipos de origem em comum com raças asiáticas e européias, oriundas do tronco *somaliensis*.

A subdivisão observada no tronco *somaliensis* sugere a existência de dois haplogrupos distintos a partir desta origem ou a possível existência de um maior número de centros de domesticação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMETZ, L. **Zootecnia General**. Labor, Madrid, Espanha, 1943, 192p.
- ARANGUREN-MÉNDEZ J.A., BEJA-PEREIRA A., AVELLANET R., DZAMA K., JORDANA J. Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish donkey breeds (*Equus asinus*). **J. Anim. Breed. Genet.**, v.121, p.319-330, 2004.
- BANDELT H. J.; FORSTER, P.; SYKES, B. C.; RICHARDS, M. B. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol. Biol. Evol.**, v.16, n.1, p.37-48, 1999.
- BEJA-PEREIRA, A.; ENGLAND, P. R.; FERRAND, N.; JARDAN, S.; BAKHIET, A. O.; ABDALLA, M. A.; MASHKOUR, M.; JORDANA, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G. African origins of the domestic donkey. **Science**, v.304, n.5678, p.1781, 2004.
- CAMAC R. O., **Introduction and Origins of the Donkey, in: Svendsen E.D. (Ed.), The professional handbook of the Donkey**, 2nd edn., The Donkey Sanctuary, Sidmouth, Devon, p.1-10, 1989.
- CHEN, S. Y.; ZHOU, F.; XIAO, H.; SHA, T.; WU, S. F.; ZHANG, Y. P. Mitochondrial DNA diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. **Anim Genet**, v.37, n.4, p.427-9, 2006.
- CLUTTON-BROCK, J. **A Natural History of Domestic Mammals**. Cambridge, MA: Cambridge University Press, British Museum of Natural History, 1987, 293p.
- CRUZ, L.A. **Ysigue la yunta andando**, (Universidad de Chapingo, México) 2002, 96p.
- EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; MARIANTE, A. DA S. **Situação atual da caracterização genética animal na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**. Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe - SIRGEALC. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999.
- EPSTEIN, H.; MASON, I. Cattle. In: Mason, L. (Ed.). **Evolution of domesticated animals**. London: Longman, p.6-27, 1984.

- HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Mol. Biol. Evol.**, v.23, n.2, p.254-67, 2006.
- IVANKOVIC, A.; KAVAR, T.; CAPUT, P.; MIOC, B.; PAVIC, V.; DOVC, P. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. **Anim Genet** 33(3), p.169-77, 2002.
- KUMAR, S.; DANIELL, H. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Brief. Bioinform.**, v.5, n.2, p.150-63, 2004.
- LOPEZ, C.; ALONSO, R.; DE ALUJA, A. S. Study of the genetic origin of the Mexican Creole donkey (*Equus asinus*) by means of the analysis of the D-Loop region of mitochondrial DNA. **Tropical Animal Health and Production**, 37(Suppl. 1), p.173-188, 2005.
- LORENZO, J.: **Conocimiento y conservacion de las razas autoctonas: El asno Zamorano-Leones, estudio del estado actual de la raza en la provincia de Zamora; valoracion general: Aspectos biopatologicos y funcionales.** Tesis Doctoral, Universidad de Leon, Leon, Espanha, 1997, 169p.
- MARIANTE, A. DA S.; CAVALCANTE, N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil.** Brasília: Embrapa Sede / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 274 p.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.3, p.1215, 1988.
- PINZÓN, E. Primero fué el Burro. **Revista Carta Ganadera.** Colombia, XXXII (8) , 33-39, 1995.
- ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, 19: p.2496–2497, 2003.
- SANGER, T. D. Optimal unsupervised learning. **Neural Net-works**, 1 (Supl. 1), 1988,127p.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis.** Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva 2000
- SOTILLO, J. L.; SERRANO, V. Produccion Animal 1. **Etnologia Zootécnica.** Tebar-Flores, Madrid, Espanha, 1985, 272p.
- TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros eqüinos.** São Paulo: Nobel. 1987. 654 p.

XU, X.; GULLBERG, A.; ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparison among four closely related mammalian species-pairs.

J. Mol. Evol., v.43, p.438-446, 1996.

WERLE, E.; SCHNEIDER, C.; RENNER, M.; VOLKER, M.; FIEHN, W. Estimation of the number of genetic markers required for individual animal identification accounting for genotyping errors. **Anim. Genet.**, v.37, n.4, p.387-9, 2006.

**CAPÍTULO 3 – DIVERSIDADE GENÉTICA DE RAÇAS ASININAS
CRIADAS NO BRASIL POR MEIO DE
MARCADORES MICROSSATÉLITES**

RESUMO

A diversidade genética animal, vem diminuindo nos últimos anos. Programas mundiais de preservação têm sido desenvolvidos devido à preocupação com a perda da diversidade genética causada pela extinção de raças e populações animais. Estes programas incluem, entre outros passos, a caracterização genética das espécies. Neste sentido, este estudo tem por objetivo caracterizar geneticamente as três principais raças de asininos criadas no Brasil, por meio da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites. Para este estudo, foi utilizado um total de 221 animais, representando três raças naturalizadas de asininos do Brasil, uma raça equina, utilizada como *outgroup*, e um conjunto de 15 locos microssatélites. Todos os locos genotipados foram polimórficos para todas as raças, com exceção da Raça Pêga que apresentou um único alelo para o loco ASB17. Observou-se um total de 91 alelos para todos os locos analisados. Os índices de diversidade, estimados para cada raça, demonstraram um número médio de aproximadamente seis alelos. As raças naturalizadas apresentaram maiores médias de riqueza alélica do que a raça equina Árabe. A raça Nordestina apresentou o maior número de alelos, entretanto foi a raça Brasileira a que obteve o maior valor de riqueza alélica. A heterozigosidade média observada e a heterozigosidade esperada variaram, respectivamente, de 0,4611 a 0,5681 e de 0,4657 a 0,6721. A maior estimativa de endogamia, levando-se em consideração apenas as raças de asininos, foi de 0,127, observada na raça Nordestina. Já o menor índice de endogamia foi detectado na raça Brasileira, de -0,044. A diversidade genética encontrada entre as raças (94,70%) foi inferior à encontrada dentro destas (5,30%) com valores significativos para $p < 0,001$. A variação encontrada de quase 19% foi mais alta, quando adicionado o *outgroup* equino. As distâncias genéticas mais altas foram observadas entre as raças Brasileira e Nordestina (0,2197), enquanto que as menores distâncias foram observadas entre as raças Pêga e Nordestina (0,0868). O conjunto de marcadores mostrou-se eficiente para o teste de probabilidade de exclusão de paternidade ($PE1=0,988$ e $PE2=0,999$). Com este estudo foi

possível confirmar a eficiência dos marcadores microssatélites na caracterização genética de asininos brasileiros.

Palavras - Chave: jumento, raças naturalizadas, estudo populacional, STR

ABSTRACT

The animal genetic diversity has decreased in recent years. Global preservation programs have been developed due to the concern about the loss of genetic diversity caused by extinction of breeds and animal populations. Among other steps, these programs include genetic characterization of the species. This study aims to genetically characterize the three major donkey breeds raised in Brazil, through the use of molecular markers of the microsatellite type. A total of 221 animals were used, representing three naturalized Brazilian donkey breeds, one horse breed, used as outgroup, and a set of 15 microsatellite loci. All polymorphic loci were genotyped for all breeds, except for the Pega breed that presented a single allele for the locus ASB17. There were a total of 91 alleles for all studied loci. The diversity indices, estimated for each breed, showed an average of approximately six alleles. The naturalized breeds presented higher mean allelic richness than the Arab horse breed. The Northeastern breed had the highest number of alleles, however was the Brazilian breed that presented the higher allelic richness. The average observed and expected heterozygosities ranged, respectively, from 0.4611 to 0.5681 and from 0.4657 to 0.6721. The higher inbreeding estimate, taking into account only the donkey breeds, was 0.127, presented by the Northeastern breed. The lowest rate of inbreeding was detected in the Brazilian breed, of -0.044. The genetic diversity found between breeds (94.70%) was lower than that found within these (5.30%) with significant values for $p < 0.001$. The variation found was approximately 19%, and was higher when the horse outgroup was added. The highest genetic distances were observed between the Brazilian and the Northeastern breeds (0.2197), whereas the lowest distances were observed between the Pega and Northeastern donkeys (0.0868). The panel of markers was efficient for the test of probability of paternity exclusion ($PE1 = 0.988$ and $PE2 = 0.999$). This study could confirm the efficiency of microsatellite markers in the genetic characterization of Brazilian donkeys.

Keywords: donkeys, naturalized breeds, populational study, STR

1. INTRODUÇÃO

Programas de conservação têm sido desenvolvidos no mundo devido à preocupação com a perda da diversidade genética causada principalmente pela extinção de raças e populações. A utilização e o desenvolvimento de recursos genéticos animais deverão estar baseados no reconhecimento do papel e do valor das raças localmente adaptadas, das raças exóticas, bem como dos cruzamentos entre essas (Mariante & Egito, 2002).

O estudo aprofundado das raças naturalizadas poderá auxiliar no desenvolvimento e no acompanhamento racional de futuros programas de melhoramento animal, bem como na preservação e conservação desse importante germoplasma (Mariante *et al.*, 2004). Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2000), elementos importantes nos programas de conservação incluem o inventário, a caracterização e a documentação dos dados obtidos.

Em termos de pesquisa, deve-se priorizar à caracterização e avaliação das populações nativas ou naturalizadas e a mensuração das diferenças entre e dentro das populações (Fitzhugh & Strauss, 1992). Barker (1994), no entanto, recomenda-se que representantes de raças comuns e economicamente importantes devam ser incluídas, em adição às raças raras, com o intuito de se obter uma visão geral da diversidade genética existente dentro de cada espécie.

A caracterização genética de populações, raças e espécies diferentes permite o estudo da variabilidade genética. O conhecimento da variabilidade, por sua vez, é fundamental para os programas de conservação genética de rebanhos em situação de risco (Tambasco *et al.*, 2000).

As raças naturalizadas de asininos do Brasil desenvolveram-se a partir de raças trazidas pelos colonizadores portugueses, e foram submetidas a anos de seleção natural em diferentes ambientes, para os quais desenvolveram características específicas de adaptação (Mariante & Cavalcante, 2006).

O estudo da diversidade e da variabilidade genética da espécie asinina pode auxiliar nas decisões a respeito de quais populações devem ser conservadas, quando os recursos são escassos, evitando a duplicação de esforços na manutenção de amostras. A partir dos resultados dos estudos de caracterização genética da espécie asinina, será possível comparar as raças naturalizadas e estimar distâncias genéticas entre as mesmas, dirimindo dúvidas que possam existir a respeito de suas unicidades, bem como auxiliar no monitoramento e na manutenção da máxima variabilidade genética (Egito *et al.*, 2002).

Por suas características os microssatélites são os marcadores preferidos em estudos envolvendo a análise de estruturas populacionais, principalmente em projetos de conservação de RGA (Bruford *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar geneticamente as três principais raças de asininos criadas no Brasil, por meio da utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e raças analisadas

Foram analisados 215 indivíduos pertencentes a três raças asininas criadas no Brasil, além da raça equina Árabe utilizada como *outgroup*. (Tabela 1). A relação das populações amostradas e suas localidades podem ser visualizadas nos anexos.

Tabela 1. Dados descritivos da amostra analisada contendo a raça, o código da mesma, número de populações e animais analisados, localidade e ano da coleta. (NP - número de populações amostradas; NA – número de animais amostrados)

Raça	Código	NP	Local da coleta	NA	Ano da coleta
J. Brasileiro	JB	1	Instituto de Zootecnia - Colina/SP	77	1997
J. Nordestino	JN	3	EMPARN – Pedro Avelino/RN	6	1996
			BBGA/Cenargen - Brasília/DF	31	1998
			São João do Piauí/PI	30	2009
J. Pega	JP	2	Fazenda Mula Preta - Uberaba/MG	22	2002
			Criatório Marju - Vassouras/RJ	26	2004
E. Árabe (outgroup)	EA	3	---	29	---

O DNA genômico foi obtido a partir de amostras sanguíneas processadas em até cinco dias após sua coleta em tubos contendo o EDTA a 10% como anticoagulante. O DNA genômico total foi extraído utilizando um procedimento inorgânico com altas concentrações salinas (Miller *et al.*, 1988).

2.2. Locus microssatélites tipados

Quinze locos microssatélites (ASB02; AHT04; ASB17; ASB23; COR07; COR58; COR82; HMS03; HMS07; HMS45; HTG07; LEX73; TKY312; TKY344 e UCDEQ425) foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) marcados com os fluorocromos 6-FAM, HEX, TET ou NED. A maioria dos locos microssatélites está sendo comumente utilizada por outros grupos ao redor do mundo tornando possíveis as futuras comparações ou a consolidação de bancos de dados. Somente os locos TKY 312 e TKY344 não estão incluídos na lista recomendada pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) e/ou ISAG (*International Society of Animal Genetics*) para o estudo de diversidade da espécie asinina no programa MoDAD. As referências e as seqüências dos *primers* utilizados encontram-se na tabela 2.

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um volume final de 20 μ l contendo 1,5mM de MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0,25 μ M cada um dos primers, 10-25ng de DNA e 1UI de Taq DNA polimerase. Os produtos amplificados foram eletroinjetados, em sistemas multiplexes de acordo com o explicitado na Tabela 3, em um seqüenciador automático de DNA (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems) e o filtro virtual D foi utilizado para a leitura das fluorescências. Um padrão interno marcado com Rox, desenvolvido pelo Dr. Dário Grattapaglia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Figura 1) foi utilizado para predizer o tamanho dos alelos. Os programas GeneScan 2.0 e Genotyper 2.1 (Applied Biosystems) foram utilizados para a genotipagem dos alelos observados.

O programa AlleloBin foi utilizado para classificar o tamanho dos microssatélites observados em alelos discretos representativos utilizando o algoritmo de minimização de quadrados mínimos de Idury & Cardon (1997).

Tabela 2. Condições de amplificação e multiplexes formados para os quinze locos microssatélites amplificados.

Loco	Fluorescência	Multiplex	MgCl ₂ (mM)	Anelamento (°C)	[Primer por reação (μM)]
HMS3	FAM	1	1,5	58°	0,25
HTG07	FAM	1	1,5	58°	0,25
COR07	HEX	1	1,5	58°	0,25
COR82	HEX	1	1,5	58°	0,25
ASB17	HEX	1	1,5	58°	0,25
HMS07	NED	2	1,5	60°	0,25
TKY344	FAM	2	1,5	60°	0,25
ASB02	FAM	2	1,5	60°	0,25
UCDEQ425	FAM	2	1,5	60°	0,25
HMS45	HEX	2	1,5	60°	0,25
LEX73	HEX	2	1,5	60°	0,25
TKY312	TET	3	1,5	60°	0,25
AHT04	TET	3	1,5	60°	0,25
ASB23	HEX	3	1,5	60°	0,25
COR58	TET	3	1,5	60°	0,25

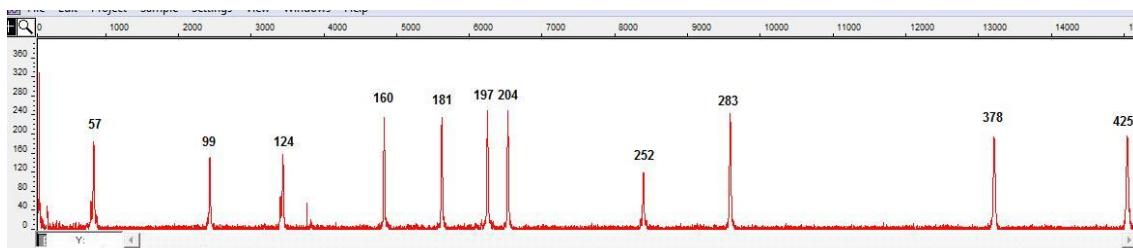


Figura 1. Padrão de peso molecular interno utilizado marcado com a fluorescência Rox.

Tabela 3. Locos microssatélites analisados, par de *primers* utilizado para sua amplificação e referências.

Loco	Primer (5' - 3')	Referência
HMS3	F=CCAACTCTTTGTCACATAACAAGA R=CCATCCTCACTTTTTCACTTTGTT	FAO, 2004; ISAG, 2004; Jordana & Folch, 1997; Aranguren-Mendez <i>et al.</i> , 2001.
HTG07	F=CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R=ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	FAO, 2004; ISAG, 2004; Aranguren-Mendez <i>et al.</i> , 2001.
COR07	F=GTGTTGGATGAAGCGAATGA R=GACTTGCCTGGCTTTGAGTC	FAO, 2004; ISAG, 2004.
COR82	F=GCTTTTGTCTCAATCCTAGC R=TGAAGTCAAATCCCTGCTTC	ISAG, 2004.
ASB17	F=GAGGGCGGTACCTTTGTACC R=ACCAGTCAGGATCTCCACCG	FAO, 2004; ISAG, 2004; Jordana & Folch, 1997; Aranguren-Mendez <i>et al.</i> , 2001.
HMS07	F=CAGGAACTCATGTTGATACCATC R=TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT	FAO, 2004; ISAG, 2004; Jordana & Folch, 1997; Aranguren-Mendez <i>et al.</i> , 2001.
TKY344	F=CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R=ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	-
ASB02	F=CCTTCCGTAGTTTAAGCTTCTG R=CACAACTGAGTTCTCTGATAGG	FAO, 2004; ISAG, 2004; Aranguren-Mendez <i>et al.</i> , 2001.
UCDEQ425	F=AGCTGCCTCGTTAATTCA R=CTCATGTCCGCTTGTCTC	ISAG, 2004 (Equino)
HMS45	F=TGTTACAGGTATTGGTAAACTGTGC R=GGAACAAGAAGAAATCACTAATGTC	ISAG, 2004.
LEX73	F=CCCTAGAGCCATCTCTTTACA R=CAGATCCAGACTCAGGACAG	ISAG, 2004.
TKY312	F=GGGAAGGACGATGAGTGAC R=CACCAGGCTAAGTAGCCAAAG	-
AHT04	F=AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R=CCCAGAGAGTTTACCCT	FAO, 2004; ISAG, 2004; Aranguren-Mendez <i>et al.</i> , 2001.
ASB23	F=GAGGTTTGTAATTGGAATG R=GAGAAGTCATTTTAACACCT	FAO, 2004; ISAG, 2004.
COR58	F=GGGAAGGACGATGAGTGAC R=CACCAGGCTAAGTAGCCAAAG	FAO, 2004; ISAG, 2004.

2.3. Análise estatística

A frequência alélica foi estimada por contagem direta. Parâmetros de diversidade dos locos e desempenho forense em testes de paternidade foram estimados para todos os microssatélites em conjunto (asinino e *outgroup*) e somente com as raças asininas, utilizando o programa CERVUS (Marshall *et al.*, 1998) incluindo: heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e a probabilidade de exclusão média (na ausência – PE1 – ou na presença – PE2 – de informações genéticas do segundo parental). As estatísticas F de Wright para cada loco foram calculadas utilizando a metodologia de Weir & Cockerham (1984) utilizando o programa FSTAT (Goudet, 2002).

Utilizando o programa GENEPOP foi realizado um teste exato (Rousset & Raymond, 1995) para determinar os desvios no Equilíbrio de Hardy–Weinberg (EHW) e a deficiência de heterozigotos. O método de cadeia de Markov (Guo & Thompson, 1992) foi utilizado para obter uma estimativa não enviesada pelo teste exato de P.

Estimativas de variabilidade genética para cada raça (H_e , H_o com seus desvios-padrão) foram calculadas utilizando a ferramenta Microsatellite do Excel (Park, 2001). O programa FSTAT foi utilizado para calcular a riqueza alélica (AR) padronizada para variações no tamanho amostral. A diferenciação racial foi estimada pelas estatísticas F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST}) e o valor P indicativo foi ajustado pelo procedimento de Bonferroni utilizando o mesmo pacote estatístico. Uma análise hierárquica de variância foi realizada pelo método de análise da variância molecular (AMOVA) implementado no pacote ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000).

A distância de Reynold's (F_{ST}) foi calculada utilizando-se o FSTAT. A probabilidade log da estatística G (Goudet, 2002) foi usada para estimar os valores P e uma significância aos pares foi estabelecida após a correção padrão de Bonferroni (Goudet, 2002). Um dendrograma foi gerado a partir da distância genética D_A pelos algoritmos de agrupamento *Neighbor-Joining* (NJ), sendo construído utilizando o programa SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2006).

Baseado nos genótipos dos quinze locos microssatélites, os indivíduos foram agrupados em um determinado número de populações e assinalados probabilisticamente a grupos inferidos pela metodologia Bayesiana implementada no programa STRUCUTRE (Pritchard *et al.*, 2000). Os testes foram realizados com base no modelo de miscigenação (*admixture model*) onde as frequências alélicas foram correlacionadas. Para escolher o

número apropriado de populações inferidas, foram realizadas várias análises com k (número de populações inferidas) variando de 2 a 8 e 300.000 interações (período “*burn-in*” de 30.000), com três repetições independentes para cada uma das análises. Os valores reais de k foram obtidos a partir da magnitude de Δk dada em função de k seguindo o proposto por Evanno *et al.* (2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante mencionar que este trabalho é o relato mais vasto sobre a estrutura genética e da diversidade das raças naturalizadas de asininos do Brasil.

Um total de 215 animais de três raças naturalizadas de asininos do Brasil e uma raça eqüina (Árabe), representando o *outgroup* foi analisado (Tabela 1). Todos os locos genotipados foram polimórficos para todas as raças, a exceção foi a raça Pêga que apresentou um único alelo para o loco ASB17. Observou-se um total de 91 alelos para todos os locos analisados. As freqüências alélicas observadas para cada loco microssatélite dentro de cada raça podem ser observadas nos anexos.

O número médio de alelos por loco foi de 6,07 (variando de 4 para os locos ASB02 e HMS45 a 12 para o HTG07). A tabela 4 resume as estatísticas descritivas específicas e os parâmetros de exclusão de paternidade para os quinze microssatélites estudados. Os dados apresentados levam em conta apenas a população asinina.

O número total médio de alelos observado para todos os locos, consolidado para todas as três raças, está de acordo com as estimativas observadas em outros estudos (Aranguren-Mendez *et al.*, 2001, 2002a e b; Jordana *et al.*, 1999; Ivankovic *et al.*, 2002).

Os dados genotípicos obtidos demonstram que, com base na heterozigosidade observada e na riqueza alélica, existe uma quantidade significativa de variabilidade genética nas populações de asininos criados no Brasil quando comparado com às demais raças estudadas na Europa (Aranguren-Mendez *et al.*, 2002a e b; Ivankovic *et al.*, 2002) e na Ásia (Chen *et al.* 2006).

Tabela 4. Estatísticas descritivas para os quinze locos microssatélites analisados para as três raças naturalizadas de Asininos: número de alelos (K), número de indivíduos analisados (N), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC), PE1 (poder de exclusão com apenas um parental conhecido), PE2 (poder de exclusão com dois parentais conhecidos), estatísticas de Wright (F_{IS} , e F_{ST}), PEC (probabilidade de exclusão combinada).

Loco	k	N	Ho	He	PIC	PE1	PE2	F_{IS}	F_{ST}
HMS03	5	160	0,55	0,566	0,483	0,164	0,288	0,1481	0,1341
HTG07	12	177	0,757	0,735	0,706	0,352	0,537	-0,1018	0,1973
COR07	6	161	0,571	0,749	0,703	0,337	0,513	0,2101	0,1389
COR82	5	165	0,345	0,403	0,378	0,085	0,228	0,0945	0,2724
ASB17	5	182	0,038	0,08	0,079	0,003	0,041	0,3616	0,2208
HMS07	5	176	0,403	0,38	0,356	0,075	0,21	0,0705	0,2045
TKY344	5	176	0,642	0,64	0,57	0,219	0,369	-0,0656	0,0778
ASB02	4	173	0,243	0,414	0,378	0,086	0,22	0,2638	0,1133
UCDEQ425	8	141	0,695	0,677	0,615	0,251	0,412	-0,0714	0,2093
HMS45	4	172	0,512	0,546	0,476	0,149	0,283	-0,0289	0,2835
LEX73	5	159	0,189	0,434	0,354	0,094	0,186	0,2004	0,4529
TKY312	5	149	0,57	0,614	0,557	0,2	0,359	-0,015	0,1207
AHT04	9	128	0,68	0,787	0,757	0,415	0,595	0,0539	0,1342
ASB23	8	172	0,587	0,659	0,595	0,241	0,397	0,1204	0,1771
COR58	5	146	0,63	0,679	0,615	0,251	0,411	-0,0482	0,1542
Média	6	162,5	0,49	0,557	0,508			0,0795	0,1927
PEC						0,988414	0,999748		

As heterozigosidades esperadas para cada loco, foram nominalmente maiores que as heterozigosidades observadas, oscilando de 0,08 (no loco ASB17) a 0,787 (no loco AHT04), exceto para os locos HTG07, HMS07 e UCDEQ425. A heterozigosidade observada variou de 0,038 (no loco ASB17) a 0,757 (para o loco HTG07).

Níveis variáveis de conteúdo de informação polimórfica (PIC) e, as probabilidades de exclusão de paternidade resultantes, variaram amplamente entre locos. Observou-se uma tendência geral esperada de um poder mais alto de exclusão de paternidade refletindo àqueles que apresentaram um número maior de alelos, embora esta relação não seja linear.

Os locos HMS3, HTG07, COR82, HMS07, UCDEQ425, HMS45, TKY312, AHT04, ASB23 estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Todos os outros locos apresentaram desvios significativos ($p < 0,05$) no EHW ou não puderam ser avaliados.

A menor estimativa de endogamia observada foi dentro do loco HGT07 (-0,1018) enquanto a maior foi detectada para o loco ASB17, sendo esta de 0,3616. Os valores estatísticos de F_{ST} demonstram a contribuição de cada marcador microssatélite para a diferenciação racial, os valores de F_{ST} variaram de 0,0778 no loco TKY344 a 0,4529 para o loco LEX73.

Valores significativos de diferenciação genética, calculados por F_{ST} , foram observados entre todas as raças. Estes valores de F_{ST} foram superiores quando comparados aos obtidos em outros estudos, tanto quando em comparação entre raças de asininos, quanto em comparação entre raças de eqüinos e de asininos (Xu *et al.*, 1996; Ivankovic *et al.* 2002).

A significância e os valores das estimativas globais de F_{ST} , entre todas as três raças para os quinze locos microssatélites, demonstram que estes marcadores podem ser utilizados como ferramentas poderosas para diferenciação das raças.

Os índices de diversidade estimados para cada raça demonstraram um número médio de alelos de aproximadamente seis (Tabela 5). As raças naturalizadas apresentaram diversidade superior à raça eqüina Árabe, com as maiores médias de riqueza alélica (acima de 8,5).

Uma avaliação do desempenho forense do conjunto de quinze microssatélites utilizados demonstrou que, para a maioria dos locos, pode-se obter um padrão consistente de poder de exclusão de paternidade. O conjunto de 15 marcadores foi capaz de excluir com uma probabilidade de 99,85 % um provável parental em testes onde o trio (ex. mãe – pai provável – cria) é conhecido. Estes valores podem ser considerados satisfatórios para espécies animais. Porém, antes de recomendar tais marcadores para provas de rotina, é imperativo validar este conjunto ou mesmo inserir ou substituir alguns marcadores por outros que apresentem um poder de exclusão maior.

Tabela 5. Resumo estatístico dos parâmetros genéticos populacionais observados para as três raças de Asininos e uma raça de Eqüino estudadas, baseado na média obtida com os quinze locos microssatélites (N – número de indivíduos; AR – riqueza alélica, i.e. média do número de alelos por locos levando-se em conta o número amostral; Ho – heterozigosidade observada; He - heterozigosidade esperada; F_{IS} – Coeficiente de Endogamia.

Raça	N	AR	He (SD)	Ho (SD)	F_{IS}
Jumento Brasileiro	74	9,067	0,4986 (0,0508)	0,5201 (0,0159)	-0,044
Jumento Nordestino	65	8,838	0,5668 (0,0534)	0,4953 (0,0174)	0,127
Jumento Pega	48	8,773	0,4657 (0,0600)	0,4611 (0,0199)	0,01
Eqüino Árabe (<i>outgroup</i>)	28	7,822	0,6721 (0,0472)	0,5681 (0,0280)	0,159

A raça Nordestina apresentou o maior número de alelos, entretanto foi a raça Brasileira a que obteve o maior valor de riqueza alélica.

A heterozigosidade média observada e esperada variou, respectivamente, de 0,4611 a 0,5681 e de 0,4657 a 0,6721. Em todas as raças, os valores de heterozigosidade observada foram nominalmente menores que os da heterozigosidade esperada, exceto na raça Brasileira.

As raças naturalizadas apresentaram diversidade superior à raça eqüina Árabe, o que corrobora o estudo realizado por Kruger et al. (2005). O maior número de alelos, assim como um maior coeficiente de endogamia, foi apresentado pela raça Nordestina, o que pode ser explicado pelo fato desta raça ter sofrido uma diminuição de aproximadamente 75% de sua população na década de 80. Já o fato de a raça Brasileira possuir uma maior riqueza alélica, porém com um coeficiente de endogamia inferior ao apresentado pelas demais raças, pode ser fundamentado pelo número de indivíduos analisados neste estudo e também pelo fato de todos os indivíduos amostrados fazerem parte de uma única população de um núcleo de conservação, ou seja, com controle zootécnico intenso onde os cruzamentos são dirigidos minimizando a endogamia e mantendo a variabilidade. Em relação a diversidade alélica, é possível que durante a formação do núcleo de conservação, tenha havido a aquisição de indivíduos de diferentes localidades.

Os valores de F_{IS} observados na raça Nordestina demonstram que embora a mesma tenha conseguido contornar os problemas relacionados à sua extinção e, atualmente, possua uma vasta população, pela sua importância sócio-cultural no Nordeste brasileiro,

sugere-se que maiores esforços sejam envidados visando manter a máxima variabilidade possível ainda existente nesta população. Como pontuado por Mariante & Egito (2002) as ações de conservação devem incluir a troca de reprodutores entre as propriedades e a criação de núcleos de conservação animais, como também, a expansão da coleta de germoplasma e sua criopreservação. Sugere-se que estas ações incluam uma ação anterior de caracterização genética onde se inclua um número maior de populações e uma amostragem que envolva a coleta de animais em outros Estados do Nordeste ainda não caracterizados; assim poder-se-ia identificar os animais mais representativos e com a maior variabilidade alélica possível. Caso não seja possível a implantação de novos núcleos de conservação, sugere-se que pelo menos os trabalhos de coleta e congelamento de sêmen desta raça, iniciados na década de 80 na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, sejam reforçados, incluindo doses de outros reprodutores no Banco de Germoplasma Animal desta Instituição.

Vários marcadores exibiram um déficit significativo de heterozigotos devido à endogamia dentro das populações (F_{IS}), nas raças analisadas. Este resultado também foi observado em outros trabalhos realizados com asininos em outros países (Aranguren-Mendez *et al.*, 2001, 2002b; Jordana *et al.*, 1999).

A divisão da estrutura populacional em diferentes níveis hierárquicos, para verificar o quanto da variação genética era devida a diferenças entre as raças ou dentro destas, demonstrou que a diferença observada entre as raças e/ou espécie analisada, em todas as estruturas testadas, é significativa ($p < 0,001$) (Tabela 6). O valor mais baixo observado foi entre as três raças naturalizadas de asininos (5,3%). Valores máximos de diferenciação foram encontrados ao comparar raças asininas e a raça eqüina, quase 19%. Quando todas as raças de asininos foram analisadas juntas, e contrastadas com a raça Árabe, observou-se quase 41% de variação entre as espécies. Os valores de diferenciação entre as raças naturalizadas de asininos foram superiores aos detectados por Ivankovic *et al.* (2002) de 2,7% em raças da Croácia e por Aranguren-Mendez *et al.* (2001) de 3,6% em raças espanholas. Demonstrando que as raças brasileiras apresentam uma maior variação genética entre si do que as raças espanholas e croatas.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) em diferentes níveis de estruturação entre e dentro das três raças de Asininos e raça Árabe de Equino estudadas; GL – graus de liberdade; ** $p < 0,001$.

Estrutura	Fonte de variação	GL	Variação (%)	Índice de Fixação
Raças Asininas	Entre populações	2	5.30	$F_{ST} = 0.05297^{**}$
	Dentro das populações	371	94.70	
Raças Asininas e Equino	Entre populações	3	19.57	$F_{ST} = 0.19568^{**}$
	Dentro das populações	426	80.43	
Raças Asininas X Equino Árabe	Entre populações	1	41.35	$F_{ST} = 0.41350^{**}$
	Dentro das populações	428	58.65	

As estimativas de diferenciação genética aos pares baseadas no modelo infinitésimo (F_{ST}) foram todas significativas após as correções de Bonferroni ($p < 0,01$), indicando que todas as raças podem ser consideradas entidades geneticamente independentes.

As distâncias genéticas mais altas foram observadas entre as raças Brasileira e Nordestina (Tabela 7). As menores distâncias foram observadas entre as raças Pêga e Nordestina.

Tabela 7. Estimativa aos pares de diferenciação genética e distância genética entre todas as três raças naturalizadas de asininos e a raça eqüina Árabe. As estimativas de F_{ST} estão acima na diagonal e abaixo se encontra a identidade genética de Nei's. Todas as estimativas de F_{ST} foram significativas ($p < 0,01$).

Raça	EA	JB	JN	JP
EA		0.3184	0.2867	0.3348
JB	0.3919		0.1451	0.1322
JN	0.3582	0.8028		0.0656
JP	0.3739	0.8497	0.9169	

Um dendrograma foi produzido a partir da reconstrução filogenética pelo método de agrupamento UPGMA baseado na matriz de distância genética D_A (Figura 2) em função da média dos valores obtidos a partir 10.000 bootstraps utilizando-se o programa MICROSAT. As raças de asininos e a raça eqüina agruparam-se em *clusters* distintos, como esperado. Com esta análise foi possível confirmar os resultados que dizem respeito às distâncias genéticas.

O agrupamento com $k = 2$ apresentou uma alta probabilidade e discriminou as espécies asininas e eqüina; Embora com $k = 4$ haja o agrupamento correto de todos os indivíduos dentro das suas respectivas raças, o valor real de k obtido utilizando-se o proposto por Evanno et al. (2005), ou seja, o número real de populações existentes na amostra analisada é igual a cinco (Figura 3) , Esta análise baseia-se no gráfico da figura 4 onde é possível observar o número real de k (populações existentes no conjunto) dado em função da magnitude de ΔK . Duas possibilidades foram observadas, populações formadas pelas duas espécies ($k=2$) e por todas as populações analisadas havendo uma sub-estruturação na população de jumentos Nordestinos ($k=5$). Também pode ser observado um grau de miscigenação elevado entre as raças locais (Figura 3, $k=5$).

Pela análise do STRUCTURE foi possível diferenciar as duas espécies, assim como todas as raças estudadas. Esta análise ainda demonstrou que existe uma subestruturação na população Nordestina. Este fato pode estar refletindo diferenças geográficas ou temporais. Uma das subpopulações é oriunda da coleta de sangue realizada em 1997 no Núcleo de Conservação de Jumentos Nordestinos que pertencia à EMPARN (Empresa de Pesquisa do Rio Grande do Norte) enquanto que a outra população foi coletada 12 anos depois no Estado do Piauí.

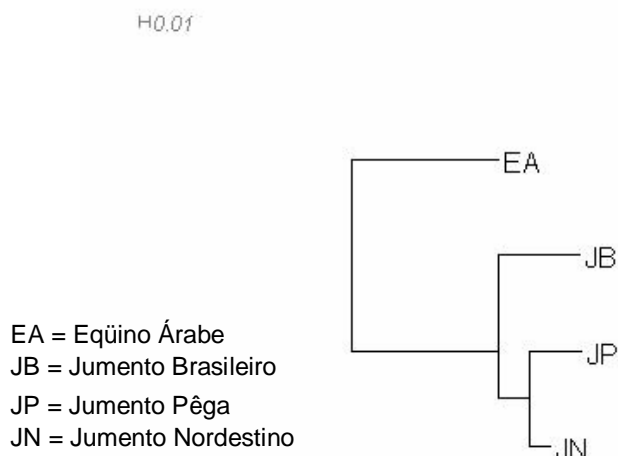


Figura 2. Dendrograma gerado utilizando-se o método de UPGMA a partir dos 15 locos analisados.

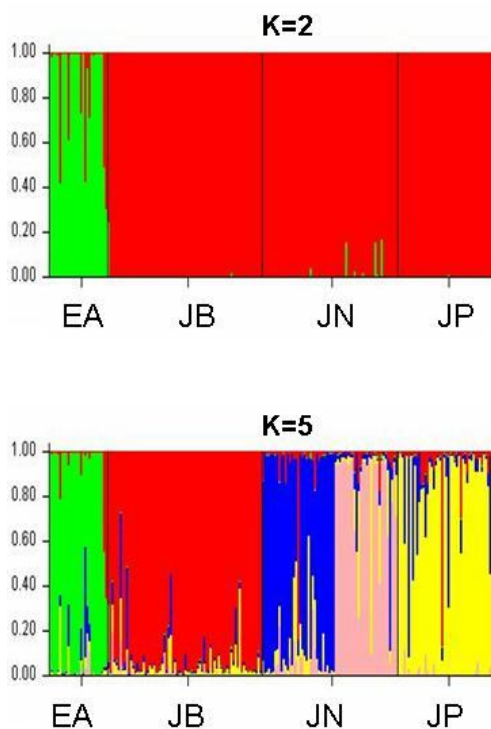


Figura 3. Agrupamento individual dos 215 indivíduos das três raças asininas brasileiras, inferido pelo método estatístico Bayesiano utilizando-se o programa STRUCTURE. Cada um dos 215 animais é representado por uma linha vertical dividida em segmentos classificados de acordo com a cor e tamanho corresponde à proporção relativa do genoma do animal correspondendo a um agrupamento particular. As diferentes raças estão identificadas pelos números sendo EA=Eqüino Árabe, JB= Jumento Brasileiro, JN= Jumento Nordestino e JP = Jumento Pega.

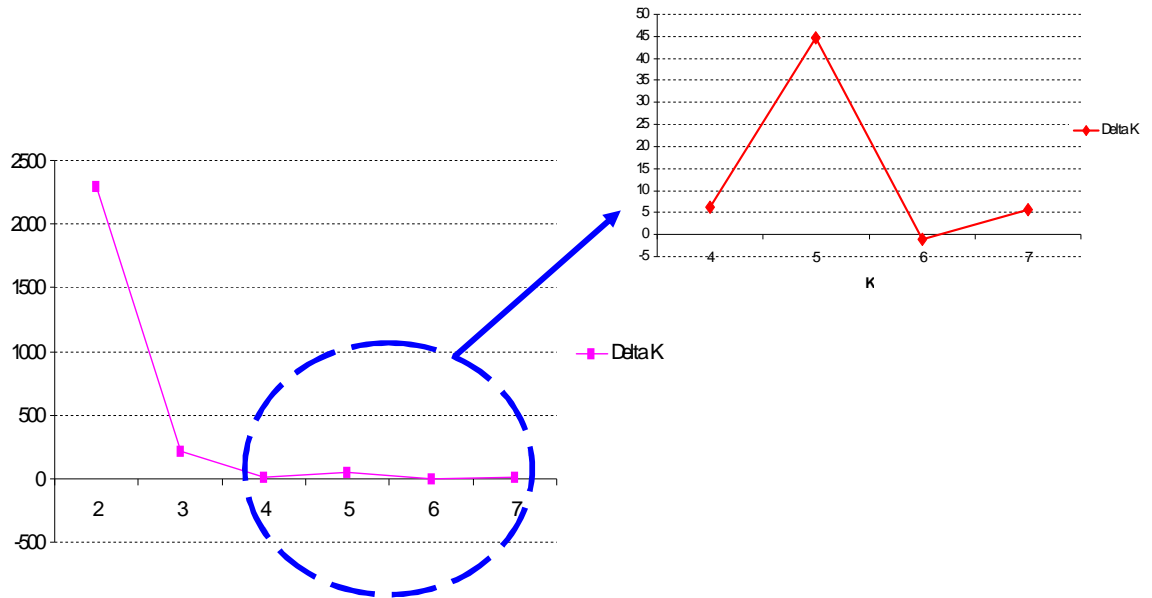


Figura 4. Magnitude de ΔK em função de K dada pela média das 7 corridas independentes com 500.000 interações cada e período de *burn-in* de 50.000. No detalhe está apresentada a magnitude de ΔK em função de K sem se levar em conta o *outgroup* equino. O valor que sobressai representa o valor real de K para a população asinina analisada (número de populações reais existentes).

4. CONCLUSÕES

O painel de marcadores microssatélites utilizados neste estudo se mostrou eficaz no estudo da variabilidade genética dentro e entre as raças naturalizada de asininos do Brasil. Isto resultou em um panorama geral da situação da variabilidade dos asininos brasileiros.

A diversidade genética encontrada foi semelhante à diversidade identificada em outros estudos de diversidade na espécie.

A partir desta análise, pode-se considerar que as raças estudadas são entidades genéticas distintas.

O conjunto de quinze marcadores microssatélites utilizado neste estudo pode ser empregado com eficiência para a análise de exclusão de paternidade da espécie asinina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; GÓMEZ, M., Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. **Genet Sel Evol**, v.33, n.4, p.433-42, 2001.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; GÓMEZ, M. Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.119, p.256-263, 2002.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; GÓMEZ, M.; JORDANA, J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. **Heredity**, v.89, n.3, p.207-11, 2002b.
- BARKER, J. S. F. **A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds.** World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Canada. p.501-508, 1994.
- CHEN, S. Y.; ZHOU, F.; XIAO, H.; SHA, T.; WU, S. F.; ZHANG, Y. P. Mitochondrial DNA diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. **Anim Genet**, v.37, n.4, p.427-9, 2006.
- FAO. **World Watch List for domestic animal diversity.** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2000, 726 p.
- MARIANTE, A. DA S.; EGITO, A. A.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; MCMANUS, C.; Manutenção, Enriquecimento E Caracterização De Raças Naturalizadas, Visando A Identificação De Alelos Relacionados A Caracteres Produtivos. **Circular Técnica, EMBRAPA**, 2004.
- FITZHUGH, H. A.; STRAUSS, M. S. Management of global animal genetic resources organizational and institutional structure. In: Hodges, J. (Ed.). **The management of global animal genetic resources. Proceedings of an FAO Expert Consultation.** Rome: FAO, 1992. Management of global animal genetic resources organizational and institutional structure, p.309.

- EGITO, A. A.; FUCK, B. H.; SPRITZE, A. L.; OLIVEIRA, R. R.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. S.; RIBEIRO, M. N.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAIVA, S. R.; CASTRO, S. R.; SANTOS, S. A. RAPD markers utilization on the formation or maintenance of conservation nuclei of livestock species. **Arch. Zootec.**, v.54, p.277-281, 2005.
- EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Mol Ecol**, 14: p. 2611–2620, 2005.
- FAO. **Secondary guidelines for development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers.** 2004. <<http://dad.fao.org>>; acesso em: 02/03/2007.
- GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v.48, n.2, p.361-72, 1992.
- GOUDET, J. **FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3.2).** 2002. <http://www2.unil.ch/izea/sotwares/fstat.html>;
- HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Mol. Biol. Evol.**, v.23, n.2, p.254-67, 2006.
- IDURY, R. M.; CARDON, L. R. A simple method for automated allele binning in microsatellite markers. **Genome Res.**, v.7, n.11, p.1104-9, 1997.
- JORDANA J.; FOLCH P., The Catalanian donkey breed: program of conservation and improvement of an endangered breed, **Arch. Zootec.** 47, p.403-409, 1997.
- JORDANA, J.; CUENCA, R.; PONSÀ, M.; GÓMEZ, M.; PASTOR, J.; ARANGUREN, J. A.; GARCÍA, E.; ALAOUI, N. Las razas asnales españolas: conservación de recursos genéticos. **ITEA**, v.20, p.351-353, 1999.
- KRUGER, K.; GAILLARD, C.; STRANZINGER, G.; RIEDER, S. Phylogenetic analysis and species allocation of individual equids using microsatellite data. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.121, n.suppl 1, p.70-86, 2005.
- MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.223-35, 2002.
- MARSHALL, T. C.; SLATE, J.; KRUK, L. E.; PEMBERTON, J. M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Mol Ecol**, v.7, n.5, p.639-55, 1998.

- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Res.**, v.16, n.3, p.1215, 1988.
- PARK, S. D. E. **Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetics Effects of Selection.** (PhD thesis). University of Dublin, Dublin, Ireland, 2001.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, n.2, p.945-59, 2000.
- ROUSSET, F.; RAYMOND, M. Testing heterozygote excess and deficiency. **Genetics**, v.140, n.4, p.1413-9, 1995.
- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin version 2000: a software for population genetics data analysis.** Geneva, Switzerland: Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva 2000.
- TAMBASCO, A. J.; TROVO, J. B. F.; BARBOSA, P. F., **Estudo cromossômico em raças naturalizadas de bovinos.** Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Balneário Camboriú, SC. 1985. 122 p.
- TAMBASCO, D. D.; ALENCAR, M. M.; COUTINHO, L. I.; TAMBASCO, A. J.; TAMBASCO, M. D.; REGITANO, L. C. A., Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Rev. Bras. Zootec.**, v.29, p.1044-49, 2000.
- XU, X.; GULLBERG, A.; ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparison among four closely related mammalian species-pairs. **J. Mol. Evol.**, v.43, p.438-446, 1996.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-70, 1984.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho descreve a utilização de marcadores moleculares microssatélites e de sítios polimórficos no DNA mitocondrial no estudo da diversidade genética e da estrutura de raças asininas criadas no Brasil. Obteve-se neste estudo um panorama geral da situação da variabilidade genética dos asininos brasileiros. Acredita-se que este seja o primeiro estudo amplo e detalhado realizado, até o momento, que englobe as três raças asininas naturalizadas, as quais possuem uma maior ocorrência no Brasil. Embora existisse um conhecimento histórico a respeito da introdução destas populações, estes dados eram esparsos e pouco consistentes e muito pouco se sabia a respeito de sua composição genética.

Com base nos resultados obtidos foi possível verificar que:

- Todas as raças analisadas podem ser consideradas entidades genéticas distintas e são oriundas do tronco *somaliensis*;
- Pela subdivisão observada no tronco *somaliensis* sugere-se a existência de dois haplogrupos distintos a partir desta origem ou a possível existência de um maior número de centros de domesticação;
- A diversidade genética observada na população brasileira foi semelhante à diversidade identificada em outros estudos publicados com raças de outros países/regiões;
- Pode-se considerar que o trabalho de conservação realizado pelo Núcleo de Conservação de Jumentos Brasileiros do Instituto de Zootecnia de SP foi bem

sucedido, uma vez que esta população apresentou dados de diversidade genética superior às demais raças analisadas.

A partir deste trabalho sugere-se a realização de estudos complementares que possam maximizar os resultados obtidos visando aumentar a acurácia das informações obtidas até este momento, sendo estes:

- Um maior número de seqüências de diversas regiões do mundo deve ser incluído no estudo para que se tenha com maior precisão, dados de origem e domesticação das raças asininas naturalizadas.
- Populações ainda não representadas, principalmente da raça Nordestina devem ser incluídas em estudos posteriores, a fim de averiguar melhor a alta consangüinidade e a subestruturação observada, bem como, auxiliar no planejamento de estratégias de conservação que visem preservar esta raça.
- Um estudo complementar envolvendo a análise do cromossomo Y deve ser feito para complementar a análise do mtDNA.

Finalizando, sugere-se que ações de conservação sejam implementadas e/ou ampliadas nas raças asininas naturalizadas incluindo a troca de reprodutores entre as propriedades e a criação de núcleos de conservação, como também, a expansão da coleta de germoplasma e sua criopreservação, com o intuito de salvaguardá-las de uma provável redução de sua variabilidade genética que poderá levar à extinção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMETZ, L. **Zootecnia General**. Labor, Madrid, Espanha. 1943, 192p.
- AEPGA, 2007, **A Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino**, disponível em:
<http://www.aepga.pt/portal/PT/109/default.aspx>, acesso em:20/08/2008.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; GÓMEZ, M. Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. **Genet Sel Evol**, v.33, n.4, p.433-42, 2001.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; JORDANA, J.; GÓMEZ, M. Genetic conservation of five endangered Spanish donkey breeds. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.119, p.256-263, 2002a.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J.; GÓMEZ, M.; JORDANA, J. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. **Heredity**, v.89, n.3, p.207-11, 2002b.
- ARANGUREN-MÉNDEZ, J. A.; BEJA-PEREIRA, A.; AVELLANET, R.; DZAMA, K.; JORDANA, J. Mitochondrial DNA variation and genetic relationships in Spanish donkey breeds (*Equus asinus*). **J. Anim. Breed. Genet.**, v.121, p.319-330, 2004.
- ARRANZ, J. J.; BAYON, Y.; SAN PRIMITIVO, F. Comparison of protein markers and microsatellites in differentiation of cattle populations. **Anim. Genet.**, v.27, n.6, p.415-9, 1996.
- BANNIKOVA, L. V.; ZUBAREVA, A. Genetic structure of some native and commercial breeds of cattle (*Bos taurus*) from Eurasia. **Russian. J. Genet.**, v.31, p.697-708, 1995.
- BARKER, J. S. F. **A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds**. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, Canadá, p.501-508, 1994.
- BEJA-PEREIRA, A.; ENGLAND, P. R.; FERRAND, N.; JARDAN, S.; BAKHIET, A. O.; ABDALLA, M. A.; MASHKOUR, M.; JORDANA, J.; TABERLET, P.; LUIKART, G. African origins of the domestic donkey. **Science**, v.304, n.5678, p.1781, 2004.

- BJORNSTAD, G.; GUMBY, E.; ROED, K. H. Genetic structure of Norwegian horse breeds. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.117, p.307-17, 2000.
- BOWLING, A. T.; NICKEL, L. S. Inheritance of Equus asinus serum albumin variants in hybrid offspring. **J Hered**, v.76, n.1, p.73-4, 1985.
- BREEN, M.; DOWNS, P.; IRVIN, Z.; BELL, K. Intrageneric amplification of horse microsatellite markers with emphasis on the Przewalski's horse (*E. przewalskii*). **Anim Genet**, v.25, n.6, p.401-5, 1994.
- BRENNEMAN, M. A.; WEISS, A. E.; NICKOLOFF, J. A.; CHEN, D. J. Detection of origin between two bloodlines of Romosinuano cattle using microsatellite screening. **Trop. Agric.**, v.78, p.255-62, 2001.
- BRUFORD, M. W.; BRADLEY, D. G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. **Nat. Rev. Genet.**, v.4, n.11, p.900-10, 2003.
- CAMAC, R. O. **Introduction and Origins of the Donkey**, in: Svendsen E.D. (Ed.), The professional handbook of the Donkey, 2 ed., The Donkey Sanctuary, Sidmouth, Devon, p. 1-10, 1989.
- CANON, J.; ALEXANDRINO, P.; BESSA, I.; CARLEOS, C.; CARRETERO, Y.; DUNNER, S.; FERRAN, N.; GARCIA, D.; JORDANA, J.; LALOE, D.; PEREIRA, A.; SANCHEZ, A.; MOAZAMI-GOUDARZI, K. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. **Genet. Sel. Evol.**, v.33, n.3, p.311-32, 2001.
- CAVALLI-SFORZA, L. The DNA revolution in population genetics. **TIG**, v.14, n.2, p.60-65, 1998.
- CHEN, S. Y.; ZHOU, F.; XIAO, H.; SHA, T.; WU, S. F.; ZHANG, Y. P. Mitochondrial DNA diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. **Anim Genet**, v.37, n.4, p.427-9, 2006.
- CLUTTON-BROCK, J. **A Natural History of Domestic Mammals**. Cambridge, MA: Cambridge University Press, British Museum of Natural History, 1987, 293p
- CUNNINGHAM, E. P. **Quantitative approaches to animal improvement**. 4th World Congress Genetic Applied Livestock Production. Edinburgh, p.4-14, 1990.
- DARWIN, C. A origem das espécies e a seleção natural. Tradução E. N. Fonseca. Curitiba: Ed. Hemus/Novo Século, 2000 1859, 786 p.
- DOMINGUES, O. Introdução à Zootecnia. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola - Ministério da Agricultura. 1968. 386 p. (Série didática - n.º 5).

- EGITO, A. A. **Uso de marcadores RAPD na identificação e caracterização genética de raças bovinas existentes no Brasil.** 95 p. (Dissertação de mestrado). Departamento de Genética, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 1995.
- EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; MARIANTE, A. DA S. **Situação atual da caracterização genética animal na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.** Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe - SIRGEALC. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1999.
- EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; PAPPAS, M. C. R.; PAIVA, S. R.; GRATTAPAGLIA, D.; McMANUS, C.; CASTRO, S. R.; ALMEIDA, L. D.; CUNHA, P. A.; MARIANTE, A. DA S. **Polimorfismo Lisina-232/Alanina no Gene *DGATI* em Raças Bovinas Criadas no Brasil.** Embrapa. Brasília, p.8. 2005a
- EGITO, A. A.; FUCK, B. H.; SPRITZE, A. L.; OLIVEIRA, R. R.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. DA S.; RIBEIRO, M. N.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; PAIVA, S. R.; CASTRO, S. R.; SANTOS, S. A. RAPD markers utilization on the formation or maintenance of conservation nuclei of livestock species. **Arch. Zootec.**, v.54, p.277-281, 2005.
- EGITO, A. A.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; ABREU, U. G. P. DE; McMANUS, C.; CASTRO, S. T. R.; MARIANTE, A. DA S.; GRATTAPAGLIA, D. **Desempenho de marcadores de DNA para determinação de parentesco na raça bovina Pantaneira.** 42a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Goiânia: SBZ. 2005c.
- EPSTEIN, H.; MASON, I. Cattle. In: Mason, L. (Ed.). **Evolution of domesticated animals.** London: Longman, p.6-27, 1984.
- FAO. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original Working Group Report. In: (Ed.). **Book Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original Working Group Report.** Rome: FAO, 1998. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original Working Group Report.
- FAO. **World Watch List for domestic animal diversity.** Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2000. 726 p.
- FAO. **Secondary guidelines for development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers.** 2004. <<http://dad.fao.org>>; acesso em: 02/03/2007.

- FERREIRA, M. E. F.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa - Cenargen. 1996. 220 p.
- FITZHUGH, H. A.; STRAUSS, M. S. Management of global animal genetic resources organizational and institutional structure. In: Hodges, J. (Ed.). **The management of global animal genetic resources. Proceedings of an FAO Expert Consultation**. Rome: FAO, 1992. Management of global animal genetic resources organizational and institutional structure, p.309
- FREEMAN, A. R.; MEGHEN, C. M.; MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R. T.; ACHUKWI, M. D. Admixture and diversity in West African cattle populations. **Mol. Ecol.**, v.13, n.11, p.3477-87, 2004.
- FREEMAN, A. R.; BRADLEY, D. G.; NAGDA, S.; GIBSON, J. P.; HANOTTE, O. Combination of multiple microsatellite data sets to investigate genetic diversity and admixture of domestic cattle. **Anim. Genet.**, v.37, n.1, p.1-9, 2006.
- GIBSON, J. P.; SMITH, C. The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies. In: Moo-Young, M., et al (Ed.). **Animal Biotechnology: Comprehensive Biotechnology**. The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies, p.204-31, 1989.
- GIOVAMBATTISTA, G.; RIPOLI, M. V.; PERAL-GARCIA, P.; BOUZAT, J. L. Indigenous domestic breeds as reservoirs of genetic diversity: the Argentinean Creole cattle. **Anim. Genet.**, v.32, n.5, p.240-7, 2001.
- HALL, S. J. G.; BRADLEY, D. G. Conserving livestock breed biodiversity. **TREE**, v.10, n.7, p.267-70, 1995.
- HANOTTE, O.; JIANLIN., H. **Genetic characterization of livestock populations and its use in conservation decision-making**. The role of Biotechnology for the characterization of crop, forestry animal and fishery genetic resources. Turim, p.131-136, 2005.
- HETZEL, D. J. S.; DRINKWATER, R. D. The use of DNA technologies for the conservation and improvement of animal genetic resources. In: Hodges, J. (Ed.). **The management of global animal genetic resources. Proceedings of an FAO Expert Consultation**. Rome: FAO. The use of DNA technologies for the conservation and improvement of animal genetic resources, 1992, 309p.
- HETZEL, J. Livestock genome research on the march. **Nat. Genet.**, v.4, n.4, p.327-8, 1993.

- IVANKOVIC, A.; KAVAR, T.; CAPUT, P.; MIOC, B.; PAVIC, V.; DOVC, P. Genetic diversity of three donkey populations in the Croatian coastal region. **Anim Genet** 33(3), p.169-77, 2002.
- JORDANA, J.; FOLCH, P. The Catalanian donkey breed: program of conservation and improvement of an endangered breed, **Arch. Zootec.** 47, 403-409, 1997.
- KETCHUM, M. S.; COTHRAN, E. G. Examination of the protease inhibitor system of *Equus asinus* using 1-D acid PAGE. **Anim. Genet.**, v.20, n.Suppl. 1, p.66, 1989.
- KRUGER, K.; GAILLARD, C.; STRANZINGER, G.; RIEDER, S. Phylogenetic analysis and species allocation of individual equids using microsatellite data. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.121, n.suppl 1, p.70-86, 2005.
- LARA, M. A. C. **Variabilidade Genética em bovinos e bubalinos através de polimorfismos protéicos: análise populacional e suas implicações no melhoramento.** 215 p. (Tese de Doutorado). Departamento de Genética, USP, Ribeirão Preto, 1998.
- LARA, M. A. C.; CONTEL, E. P. B.; SERENO, J. R. Caracterización genética de poblaciones cebuínas a través de marcadores moleculares. **Arch. Zootec.**, v.206-207, p.295-303, 2005.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v.44, n.3, p.397-401, 1989.
- LORENZO, J. **Conocimiento y conservacion de las razas autoctonas: El asno Zamorano-Leones, estudio del estado actual de la raza en la provincia de Zamora; valoracion general: Aspectos biopatologicos y funcionales.** Tesis Doctoral, Universidad de Leon, Leon, Espanha, 1997.
- MACHUGH, D. E.; SHRIVER, M. D.; LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v.146, n.3, p.1071-86, 1997.
- MARIANTE, A. DA S.; TROVO, J. B. DE F. The Brazilian genetic resources conservation programme. **Brazil. J. Genetics**, v.12, n.3-Supplement, p.241-56, 1989.
- MARIANTE, A. DA S.; CAVALCANTE., N. **Animais do Descobrimento: raças domésticas da história do Brasil.** Brasília: Embrapa Sede / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 274 p.
- MARIANTE, A. DA S.; EGITO, A. A.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; McMANUS, C. Manutenção, Enriquecimento E Caracterização De Raças Naturalizadas,

- Visando A Identificação De Alelos Relacionados A Caracteres Produtivos. **Circular técnica, EMBRAPA**, 2004.
- MATEUS, J. C.; PENEDO, M. C.; ALVES, V. C.; RAMOS, M.; RANGEL-FIGUEIREDO, T. Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle breeds using microsatellites. **Anim. Genet.**, v.35, n.2, 2004, 106-113.
- MENGOZZI, G.; DE BERARDINIS, T.; GUIDI, G.; DE GIOVANNI, C. Comparison between Italian donkey breeds by means of some blood markers (Sardinian, Ragusani, Amiadini, Gubbio and Asinara). In: Ozieri (Ed.). **Current Status of Equine Blood Typing**. Toscana: Regione Toscana-Vietata la riproduzione,, 1982. Comparison between Italian donkey breeds by means of some blood markers (Sardinian, Ragusani, Amiadini, Gubbio and Asinara), 91 p.
- MOORE, S. S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J.; MATTICK, J. S.; GEORGES, M.; HETZEL, D. J. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v.10, n.3, p.654-60, 1991.
- NIECE, R. L.; KRACHT, D. W. Genetics of transferrins in burros (*Equus asinus*). **Genetics**, v.57, n.4, p.837-41, 1967.
- NOBRE, F. V. **Os equídeos no Brasil, especialmente, no Nordeste**. I congresso brasileiro de zootecnia – XVII reunião da sociedade brasileira de zootecnia. 1980, 26 p. Mimeo.
- OLIVEIRA, R. R.; EGITO, A. A.; RIBEIRO, M. N.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; CASTRO, S. R.; MARIANTE, A. DA S.; ADRIÃO, M. Genetic characterization of the Moxotó goat breed using RAPD markers. **Revista Agropecuária Brasileira**, v.40, p.233-9, 2005.
- PAIVA, S. R.; FARIA, D. A.; SILVÉRIO, V. C.; ALBUQUERQUE, M. DO S. M.; EGITO, A. A.; McMANUS, C.; MARIANTE, A. DA S. **Viabilidade de loci de microssatélites para exclusão de paternidade em raças de ovinos**. Simpósio Nacional da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga, SP: SBMA. 2004.
- ROSA, A. J. M. **Caracterização da raça Nelore e teste de paternidade por marcadores moleculares**. 114p. Piracicaba: ESALQ. Dissertação de mestrado, 1997.
- SAINT-HILAIRE, A. **Acclimatation et domestication des animaux utiles**. Paris: Librairie Agricole de la Maison Rustique, 1861.
- SALVANS, L.; TORRENS, M.: **Ganado asnal y ganado mular**. Editorial Salvat, Barcelona, Espanha, 1959.

- SOTILLO, J. L.; SERRANO, V. Producción Animal 1. **Etnología Zootécnica**. Tebar-Flores, Madrid, Espanha, 1985.
- SPRITZE, A. L.; EGITO, A. A.; MARIANTE, A. DA S.; McMANUS, C. Caracterização genética da raça bovina Crioulo Lageano por marcadores moleculares RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.10, p.1157-64, 2003.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **TREE**, n.15, p.199-203, 2000.
- TAMBASCO, A. J.; TROVO, J. B. F.; BARBOSA, P. F. **Estudo cromossômico em raças naturalizadas de bovinos**. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Balneário Camboriú, SC. 1985. 122 p.
- TORO, M. A.; BARRAGAN, C.; OVILO, C. Estimation of genetic variability of the founder population in a conservation scheme using microsatellites. **Anim. Genet.**, v.34, n.3, p.226-8, 2003.
- TORRES, A. P.; JARDIM, W. R. **Criação do cavalo e de outros eqüinos**. São Paulo: Nobel. 1987. 654 p.
- XU, X.; GULLBERG, A.; ARNASON, U. The complete mitochondrial DNA (mtDNA) of the donkey and mtDNA comparison among four closely related mammalian species-pairs. **J. Mol. Evol.**, v.43, p.438-446, 1996.

Anexo 1

Frequências alélicas observadas para os locos analisados nas raças em estudo

