

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MARCOS EDGAR HERKENHOFF

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA DO MTDNA
(ALÇA-D) DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS**

**LAGES - SC
2013**

MARCOS EDGAR HERKENHOFF

**VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA DO MTDNA
(ALÇA-D) DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade do Estado de Santa Catarina,
UDESC
como requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa.

**LAGES - SC
2013**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Herkenhoff, Marcos Edgar

Variabilidade genética da região controladora do mtDNA (Alça-D) de
galinhas caipiras brasileiras / Marcos Edgar Herkenhoff; orientador:
Carlos André da Veiga Lima Rosa. – Lages, 2013.
42f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias /
UDESC.

1 . Linhagens de galinha caipira. 2. Diversidade genética. 3. mtDNA.
I. Título.

CDD – 636.508

MARCOS EDGAR HERKENHOFF

VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA DO mtDNA (ALÇAD) DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS

"Trabalho de Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal."

Banca Examinadora:



Orientador : _____

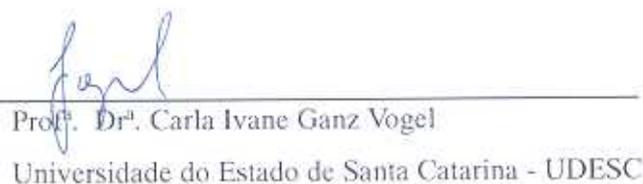
Prof. Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membro: _____



Prof. Dr. Jaqueline Battilana
Universidade do Planalto Catarinense - UNIPLAC

Membro: _____



Prof. Dr. Carla Ivane Ganz Vogel
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

LAGES – SC (/ /)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a toda minha família. Em especial meus avós, Osmário e Ruth Puff, pois foi aprendi a valorizar a educação e adquirir curiosidade nos mistérios que a natureza nos reserva. A minha mãe Rosilene Puff e aos meus irmãos Thiago Guilherme Herkenhoff e Ricardo Elias Herkenhoff.

A todos meus amigos que me apoiaram durante o curso de mestrado. Aos meus amigos residentes em da cidade de Lages: Leoni Lourenço, Thiago Magaldi Branco e sua mãe, Ricardo Galvani, Jaqueline Freitas e Jaqueline Godinho de Souza e seus pais Luiz Gonzaga de Souza e Silvia Godinho de Souza que foram sempre muito queridos comigo.

Aos meus amigos estudantes de graduação na UDESC, os quais eu cultivei uma admiração, Gustavo Mirales da Silva, Fabio Silva Pereira, Erick Sperb Ramos, Jean Correia, Alisson Munareti, Renata Menegatti, Leonardo Ribas de Souza, Thiago Giroto, Romell Ribeiro, Alberto Färber, Ricardo Biasiolo, Luiz Biasiolo, Günter Sauerbier e Emmanuel Sousa.

Aos meus amigos de mestrado: João Costa Filho, Aline Felix Schneider, Flavio Yuri e Polyanna Ferreira, em especial também, ao nosso divertido grupo de estudos de Biologia Molecular: Rodrigo Backes, Sheyla Michele Rodakiewicz, Juliana Maria Almeida e Luisa Lemos.

Aos meus amigos de Blumenau, Fernando Gern, Leandro Pimentel, Gilian Oliveira, João Krieger, Pablo Filipe Quintani, Bruno e Diogo Leal, as discussões sobre epistemologia foram divertidas e instigantes. Aos meus companheiros de profissão, Ediane Paludo, Fábio Pértille, Paula Moura, Danillo Pinhal, Alexandre Sarmento e Aluska Vieira Tavares.

Aos amigos do Wyng Tjun, Sihing Angel Samaniego, Sigung Hans Rimmel, Gabriel Kestring, Laércio, Luimar, e Alceu, que me ensinaram que a persistência é a menor das grandes coisas e que se o caminho esta livre siga adiante.

Aos meus alunos de Docência Orientada. Em especial a Brenda Maria Prestes Gouveia, Tracy Laura Galina, Tatiana Tessarolo, Daniel Felippi, Rodrigo Dalberto, Carolina Cirimbelli e Débora de Souza Ávila que me mostraram a alegria que é ser professor. A professora Carla Ganz Vogel que me cedeu as suas horas para que eu pudesse cumprir esta disciplina.

Ao professor da disciplina de genética do curso de Ciências Biológicas da FURB, Geraldo Moretto, e suas alunas de iniciação científica, Débora Hammes e Jaqueline Reginato

Koser, a Júnia Schultz e também a Carla Furlan, os quais me auxiliaram de forma significativa na padronização das minhas técnicas.

A todos meus professores do curso de mestrado. Em especial ao professor amigo André Thaler Neto, o qual sempre me auxiliou e ainda me auxilia na minha busca em realizar meu doutorado na Alemanha. Aos professores Ubirajara Maciel, Luiz Claudio Miletti, Altamir Frederico Guidolin, Lenita Moura e André Fischer Sbrissia que sempre compartilharam do seu conhecimento e me deram ótimos conselhos.

Ao pessoal do Genolab. Em especial a Vilmar Paterno e Vanessa Rosália Remualdo pelo carinho, pela paciência e por ceder o espaço físico para a realização do meu projeto. Ao Rodrigo Gaulke pela paciência, pelos conselhos, pelo apoio e por auxiliar na execução do projeto. A Tammy de Mello Falcão e Laura Cristine Branco pela paciência e pelos conselhos.

À Jaqueline Battilana que me orientou na execução do projeto. À Vanessa Rosália Remualdo, Carla Ganz Vogel e Jaqueline Battilana, que são componentes da minha banca. Além disso, são duas pessoas que eu respeito muito e admiro tanto pelo sucesso profissional como pela própria pessoa.

Por último, quero agradecer a pessoa que me conduziu durante quase 4 anos na iniciação científica, me orientou na execução do meu estágio final e me orientou durante meu mestrado, o meu orientador e amigo Carlos André da Veiga Lima Rosa, que conduziu ao mundo da pesquisa e da ciência. Seus conselhos sempre me conduziram a tomar boas decisões.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não os que sabem muito que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência”.

Charles Darwin

RESUMO

HERKENHOFF, Marcos Edgar. **Variabilidade Genética da Região Controladora do mtDNA (Alça-D) de Galinhas Caipiras Brasileiras**. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal – Subárea: Genética Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) é originária da galinha vermelha do mato (*Gallus gallus*) e galinha bankiva (*Gallus gallus bankiva*). Desde a sua domesticação, que ocorreu por volta de 7000 anos atrás no Sudeste asiático, a galinha acompanhou a migração humana, e assim se espalhou pelo mundo inteiro, chegando ao Brasil por volta do ano de 1500. No Brasil chegaram aves oriundas da Europa e da Ásia, e aqui foram deixadas em liberdade e cruzaram de forma aleatória gerando o que hoje se conhece como galinha caipira. Com o desenvolvimento da avicultura, estas aves foram esquecidas nos quintais de casa, por serem consideradas menos produtivas. No entanto, com o crescente aumento no consumo de produtos considerados naturais, esta ave voltou ao mercado. Por ser mais rústica e resistente a doenças, em virtude de sua variabilidade genética alta, estas aves também são consideradas uma importante fonte de alelos que podem ser utilizados no melhoramento animal. O DNA mitocondrial (mtDNA) caracteriza-se por ser de exclusiva herança materna, sendo o método mais utilizado consiste em amplificar a região controle (alça-D), que possui grande variabilidade genética. Desta forma, este trabalho tem como objetivo determinar a origem e composição das linhas maternas nestas linhagens. Foram coletadas amostras de sangue de 105 galinhas caipiras de ovos azuis oriundas do município de Dois Lajeados-RS. Os fragmentos foram amplificados pela PCR, sequenciados, e analisados pelo software MEGA 4.0. Como resultado, 89,52% das aves pertencem ao haplogrupo A, 7,62% ao C e 2,86% ao E. Para a composição desta ave foram utilizados em sua maioria aves de origem asiática e um pouco de origem europeia, em sua linhagem materna. Os resultados obtidos indicam que estas aves analisadas, apresentam uma variabilidade genética semelhante a aves não comerciais e conservam ainda um efeito fundador muito forte.

Palavras-chave: Linhagens de galinha caipira; diversidade genética; mtDNA.

ABSTRACT

HERKENHOFF, Marcos Edgar. **Genetic Variability of the Control Region in the mtDNA (D-Loop) in Brazilian Caipira's chicken** . 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal – Subárea: Genética Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

The domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*) was originated by the jungle red flow chicken (*Gallus gallus*) and the bankiva chicken (*Gallus gallus bankiva*). Since the domestication, around 7000 years ago in the Asian Southeast, the chicken came with the human migration, and then scattered to the entire world and arrived to Brazil around 1500 BC. In Brazil has come breeds from Europe and Asia, and they were let in freedom and they crossed at random breeding generating the chicken as know as Brazilian caipira chicken. With development of the national chicken producing the caipira's chickens were forgotten in countryside in third world countries, to be considered less productive. However, with the growing consumption of product considered healthier, this chicken was recovered. In additional, to be more rustic and disease resistance, because their high genetic variability, these chickens are considered an important source for alleles which can be use in the animal genetic improvement. The mitochondrial DNA (mtDNA) is characterized by had an exclusively maternal inheritance and the most used method amplify the mtDNA control region (D-loop), which has a high genetic variability. This study aimed to investigate the origin and composition of the maternal lines on these lineages. . We collected blood samples from 105 Brazilian blue-egg caipira's chickens. The fragments were amplified by PCR, sequenced, and analyzed by the MEGA 4.0 software. As result, 89,52% of the chicken belong to the clade A, 7,62% to C e 2,86% to E, which means that participated animals most from Asian and few from European origin, in the maternal lineages. The results indicate that these strains analyzed of Brazilian chickens, have a higher genetic variability so that observed in non-commercial poultry and conserve a strong founder effect.

Keywords: caipira's chicken lineages; genetic diversity; mtDNA.

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA.....	9
1.1 A ORIGEM DA GALINHA.....	9
1.1.1 A origem das aves.....	9
1.1.2 A origem dos galliformes.....	10
1.1.3 A origem da galinha e a sua distribuição.....	11
1.1.4 A chegada da galinha a América e ao Brasil.....	12
1.2 A HISTÓRIA DA AVICULTURA.....	12
1.2.1 O desenvolvimento da avicultura no mundo.....	12
1.2.2 O desenvolvimento da avicultura no Brasil.....	13
1.3 A GALINHA CAIPIRA.....	15
1.3.1 O desenvolvimento da galinha caipira.....	15
1.3.2 As principais raças que participaram no desenvolvimento da galinha caipira.....	16
1.3.2.1 Andaluzia.....	16
1.3.2.2 Araucana.....	16
1.3.2.3 Aseel.....	17
1.3.2.4 Australorp.....	18
1.3.2.5 Brown Leghorn.....	18
1.3.2.6 Buff Plymouth Rock.....	18
1.3.2.7 Columbian Wyandottes.....	19
1.3.2.8 Partridge Plymouth.....	19
1.3.2.9 Silver-Spangled Hamburgs.....	19
1.4 MARCADORES MOLECULARES.....	20
1.4.1 DNA mitocondrial.....	21
2 CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	23
3 CAPITULO III: ARTIGO - VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA (ALÇA-D) DO DNA MITOCONDRIAL DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS (GENETIC VARIABILITY OF THE CONTROL REGION (D-LOOP) IN THE MITHOCONDRIAL DNA IN BRAZILIAN CAIPIRA'S CHICKENS)	24
3.1 RESUMO.....	24
3.2 ABSTRACT.....	25
3.3 INTRODUÇÃO.....	25
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.5 RESULTADOS.....	28
3.6 DISCUSSÃO.....	29
3.7 CONCLUSÃO.....	30
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS.....	36
APÊNDICE.....	45

1 CAPITULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 A ORIGEM DA GALINHA

1.1.1 A origem das aves

A origem das aves é um tema amplamente discutido entre paleontólogos, ornitólogos e evolucionistas. Sabe-se que surgiram a partir dos dinossauros da subordem dos terópodes, um grupo de dinossauros bípedes carnívoros ou onívoros (Favretto, 2010). Em 2007, a descoberta de uma fósil de *Velociraptor mongoliensis* que apresentava evidências de penas, com base na presença de botões de penas no antebraço posterior, ajudou a corroborar a teoria de que as aves surgiram a partir da subordem dos terópodes (Turner *et al*, 2007).

No entanto, a ideia de que as aves surgiram a partir dos dinossauros, e que estes surgiram a partir dos répteis, teve seu surgimento com a descoberta de um dinossauro do gênero *Archaeopteryx* em 1861 na região da Baviera, no sul da Alemanha. Este fósil, datado do período jurássico, a mais ou menos 150 milhões de anos, apresentava penas por todo o corpo e tinha um esqueleto de um bípede (George Washington University, 2002). Ao contrário das aves modernas, o *Archaeopteryx* tinha um esterno plano, uma cauda longa e óssea, e três garras na asa, que se acredita foram usadas para agarrar suas presas ou, talvez, agarrar-se em árvores. No entanto, ele também possui características de um pássaro moderno, que inclui penas, asas e dedos reduzidos (UCMP, 2013). É considerado um fósil de referência nos estudos que envolvem a transição dos répteis para as aves. Com o passar do tempo, novas descobertas ajudaram a eliminar as lacunas existentes entre os dinossauros da subordem terópodes e o *Archaeopteryx*, assim como a lacuna existente entre o *Archaeopterys* e as aves modernas. Assim, até hoje o *Archaeopterys* é utilizado como modelo para ajudar a definir a origem das aves e para explicar os processos evolutivos (Serenó *et al*, 1997).

Em 2009 a descoberta de um fósil de *Limusaurus inextricabilis* na China trouxe mais evidência à hipótese do surgimento das aves à partir dos dinossauros. Esta espécie pertence à subordem dos terópodes, sendo que os dedos mais desenvolvidos dos terópodes são o polegar, o médio e o indicador. Nos embriões das aves modernas, os cinco dedos começam a se formar, mas os que desenvolvem para formar as asas são o indicador, o médio e o anular. No caso do *Limussaurus Inextricabilis*, o polegar é muito reduzido, enquanto que o indicador, o médio e o anular estão muito desenvolvidos (Xu *et al.*, 2009), tornando sua mão mais

parecida com a asa de uma ave moderno do que a de um terópode da época. Isso preenche a lacuna da evolução dos terópodes para as aves. Pois muitos paleontólogos não acreditavam que as asas das aves modernas pudessem ter surgido a partir das mãos dos terópodes.

Recentemente, a descoberta de um fóssil do que seria a primeira ave com dentes, o *Sulcavis georum*, vem ajudando a corroborar a teoria de que as aves surgiram dos dinossauros. *Sulcavis georum* é um pássaro enantiornithine do cretáceo inferior (121-125 milhões de anos atrás) da província de Liaoning, na China. Os dinossauros são em sua maioria caracterizados por dentes carnívoros com características especiais para comer carne, enquanto as aves são conhecidas por não possuírem dentes. Este novo enantiornithine tem dentes robustos com ranhuras na superfície interior. Eles são, portanto, os únicos, entre as aves, que demonstram ter havido uma perda mínima dos dentes ao longo do tempo, além de apresentarem uma considerável diversidade de padrões dentários. O mais curioso neste fóssil não é presença de dentes em si, mas a presença de dentes especializados, pois fósseis de *Archaeopteryx* já apresentaram dentes. Nenhuma outra espécie de ave, anteriormente descrita, tem preservado sulcos, estrias, bordas serrilhadas, ou qualquer outra forma de ornamentação dental. Ou seja, enquanto outras aves estavam perdendo seus dentes, enantiornithine foram evoluindo novas morfologias e especializações odontológicas (O'Connor *et al.*, 2013).

1.1.2 A origem dos galliformes

Os galliformes são uma ordem que engloba cerca de 70 gêneros e mais de 250 espécies (Howard, 2004). Existem alguns fósseis fragmentados que apontam a existência desta ordem já no período cretáceo. Dentre estes fósseis, o mais interessante pertence ao gênero *Austinornis*, anteriormente conhecido como *Ichthyornis lentus*. Esta ave está estreitamente relacionada com a ordem galliforme, mas se era uma parte deles ou pertencente a uma ordem próxima, não está claro ainda (Clarke, 2004). Já um espécime descoberto na Serra de Portezuelo, na Argentina pertencente ao cretáceo superior, é um dos candidatos mais fortes a ser considerado como o ancestral da ordem galliforme. O achado se refere a uma coracóide parcial de um pássaro neornithine, que lembra algumas espécies de galliformes (Agnolin *et al.*, 2006).

1.1.3 A origem da galinha e a sua distribuição:

A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*), pertencente à ordem galliforme e a família phasianidae, está entre as espécies de animais domésticos mais utilizada e amplamente difundida no mundo. Esta espécie tem sido usada para a alimentação, atividades religiosas, artes decorativas, e entretenimento em várias culturas diferentes. As galinhas são originárias do Sudeste da Ásia e descendentes única ou principalmente de uma ave silvestre, a galinha Vermelha do Mato (*Red Jungle Fowl; Gallus gallus*; Crawford, 1990), atualmente denominada *Gallus gallus bankiva*. A sua domesticação ocorreu em um período anterior a 5400 a.C, sendo que esta espécie é o primeiro ancestral materno da galinha doméstica (Fumihito *et al.*, 1996; Underhill, 1997). A galinha foi domesticada através da segregação proposital de indivíduos adquiridos através de populações selvagens de *Gallus gallus* no Sudeste da Ásia (hoje *Gallus gallus* é considerada uma espécie que abriga várias subespécies, como a galinha doméstica e a galinha vermelha do mato). Esta teoria é corroborada com base em evidências arqueológicas e históricas, que ocorreram de forma independente em vários pontos da Ásia (Underhill, 1997). Embora seja amplamente aceito que ela tenha se originado a partir da galinha vermelha do mato (Fumihito *et al.*, 1994; Fumihito *et al.*, 1996), alguns autores sugerem que houve contribuição genética por parte de outras subespécies de *Gallus gallus* (Eriksson *et al.*, 2008), como *Gallus gallus jabouillei*, *Gallus gallus murghi* e *Gallus gallus spadiceus*, ou mesmo de outras espécies como *Gallus lafayetii*, *Gallus sonnerati* e *Gallus varius*.

As galinhas não são animais migratórios (Fumihito *et al.*, 1996), pois elas não conseguem voar por longas distâncias, desta forma cobrindo uma extensão territorial pequena. Portanto, a sua distribuição se deve ao ser humano. Esta espécie, além de sua importância como fonte de alimento, possui uma considerável relação cultural e religiosa com o ser humano.

Á aproximadamente 3200 a.C. na Índia houve o primeiro relato das descrições a respeito da domesticação deste animal, com duas finalidades, o adorno e o esporte, este último conhecido como rinha ou briga de galo. As aves que deixavam de servir para este fim, eram então abatidas. Por volta de 1400 a.C. a galinha passou a habitar a China, e depois passou para outros países orientais, como o Japão. Em seguida passou da Pérsia, atual Irã, para a Grécia onde se disseminou pela Europa e em seguida pela África (Lana, 2000; Moreng & Avens, 1990). Assim, a dispersão da galinha para as ilhas do Pacífico, Oceania e para o

continente europeu ocorreu por volta de 3000 anos atrás (Storey *et al.*, 2008; Storey *et al.*, 2012).

1.1.4 A chegada da galinha à América e ao Brasil

A galinha doméstica chegou ao continente americano, trazida por diversos povos e introduzida em várias localidades. Através de uma descoberta no sítio de El Arenal no Chile, a sua introdução ao continente americano pode ser talvez atribuída aos povos polinésios que possam ter chegado à América antes dos europeus, ocorrendo assim uma introdução pré-colombiana (Storey *et al.*, 2007). Até então, a presença da galinha na América tinha sido atribuída aos espanhóis no século 15 (Gongora *et al.*, 2008). No entanto, este assunto tem sido debatido por muito tempo, principalmente devido à presença de raças chilenas de galinhas, principalmente a araucana, que possuem muitas peculiaridades e algumas semelhanças com as raças de galinhas do oriente, sugerindo que ou os polinésios ou os piratas holandeses as trouxeram antes (Gongora *et al.*, 2008).

No Brasil, elas foram introduzidas por Pedro Álvares Cabral e seus homens que, ao desembarcarem no país em 1500, trouxeram o que seriam os primeiros exemplares de raças puras. Estas aves acompanharam tantos os colonizadores que estavam se estabelecendo, como foram rapidamente adotadas pelos índios nativos, que passaram também a criá-las (Albino *et al.*, 2005; Albino e Moreira, 2006). Os primeiros exemplares de aves provinham de raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa (Albino *et al.*, 2005).

1.2 A HISTÓRIA DA AVICULTURA

1.2.1 O desenvolvimento da avicultura no mundo

O avanço na avicultura iniciou-se a partir da segunda guerra mundial, entre 1939 e 1945, com a necessidade e a finalidade de fornecer produtos de origem animal aos combatentes da forma mais econômica possível. A avicultura até então, era uma atividade artesanal e de pouca importância e sem visão de crescimento. As pessoas que criavam estes animais não tinham conhecimento dos cuidados principalmente em relação à nutrição e muito menos à genética (BNDES, 1995).

Com a necessidade de fornecer alimentos aos soldados, foi preciso aumentar a produção de carnes alternativas, que não fossem de origem bovina. Com isso, os Estados Unidos começaram a desenvolver pesquisas na avicultura com a finalidade de desenvolver raças mais produtivas e aperfeiçoar a nutrição destes animais (BNDES, 1995).

Após a segunda guerra mundial, os avanços na pesquisa e na tecnologia proporcionaram um salto para a avicultura mundial. Isto resultou em um aumento na oferta do produto e conseqüentemente uma redução do preço, fazendo com que quase toda a população tivesse condições de consumir (Moreng & Avens, 1990).

1.2.2 O desenvolvimento da avicultura no Brasil

Sempre existiu uma avicultura tradicional e familiar no Brasil. Em geral, as propriedades produziam carne e ovos para consumo próprio, comercializando os excedentes quando possível (Dambrós Junior, 2010).

As primeiras tentativas visando melhorar tecnologicamente a atividade surgiram em São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais na metade do século passado. Neste início a finalidade era apenas de desenvolver e aperfeiçoar as raças a fim de criar linhagens de penas bonitas destinadas aos concursos que eram promovidos em todo o país. Estes avicultores tentavam acompanhar as inovações introduzidas, sobretudo vindas dos Estados Unidos e da Inglaterra (Dambrós Junior, 2010), países onde os concursos de aves eram muito populares.

A partir de 1940, como no resto do mundo, e estendendo-se até 1960 ocorreu uma fase de escassez alimentar, como conseqüência da Segunda Guerra Mundial. Ocorreram então modificações na sociedade, e os criadores começaram a tencionar o aumento nos lucros tanto na produção de carne quanto na produção de ovos. Desta forma, deu-se o início a avicultura industrial, ou seja, as aves passaram a ser criadas no sistema de parques com acesso a áreas de pasto e também dentro de galpões com a finalidade exclusivamente de produção de carne e ovos (Hellmeister Filho, 2002). Com o fim da guerra, houve também o início da importação de linhagens híbridas oriundas dos EUA, que além de mais resistentes, eram mais produtivas. Em virtude delas, o manejo e a alimentação sofreram gradativas alterações (BNDES, 1995).

Assim, a atividade saiu da posição de quase inexistência no Brasil até o início de 1960, para uma atividade muito forte, principalmente em decorrência dos avanços tecnológicos que levaram à redução da conversão alimentar, mortalidade e da idade de abate. O modelo que passou a ser amplamente utilizado no país, denominado integração (onde empresas

especializadas fornecem ao produtor as aves, a alimentação e a assistência técnica e recebem do produtor o animal pronto para o abate ou os ovos), surgiu no início dos anos 60 em Santa Catarina. Anteriormente, em São Paulo, a atividade era desenvolvida de forma independente, na qual os granjeiros adquiriam os insumos no mercado, engordavam as aves e vendiam-nas para um frigorífico abatê-las (Dambrós Junior, 2010).

Com a atividade da produção de frango se consolidando, as empresas que já tinham negócios na produção de suínos ou em cereais apostaram também na comercialização de carnes de frango. Elas foram impulsionadas pela oferta de créditos para investimentos. Essa oferta de créditos permitiu que os avicultores tivessem acesso a tecnologias importadas, principalmente com acesso à genética, técnicas ambientais, sanitárias e nutricionais de abate e processamento (Dambrós Junior, 2010).

A partir da década de 1980, o setor retraiu devido à diminuição das vendas para o exterior causadas pelos subsídios às exportações nos Estados Unidos e na Europa. A recessão econômica ocorrida no Brasil nessa década também afetou o desempenho do mercado interno, uma vez que o consumo per capita permaneceu estagnado, principalmente na primeira metade da década de 1980 (Dambrós Junior, 2010). Foi também nesta década, que houve um resgate da galinha caipira, considerada produto saudável (Stringheta & Muniz, 2004; Zanusso & Dionello, 2003).

À partir de 1990, em virtude da abertura econômica e depois com a estabilização da inflação, a agroindústria passou a ser de caráter mais competitivo, onde a reestruturação tecnológica, a eficiência, a diminuição dos custos e a reestruturação administrativa das empresas transformaram-se nas estratégias de sobrevivência. Neste período a avicultura foi em busca da conquista de novos mercados oferecendo produtos de maior valor agregado, como os cortes e produtos processados, tais como os nugget's (Dambrós Junior, 2010).

Nos primeiros anos do século XXI, o setor apresentou um considerável crescimento. Houve então uma conquista do mercado externo, como resultado da comprovação da qualidade sanitária das granjas brasileiras, principalmente pelo fato destas não terem sido infectadas com o vírus da Influenza aviária. Além disso, a relevante melhoria de renda da população brasileira nos últimos anos vem impulsionando o consumo interno do produto (Dambrós Junior, 2010).

Atualmente, o Brasil possui uma posição de destaque na produção de carne de frango. Ocupando o segundo lugar no ranking de produção mundial, ficando atrás apenas da China, e o primeiro lugar no ranking de exportações (USDA, 2012). Esta atividade emprega no país,

mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional (UBABEF, 2012). Esta posição foi atingida graças ao trabalho árduo e das pesquisas de qualidade produzidas neste setor da pecuária.

1.3 A GALINHA CAIPIRA

1.3.1 O desenvolvimento da galinha caipira

No Brasil, como citado anteriormente, as galinhas foram introduzidas a partir dos primeiros navegadores que aqui desembarcaram no século 15 (Albino *et al.*, 2005). Eles trouxeram raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa, que foram deixadas em liberdade nos quintais das casas, sítios e fazendas. Esta liberdade propiciou a ocorrência de cruzamentos aleatórios entre elas, surgindo, desta mistura de raças, as chamadas galinhas caipiras brasileiras, ou simplesmente, galinhas caipiras (*kai'pira*, do tupi-guarani, “habitante do campo”), que também são conhecidas como galinhas crioulas, da colônia, de terreiro ou de capoeira. Caracterizam-se pela sua alta variabilidade genética, grande rusticidade (incluindo resistência a doenças) e baixa produtividade principalmente quando comparadas às galinhas industriais modernas, que são oriundas de seleções genéticas restritas (Albino *et al.*, 2005).

Em torno de 1880, a raça de galinhas Araucana foi introduzida no Brasil (Lima-Rosa, 2004). Esta raça misturou-se com as caipiras e introduziu nelas a sua principal característica, colocar ovos azuis-esverdeados. Por isso, existem várias galinhas caipiras que põem ovos de coloração azulada atualmente.

Posteriormente, outras raças também foram se misturando com as caipiras originais, resultando nas galinhas caipiras atuais. Estas caipiras atuais apresentam muita semelhança com as principais raças que as originaram que são: Andaluzia, Araucana, Aseel, Australorp, Brown Leghorn, Buff Plymouth Rock, Columbian Wyandottes, Partridge Plymouth e Silver-Spangled Hamburgs. As semelhanças não só se refletem em termos de plumagem e porte, mas também na terminação da carcaça (Barbosa *et al.*, 2007).

1.3.2 As principais raças que participaram no desenvolvimento da galinha caipira

1.3.2.1 Andaluzia

Esta é uma raça que se originou em uma província da Espanha conhecida como Andaluzia. Ela produz indivíduos com três cores: preto, branco e azul. A cor da plumagem azul é um azul com tom ardósia, atado com um azul mais escuro (Hawkins, 1995). Esta é uma raça tida como ornamental atualmente e produz ovos de coloração branca (Barbosa *et al.*, 2007).

A coloração azul das penas nesta ave é oriunda de um cruzamento híbrido entre a variedade preta e branca, fazendo o padrão azul ser único dos poucos híbridos a ser admitido como uma classe (Hawkins, 1995). Esta raça foi utilizada também nos experimentos de Mendel, a fim de ajudá-lo a compreender os traços genéticos recessivos, pois dois animais azuis produzem metade da prole azul, um quarto branca e um quarto preta (KHRC, 2011).

Elas pastam de forma bem ativa e são corredoras muito rápidas. São boas poedeiras tanto no verão quanto no inverno. Os filhotes podem ser muito ativos e gostarem de manter contato humano, caso tratados precocemente e com frequência (KHRC, 2011), tornando-as excelente escolha como animal de estimação.

O macho adulto atinge de 3,2 a 3,6 kg e a fêmea de 2,25 a 2,7 kg. São aves de aptidão para produção de ovos, sendo eles brancos e de tamanho médio. A sua produção anual, pode atingir cerca de 160 ovos por ano (KHRC, 2011; Poultry CRC, 2006).

1.3.2.2 Araucana

Originárias do Chile a raça Araucana é caracterizado por um tufo de penas que crescem em cada lado da cabeça, parecendo duas costeletas. Esta raça foi desenvolvida pelos índios araucanos (Poultry CRC, 2006). Há muito vem se debatendo, se esta raça foi desenvolvida a partir de galinhas trazidas para a América do Sul pelos europeus após a descoberta de Colombo, ou por galinhas trazidas pelos polinésios ao continente americano antes da descoberta de Colombo, esta última corroborando assim com a teoria da origem pré-colombiana (Gongora *et al.*, 2008). As evidências de que surgiu a partir de galinhas trazidas pelos polinésios são fortes, Storey *et al.* (2007) relatou os resultados de uma análise de ossos

de galinha encontrados na península de Arauco no centro-sul do Chile em um sítio arqueológico, os resultados sugerem uma origem pré-colombiana destas aves.

Existem três grupos ou variações desta raça: Ketros (tufos nos ouvidos e cauda normal), Kolloncas (sem tufos e sem cauda) e Kollonca de Aretes (tufos nos ouvidos e sem cauda) (Gongora *et al.*, 2008). O macho adulto pode chegar a pesar 3,2 kg e fêmea a 2,7 kg.

No entanto apesar destes caracteres, como referido anteriormente o que identifica esta raça é a coloração dos ovos, que podem ser azuis ou verdes (Poultry CRC, 2006). A coloração azul dos ovos é atribuída à deposição de biliverdina na casca dos ovos, a qual tem como local de síntese a glândula que produz a casca do ovo (Zhao *et al.*, 2006). Esta característica de coloração foi fixada nas galinhas caipiras, a fim de produzir linhagens caipiras que produzam apenas ovos azuis. Esta linhagem atualmente pode produzir até 250 ovos por ano (Sulave, 2002).

1.3.2.3 Assel

Esta é uma raça com aparência incomum, possui penas duras, brilhantes e muitas curtas, ao ponto do osso do peito ficar exposto, e muitas vezes a parte de trás da cabeça e alguns pontos do ombro. Possui uma postura ereta, com ombros largos, quadris musculosos e bico curvo e forte. Estas características tornam-na uma excelente pugilista (Floyd, 2001).

Sendo uma raça bem conhecida no velho mundo, ela não deixou somente descendentes no seu local de origem, o Paquistão (Índia na época), deixando também em lugares tão distantes como a Tailândia, Japão, Turquia, Inglaterra (importada por volta de 1760), muitos países da América do sul e nos EUA. Esta contribuiu para o desenvolvimento de outra raça muito utilizada, a Cornish, que foi desenvolvida na Inglaterra (Floyd, 2001; IAC, 2007). A Assel é uma raça particularmente antiga. Ela é referida no Código de Manu, um documento indiano que possui descrições de leis, textos religiosos e filosóficos, e foi escrito em torno de 900 a 1280 a.C. (Floyd, 2001).

Esta ave pode atingir uma taxa em torno de 85% de fertilidade. O peso médio do ovo esta em torno de 41 g, sendo que o primeiro ovo surge nas 29ª semana. Por ano, a produção média é de 33 ovos (Singh *et al.*, 2000).

1.3.2.4 Australorp

Como o próprio nome sugere, esta é uma raça oriunda da Austrália, sendo que o nome é uma abreviação em inglês para Orpington Negro Australiano. Esta raça, portanto, se originou a partir da raça inglesa Orpington. Nas condições oferecidas na Austrália, esta ave pode chegar a produzir 300 ovos por ano em instalações comerciais, e 250 em produções caseiras (Poultry, CRC, 2006). Quando adultos, os machos pesam em média 3,859 kg e as fêmeas 2,951 kg. Seus ovos pesam em média 55g (Figueiredo *et al.*, 2003).

1.3.2.5 Brown Leghorn

Esta é na verdade uma variedade da raça Leghorn. Ela é uma raça bem conhecida entre as aves caipiras, sendo originada da Itália, foi primeiramente exportada a partir do porto de Livorno. O interesse pela leghorn foi rapidamente adotado no continente americano, que comumente observava o destaque da raça, como tendo uma produção elevada de ovos. Esta raça ganhou muitos prêmios em competições no quesito produção de ovos (LCA, 2010).

Estas aves são de tamanho pequeno, em torno de 2,043 kg para as fêmeas e 2,724 kg para os machos. As fêmeas produzem em média, 200 ovos por ano e peso médio de 55 g (Figueiredo *et al.*, 2003), portanto, esta é uma raça poedeira, e a coloração dos ovos é branca (Barbosa *et al.*, 2007).

1.3.2.6 Buff Plymouth Rock

O Plymouth Rock foi exibido pela primeira vez no continente americano em uma exibição em Boston no ano de 1829. Estas aves são as ancestrais dos atuais barred plymouth rock, os quais foram exibidos pela primeira vez em 1869 em Worcester, Massachusetts. Estes, por sua vez, são compostos pelo cruzamento de várias linhagens. Posteriormente ela foi reconhecida como uma raça e foi admitida no primeiro Standard Americana de Excelência, em 1874 (University of Illinois, 2012).

Em seguida, foi desenvolvida a raça Buff Plymouth Rock, originada em Rhode Island, não muito longe de Fall River, Massachusetts (University of Illinois, 2012). É uma raça de pele amarelada, crista serrada e ovos de casca marrom. Admite-se na Associação Americana

de Aves as variedades barrada, branca, amarela, prata, perdiz, columbia e azul (Figueiredo *et al.*, 2007).

Quando adultos, os machos pesam em média 4,313 e as fêmeas 3,405 kg. As galinhas produzem em média 180 ovos no primeiro ciclo de postura, que pesam em média 55g (Figueiredo *et al.*, 2007).

1.3.2.7 Columbian Wyandottes

Além da aparência, uma das características a favor da criação desta raça, é a sua facilidade no manejo. Esta ave é oriunda dos EUA, o seu desenvolvimento foi um trabalho conjunto com os britânicos, que acabou fornecendo um animal com aptidão dupla, tanto para produção de ovos quanto para a produção de carne (Poultry CRC, 2006).

Esta raça pode colocar de 180 a 200 ovos por ano, tornando-se uma produtora boa de ovos. Além disso, as mães são excelentes nos cuidados com os filhotes (Poultry CRC, 2006).

É uma ave excelente em produção de carne também. O macho pode adulto atinge em torno de 3,2 kg e a fêmea adulta em torno de 2,95 kg. Além disso, é uma resistente ao frio, favorecendo sua criação no hemisfério norte (Poultry CRC, 2006).

1.3.2.8 Partridge Plymouth

Esta é um raça com uma variedade de machos e fêmeas coloridos. É originária dos EUA, tem aptidão mista e possui ovos de coloração marrom (Barbosa *et al.*, 2007).

1.3.2.9 Silver-spangled Hamburgs

Esta é na verdade uma variedade da raça Hamburg, e possui uma grande variedade de cores, incluindo: Silver-spangled, Golden-spangled, Golden-penciled, Silver-penciled, branco e preto (Fantastic Farms, 2012). Há pelo menos 10 variedades desta raça (Poultry CRC, 2006).

Embora com um nome um tanto sugestivo, esta raça é originária da Holanda, e não da Alemanha, como o nome sugere (Fantastic Farms, 2012; Poultry CRC, 2006).

Os machos adultos podem atingir até 2,3 kg e as fêmeas até 1,8 kg (Fantastic Farms, 2012; Poultry CRC, 2006). São aves bem rústicas, ativas, se alimentam bem, amadurecem

rapidamente e são boas produtoras de pequenos ovos brancos (Barbosa *et al.*, 2006; Fantastic Farms, 2012; Poultry CRC, 2006). Apesar de pequenos, estas aves são conhecidas por sua capacidade de colocar até 220 ovos por ano (Poultry CRC, 2006). Esta ave, no entanto, tende a ficar nervosa na presença de humanos (Fantastic Farms, 2012; Poultry CRC, 2006), embora considerada ornamental (Barbosa *et al.*, 2006).

1.4 MARCADORES MOLECULARES

Até metade da década de 60, os marcadores mais utilizados em estudos de genética e programa de melhoramento, tanto animal quanto vegetal, eram indicadores fenotípicos, normalmente características morfológicas, que eram de fácil identificação visual e associada à genética, como o nanismo e o albinismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Nas duas últimas décadas, houve um aumento significativo de ferramentas e metodologias na área de genética molecular e suas aplicações (Faleiro, 2007). A revolução neste quadro se iniciou com o desenvolvimento e o uso de marcadores isoenzimáticos. À medida que a biologia molecular começou a se desenvolver, foram surgindo diversos métodos que permitiram os melhoristas e pesquisadores, detectar polimorfismos genéticos diretamente no DNA (Faleiro, 2007; Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Embora a utilização de isoenzimas seja uma ferramenta muito eficaz, o seu número limitado de loci de um genoma e o baixo número de alelos por loco tornou esse tipo de marcador ineficiente quando a investigação requeria uma cobertura mais ampla do genoma, como o mapeamento e caracterização genética (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com o surgimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e da tecnologia do DNA recombinante, novos marcadores genéticos e novas metodologias foram desenvolvidos (Faleiro, 2007; Ferreira & Grattapaglia, 1998). Existe atualmente um grande número de marcadores moleculares, cada um deles possui vantagens e desvantagens. Portanto, seu uso vai depender do objetivo do trabalho, da infraestrutura disponível, do recurso financeiro do projeto e do conhecimento que se tem da genética da espécie estudada (Faleiro, 2007). Um bom marcador molecular deve reunir uma série de características para aperfeiçoar e maximizar sua utilidade, entre elas, deve possuir uma distribuição boa ao longo do genoma e um alto grau de polimorfismo. A técnica para analisar o marcador deve ser rápida, prática e reproduzível em outros laboratórios (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005).

Entre toda a gama de marcadores moleculares destacam-se, como marcadores de DNA nuclear, os microssatélites e os SNPs (polimorfismo de nucleotídeo simples), e como marcadores de DNA não nuclear o DNA mitocondrial (mtDNA). Estas são consideradas ferramentas muito úteis para a determinação de variabilidade genética, principalmente nos estudos relacionados à genética de populações (Frankham *et al.*, 2008; Kaya & Yildiz, 2008).

1.4.1 DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas presentes no citoplasma de células eucarióticas. Elas têm um formato cilíndrico alongado, possuem duas membranas altamente especializadas, sendo uma interna e a outra externa. Estas membranas definem dois compartimentos separados denominados de espaço intermembranoso e espaço interno da matriz. Na matriz da mitocôndria encontram-se proteínas e enzimas que compõem o ciclo de Krebs, RNA's ribossômicos (rRNA), RNA's transportadores (tRNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA) (Alberts *et al.*, 2004).

Embora represente uma pequena fração do tamanho do genoma dos organismos, o mtDNA é um dos marcadores mais utilizados nos animais e tem sido usado amplamente por mais de três décadas (Galtier *et al.*, 2009). As razões pelo qual o mtDNA é utilizado como marcador molecular são bem conhecidas. O mtDNA é fácil amplificar porque aparece nos mais variados tipos de célula e mais abundante que o DNA nuclear, seu conteúdo é fortemente conservado em animais, não possui íntrons e possui regiões intergênicas muito curtas (Gissi *et al.*, 2008). É altamente variável em populações naturais por causa de sua elevada taxa de mutação, fornecendo ao pesquisador, sinais de mudança em um curto período de tempo na população estudada (Galtier *et al.*, 2009). Regiões variáveis, como a região controle (alça-D), são normalmente flanqueadas por regiões altamente conservadas, como as que codificam o rRNA, em que os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados na PCR são facilmente projetados (Bensasson *et al.*, 2001).

O mtDNA tem um número de propriedades biológicas específicas, o que torna um marcador adequado para estudos de biodiversidade molecular. Primeiro, a sua herança é clonal e materna, o que significa que todo o genoma se comporta como um único locus não recombinando, ou seja, todos os sítios têm a mesma genealogia. Isto simplifica consideravelmente a representação e a análise de dados de variação dentro da espécie estudada. Em segundo lugar, supõe-se que a sua evolução é praticamente neutra, ou seja, não

sofre ação direta de seleção natural e nem sexual. Por causa destas características, a sua popularidade vem crescendo nos últimos 20 anos, disponibilizando muitos dados na literatura, inclusive em estudos de populações de galinha. Muitos trabalhos têm utilizado o mtDNA na análise da variabilidade genética em galinhas (Desjardins & Morais, 1990; Fumihito *et al.*, 1994; Guan *et al.*, 2007; Komiyama *et al.*, 2004a e 2004b; Liu *et al.*, 2006a e 2006b; Oka *et al.*, 2007; Quinn & Wilson, 1993). Este tipo de marcador está sendo amplamente utilizado também para estudos que determinem a origem, evolução e a introdução desta espécie em várias partes do mundo (Dancause *et al.*, 2011; Mwacharo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006a e 2006b).

Trabalhos que tenham investigado o polimorfismo gênico de galinhas caipiras brasileiras são ainda muito raros na literatura, e os que foram desenvolvidos se concentraram em polimorfismos nucleares: Lima-Rosa *et al.* (2004) e Paludo (2011) em genes do MHC; Lima-Rosa *et al.* (2005), Clementino *et al.* (2010) e Fonteque (2011) em marcadores microsatélites. A variabilidade de DNA não nuclear, até o momento, não havia sido investigada em galinhas caipiras brasileiras. Com exceção do estudo realizado por Possamai (2011) nas linhagens industriais de galinha caipira.

2 CAPITULO II: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente as galinhas caipiras de ovos azuis na região controladora (alça-D) do mtDNA.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Investigar a variabilidade genética das galinhas caipiras brasileiras na região controladora (alça-D) do mtDNA.
- A partir dos haplótipos mitocondriais encontrados, traçar a possível origem materna destas aves.
- Calcular as frequências genotípicas para este marcador nesta população.
- Comparar os resultados encontrados nesta população com os já descritos na literatura para outras populações.

3 CAPITULO III: ARTIGO - VARIABILIDADE GENÉTICA DA REGIÃO CONTROLADORA DO MTDNA (ALÇA-D) DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS (GENETIC VARIABILITY OF THE CONTROL REGION OF THE MTDNA (D-LOOP) IN BRAZILIAN CAIPIRA'S CHICKENS)

3.1 RESUMO

As galinhas caipiras brasileiras se originaram de cruzamentos aleatórios entre diferentes raças de galinhas que foram trazidas ao Brasil pelos colonizadores portugueses. Caracterizam-se pela sua rusticidade, por sua maior resistência à doenças e uma variabilidade genética maior do que as aves industriais. Entretanto, com o desenvolvimento da avicultura nacional e a busca por aves mais produtivas, as aves caipiras, não tiveram mais espaço e foram esquecidas nos terreiros do interior. O DNA mitocondrial (mtDNA) é um material genético não nuclear e caracteriza-se por ser de exclusiva herança materna. O método mais utilizado no estudo do polimorfismo do mtDNA consiste em amplificar a região controle (alça-D), que possui grande variabilidade genética. A análise genética do mtDNA possibilita estudar a evolução e os mecanismos migratórios dos indivíduos. Este trabalho teve como objetivo investigar a diversidade genética não nuclear da galinha caipira brasileira de ovos azuis através da análise da alça-D do mtDNA. Foram coletadas amostras de sangue de 105 aves provenientes do município de Dois Lagedos-RS. Para esta análise a amplificação dos fragmentos desejados foi realizada pela técnica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em um sequenciador automático e as sequências foram analisadas pelo programa MEGA 4.0 e comparadas com as descritas na literatura. Como resultado, 89,52% das aves pertenciam ao haplogrupo A, 7,62% o ao C, e 2,86% dos indivíduos pertenciam ao haplogrupo E. Concluindo, a origem, pelo menos materna, da galinha caipira brasileira de ovos azuis é, em sua maioria, asiática, e em apenas 2,86% de origem europeia. Conservam, assim, uma forte herança de suas ancestrais asiáticas. Os resultados obtidos também indicam que estas galinhas caipiras analisadas apresentam uma variabilidade genética inferior no DNA não nuclear do que a apresentada por elas para o DNA nuclear.

Palavras-chave: galinha caipira; diversidade genética; mtDNA.

3.2 ABSTRACT

The caipira's Brazilian chickens originated from random breeding among different breeds of chickens that were brought to Brazil by Portuguese colonizers. They are characterized by its rusticity and its greater resistance against diseases. However, with the development of the national poultry industry and the search for more productive birds, the caipira's chickens had no more space and then they were forgotten in the interior yards. These birds are known as to have a high rusticity, diseases resistance and a high genetic variability as the industry birds. The mitochondrial DNA (mtDNA) is a non-nuclear genetic material and characterized by had an exclusively maternal inheritance. The most used method in the study of polymorphism is to amplify the mtDNA control region (D-loop), which has a high genetic variability. The mtDNA allow the study of the evolution and mechanisms of migratory of individuals. This study aimed to investigate the genetic non-nuclear diversity in the Brazilian (blue-egg Caipira) chickens using the mtDNA D-loop analysis. We collected blood samples from 105 birds belonging to Dois Lajeados-RS-Brazil. For this analysis, the amplification of the desired fragments was performed by the polymerase chain reaction (PCR). The amplified fragments were subjected to electrophoresis on an automatic sequencer, and the sequences were analyzed by the program MEGA 4.0 and compared with those described in the literature. As result, 89.52% of the birds belong to clade A, 7.62% to the clade C, and 2,86% to clade E. In conclusion, in the genetic composition of the Brazilian (blue-egg Caipira) chickens is mostly of Asian origin, and only 2.86% of European origin. Conserve a rich inheritance from your Asian ancestors. The results indicate that these strains analyzed of Brazilian chickens, have a higher genetic variability to that observed in commercial lines and similar to that observed in non-commercial poultry.

Keywords: caipira's chicken; genetic diversity; mtDNA.

3.3 INTRODUÇÃO

A galinha doméstica, *Gallus gallus domesticus*, esta entre as espécies de animais domésticos mais utilizada e amplamente difundida no mundo. Esta espécie tem sido usada para a alimentação, atividades religiosas, artes decorativas, e entretenimento em várias culturas diferentes. Sua origem provém do Sudoeste da Ásia e descendente única ou principalmente de uma ave silvestre, a galinha Vermelha do Mato (*Red Jungle Fowl*; *Gallus*

gallus bankiva; Crawford, 1990), a sua domesticação ocorreu em um período anterior à 5400 aC, sendo que esta espécie é o primeiro ancestral materno da galinha doméstica (Fumihito *et al.*, 1996). A dispersão da galinha para as ilhas do Pacífico e para o continente europeu, ocorreu por volta de 3000 anos atrás (Storey *et al.*, 2012).

No Brasil, as galinhas foram introduzidas a partir dos primeiros navegadores que aqui desembarcaram no século 15 (Albino *et al.*, 2005). Eles trouxeram raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa, que foram deixadas em liberdade nos quintais das casas, sítios e fazendas. Esta liberdade propiciou a ocorrência de cruzamentos aleatórios entre elas, surgindo, desta mistura de raças, as chamadas galinhas caipiras brasileiras, ou simplesmente, galinhas caipiras (*kai'pira*, do tupi-guarani, “habitante do campo”), que também são conhecidas como galinhas crioulas, da colônia, de terreiro ou de capoeira. No final do século 19, foi introduzida no Brasil uma raça de galinhas chilenas, as Araucanas, que tinham como característica colocarem ovos azuis (Lima-Rosa *et al.*, 2004). Estas aves cruzaram-se com as caipiras, originando as galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis.

A mudança crescente nos hábitos de consumo, que teve seu início na década de 80, passou a valorizar os produtos considerados naturais, tornando as galinhas caipiras uma alternativa de grande valor comercial (Stringheta & Muniz, 2004; Zanusso & Dionello, 2003). Esta valorização se deve ao fato destes animais gerarem produtos com características diferenciadas como o sabor, a coloração avermelhada, o teor de fibra maior e o teor de gordura menor da carne caipira quando comparada à carne das aves comerciais típicas, apesar da baixa produtividade (Albino *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2002). Além disto, as caipiras caracterizam-se pela sua alta variabilidade genética e grande rusticidade (incluindo resistência a doenças) também quando comparadas às galinhas industriais modernas, que são oriundas de seleções genéticas restritas (Albino *et al.*, 2005).

O alto polimorfismo gênico das aves caipiras tem sido comprovado por alguns poucos trabalhos científicos, porém todos concentraram estas investigações no DNA nuclear (Lima-Rosa *et al.*, 2004 e 2005; Clementino *et al.*, 2010; Fonteque, 2011; Paludo, 2011).

Para aumentar o conhecimento desta variabilidade é necessário que novas regiões do DNA sejam investigadas, incluindo o DNA não nuclear. Este objetivo pode ser alcançado através da análise da região controladora (alça-D) do DNA mitocondrial (mtDNA). A alça-D do mtDNA é considerada um bom marcador molecular por ser uma região de grande variabilidade genética, portanto, altamente informativa, e ser de fácil amplificação, representando boa ferramenta para análises do polimorfismo genético não nuclear (Frakham

et al., 2008). Muitos trabalhos têm utilizado o mtDNA na análise da variabilidade genética em galinhas (Desjardins & Morais, 1990; Fumihito *et al.*, 1994; Guan *et al.*, 2007; Komiyama *et al.*, 2004a e 2004b; Liu *et al.*, 2006a e 2006b; Oka *et al.*, 2007; Quinn & Wilson, 1993).

Outra utilização relevante deste marcador em estudos com galinhas é seu uso na determinação da origem, da evolução e da introdução desta espécie em várias partes do mundo (Dancause *et al.*, 2011; Mwacharo *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2006a e 2006b). Embora introduzida pelos europeus no século 15, a composição genética das galinhas na América do Sul não está clara ainda, principalmente no que diz respeito às galinhas caipiras (Dancause *et al.*, 2011).

Com base no que foi apresentado, este trabalho analisou a variabilidade genética não nuclear de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis utilizando como marcador a alça-D do mtDNA, e também comparou os haplótipos mtDNA encontrados com os já descritos na literatura, corroboram a origem genética das aves da amostra. Estes resultados sobre aves sul americanas contribuirão para investigações maiores que visem detectar a origem, domesticação e sua distribuição pelo mundo.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises foram utilizadas 105 galinhas caipiras de ovos azuis provenientes do município de Dois Lajeados-RS. O sangue periférico dessas aves foi coletado usando 0,5% de EDTA como anticoagulante. O DNA total das amostras foi extraído dos eritrócitos através do protocolo estabelecido por Sambrook *et al.* (1989).

A amplificação da região da alça-D desejada foi realizada mediante a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir do DNA extraído. Foram utilizados os seguintes iniciadores: L16750: 5' – AGG ACT ACG GCT TGA AAA GC – 3'; Cr1B: 5' – CCA TAC ACG CAA ACC GTC TC - 3', conforme descritos pelo Dr. Han Jianlin (comunicação pessoal). Desta forma, amplificando um fragmento de 712 bp.

A reação da PCR e respectivas concentrações dos reagentes foram as seguintes: 50 ng de DNA, 2,5 µL de tampão 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 1 µL (15 mM) de MgCl₂, 2 µL da mistura de dNTP (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 µM de cada iniciador (20 ng/µL), 1,25 unidades de Taq Polimerase e H₂O para completar o volume final de 25 µL. As condições de amplificação consistiram de 5 minutos de desnaturação inicial a

94°C, 35 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 60°C e 90 segundos de extensão a 72°C, bem como 10 minutos de extensão final a 72°C.

O sequenciamento do DNA amplificado foi realizado no analisador genético ABI 3130 DNA Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA), e posteriormente visualizadas e analisadas a partir do software Gene Mapper versão 3.2.1 com a utilização do "kit" ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer Applied Biosystems), que consiste na marcação com terminadores fluorescentes, conforme especificações do fabricante.

As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa MEGA 4.0 possibilitando a comparação dos alelos encontrados com os já descritos na literatura para as linhagens comerciais típicas.

3.5 RESULTADOS

Noventa e quatro aves (89,52%) apresentaram a mesma sequência de DNA, que corresponde ao haplogrupo A. Oito aves (7,62%) apresentaram uma sequência que corresponde ao haplogrupo C e 3 (2,86%) que corresponde ao haplogrupo E.

Os 94 indivíduos do haplogrupo A possuíam a mesma sequência dos haplótipos A01 e A08 descritas por Oka *et al.* (2007), no entanto estas últimas sequências são um pouco maiores, possuem 1230 bp enquanto que a sequência descrita neste trabalho possui 712 bp, portanto, esta sequência foi nomeada de A13. Os haplótipos A01 e A08 foram descritos em algumas raças de galinha caipira do Japão. O haplótipo A01 foi descrito na raça Hinai-dori e o haplótipo A08 na raça Totenko e na raça ocidental Rhode Island Red (Oka *et al.*, 2007) (tabela 1).

Os 8 indivíduos do haplogrupo C possuíam a mesma sequência do haplótipo SLvtHap33 descrito por Silva *et al.* (2008), no entanto, esta sendo menor (613 bp) do que a descrita neste trabalho sendo, portanto, nomeado de C10. Este haplótipo foi descrito em aves indígenas do Sri Lanka (Silva *et al.*, 2008).

Os 3 indivíduos do haplogrupo E possuíam a mesma sequência do haplótipo E10 descrito por Dana *et al.* (2010) em aves comerciais da Holanda, esta possuindo 365 bp, e também a mesma sequência do haplótipo ch2 descrito por Wei *et al.* (2008) em galinhas da raça chinesa Xuefeng Black, e este possuindo 539 bp. Esta sequência foi nomeada de E13.

3.6 DISCUSSÃO

Em trabalhos que utilizaram esta mesma amostra de aves caipiras de ovos azuis e analisaram genes ou marcadores de DNA nuclear (Lima-Rosa *et al.*, 2004 e 2005; Fonteque, 2011; Paludo, 2011) foi detectado um grande polimorfismo gênico, bem maior do que o observado em aves comerciais. Entretanto, na análise do DNA não nuclear a amostra de aves caipiras se mostrou bem menos polimórfica, apenas 3 haplótipos foram detectados, sendo que quase 90% das galinhas apresentou o mesmo, pertencente ao Haplogrupo A.

Algumas considerações podem ser feitas quanto a isto. Primeiro, as regiões nucleares analisadas (genes do MHC - Classe I e II; e microssatélites) nos trabalhos acima citados são regiões que apresentam seleção diversificadora positiva ou neutra, respectivamente (Kaufman & Wallny, 1995; Stallings *et al.*, 1991), o que favorece ao aumento da variabilidade genética. A alça-D do mtDNA, apesar de ser, de maneira geral, mais variável que o restante do mtDNA, possui seleção negativa para polimorfismo, visto que é uma região de controle (Frankham *et al.*, 2008). Segundo, deve ter ocorrido um forte efeito fundador materno na composição das galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis, e este efeito se manteve no decorrer dos séculos até os dias de hoje. Terceiro, diferentemente dos microssatélites, a alça-D do mtDNA apresenta um número muito menor de alelos, é, portanto, uma ferramenta muito eficaz para traçar a origem materna dos animais (Frankham *et al.*, 2008).

A domesticação da galinha ocorreu em um período anterior a 5400 aC (Fumihito *et al.*, 1996; Underhill, 1997). Esta ave foi domesticada através da segregação proposital de indivíduos adquiridos através de populações selvagens de *Gallus gallus* no Sudeste da Ásia (Underhill, 1997).

Após a sua domesticação, as galinhas foram levadas a China e a Coréia, onde surgiram os haplogrupos A e B (Oka *et al.*, 2007). Em estudos realizados no Japão (Oka *et al.*, 2007) e na Coréia do Sul (Cho *et al.*, 2010) foi demonstrado que estes haplogrupos estão bem presentes nas aves estudadas, assim como o haplogrupo C. Assim como no nosso estudo, foram avaliadas aves que sofreram cruzamentos de forma aleatória. Posteriormente, a galinha passou para a Pérsia (Irã), para a Grécia, e depois a África e o restante da Europa (Lana, 2000; Moreng & Avens, 1990). A sua dispersão para as ilhas do pacífico e para o continente europeu, portanto, ocorreu por volta de 3000 anos atrás (Storey *et al.*, 2012). No Brasil, oficialmente, ela chegou por volta de 1500 (Albino *et al.*, 2005), entretanto a origem das

chilenas Araucanas, que entraram na composição genética das aves caipiras brasileiras, ainda é incerta e parece ter surgido antes da colonização europeia na América (Storey *et al.*, 2007).

As aves analisadas no nosso trabalho mostraram, em sua grande maioria, haplótipos que pertencem ao haplogrupo A, de origem chinesa, e ao haplogrupo C, originário do Sudeste Asiático. Uma vez que a galinha tenha sido domesticada na Ásia, isto demonstra uma forte ligação das aves analisadas neste estudo e as aves asiáticas, sugerindo que a contribuição materna das Araucanas na formação das galinhas caipiras de ovos azuis foi maior do que a das ancestrais europeias. Assumindo aqui que as Araucanas possuem origem pré-colombiana e de origem polinésia conforme descrito por Storey *et al.* (2007).

Por fim, devemos considerar que a população analisada neste estudo não representa a galinha caipira brasileira como um todo, mas uma população do sul do país, e que, portanto, estudos com outras populações de galinhas caipiras brasileiras são necessários para maiores considerações.

3.7 CONCLUSÃO

A origem, pelo menos materna, da galinha caipira brasileira de ovos azuis é, em sua grande maioria, asiática, e em apenas 2,86% europeia. Por conservarem os haplótipos do haplogrupo A (chinês) e C (sudeste asiático) estas aves mantêm uma forte herança de suas ancestrais asiáticas. Os resultados obtidos também indicam que estas galinhas caipiras analisadas apresentam uma variabilidade genética inferior no DNA não nuclear do que a apresentada por elas para o DNA nuclear.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, L.T.F.; SILVA, J.H.V.; VARGAS JÚNIOR, J.G.. Criação de Frango e Galinha Caipira: Avicultura alternativa. 2. ed. Revisada e Ampliada, Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 208 p.

CHO, C.Y.; LEE,P.Y.; KO,U.K.; KIM,H.K.; PARK,M.N.; YEON,S.H.. mtDNA D-loop showing the multiple maternal origins of Korean native chicken. Não publicado. 2010.

CLEMENTINO, C.S.; BARBOSA, F.J.V.; CARVALHO, A.M.F.; COSTA-FILHO, R.A.R.; SILVA, G.S.; CAMPELO, E.G.; BRITTO, F.B.; DINIZ, F.M.. Microsatellite DNA loci for population studies in Brazilian chicken ecotypes. *Int. J. Poult. Sci.*, v. 9 , n. 12, p. 1100-6. 2010.

CRAWFORD, R. D. *Poultry Breeding and Genetics*. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. 1122 p.

DANA, N.; MEGENS, H.J.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; HANOTTE, O.; MWACHARO, J.; GROENEN, M.A.M.; ARENDONK, J.A.M. van. East Asian contributions to Dutch traditional and western commercial chickens inferred from mtDNA analysis. *Animal Genetics*, v. 42, p. 125-133. 2010.

DANCAUSE, K.H.; VILAR, M.G.; STEFFY, R.; LUM, J.K.. Characterizing genetic diversity of contemporary pacific chickens using mitochondrial DNA analyses. *Plos One*. v. 6, n. 2, p. 1-6. 2011.

DESJARDINS, P.; MORAIS, R.. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J Mol Biol*. v. 212, p. 599-634. 1990.

FONTEQUE, G.V.. *Investigação da variabilidade genética de quinze loci de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis*. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2011.

FRAKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A.. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 2008. 280 p.

FUMIHITO, A.; MIYAKE, T.; SUMI, S.; TAKADA, M.; OHNO, S.; KONDO, N.. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 91, p. 12505-12509. 1994.

FUMIHITO, A.; MIYAKE, T.; TAKADA, M.; SHINGU, R.; ENDO, T.; GOJOBORI, T.; KONDO, N.; OHNO, S.. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 93, p. 6792–6795. 1996.

GUAN, X.; GENG, T.; SILVA, P.; SMITH, E.J. Mitochondrial DNA sequence and haplotype variation analysis in the chicken (*Gallus gallus*). *J. Hered.* v. 98, p. 723-726. 2007.

KAUFMAN J.; VÖLK H.; WALLNY H.J. A “minimal essential MHC” and an “unrecognized MHC”: two extremes in selection for polymorphism. *Immunological Reviews* v. 143, p. 63-88. 1995.

KOMIYAMA, T.; IEKO, K.; GOJOBORI, T.. The evolutionary origin of long-crowing chicken: its evolutionary relationship with fighting cocks disclosed by the mtDNA sequence analysis. *Gene*. v. 333, p. 91-99. 2004a.

KOMIYAMA, T.; IKEO, K.; TATENNO, Y.; GOJOBORI, T.. Japanese domesticated chickens have been derived from Shamo traditional fighting cocks. *Mol Phylogenet Evol.* v. 33, p. 16-21. 2004b.

LANA, G. R. Q. Avicultura. Recife UFRPE: Rural, 2000. 268 p.

LIMA-ROSA, C.A.V.; CANAL, C.W.; STRECK, A.F.; FREITAS, L.B.; CAÑEDO, A.D.; BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M.. B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken. *Anim Genet.* v. 35, p. 278-384. 2004.

LIMA-ROSA, C.A.V.; CANAL, C.W.; FALLAVENA, P.R.V.; FREITAS, L.B.; SALZANO, F.M.. LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Genet Mol Biol.* v. 28, p. 386-389. 2005.

LIU, Y.P.; WU, G.S.; YAO, Y.G.; MIAO, Y.W.; LUIKART, G.; BAIG, M.; BEJA-PEREIRA, A.; DING, Z.L.; PALANICHAMY, M.G.; ZHANG, Y.P.. Multiple maternal origins of chickens: out the Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol.* v. 38, p. 12-19. 2006a.

LIU, Y.P.; ZHU, Q.; YAO, Y.G.. Genetic relationship of Chinese and Japanese gamecocks revealed by mtDNA sequence variation. *Biochem Genet.* v. 44, p. 19-29. 2006b.

MORENG, R. E.; AVENS, J. S. *Ciência e Produção de Aves*. São Paulo: Roca, 1990. 380 p.

MWACHARO, J.M.; BJØRNSTAD, G.; MOBEGI, V.; NOMURA, K.; HANADA, H.; AMANO, T.; JIANLIN, H.; HANOTTE, O.. Mitochondrial DNA reveals multiples introductions of domestic chicken in east Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* v. 58, p. 374-382. 2011.

OKA, T.; INO, Y.; NOMUARA, K.; KAWASHIMA, S.; KUWAYAMA, T.; HANADA, H.; AMAMO, T.; TAKADA, M.; TAKAHATA, N.; HAYASHI, Y.; AKISHINONOMIYA, F.. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics.* v. 38, p. 287-293. 2007.

PALUDO, E.. *Estudo da variabilidade dos genes B-LB do MHC da galinha (Gallus gallus domesticus) em aves caipiras brasileiras*. 2011. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2011.

QUINN, T.W.; WILSON, A.C.. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *J Mol Evol.* v. 37, p. 417-425. 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*. 2 ed. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SILVA, P.; GUAN, X.; HO-SHING, O.; JONES, J.; XU, J.; HUI, D.; NOTTER, D.; SMITH, E.. Mitochondrial DNA-based analysis of genetic variation and relatedness among Sri Lankan indigenous chickens and the Ceylon junglefowl (*Gallus lafayetti*). *Animal Genetics*, v. 40, p. 1-9. 2008.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. 235p.

STALLINGS R.L.; FORD A.F.; NELSON D.; TORNEY D.C.; HILDEBRAND C.E.

Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* v. 10, p. 807-815. 1991.

STOREY, A.A.; RAMIREZ, J.M.; QUIROZ, D.; BURLEY, D.V.; ADDISON, D.J.;

WALTER, R.; ANDERSON, A.J.; HUNT, T.L.; ATHENS, J.S.; HUYNEN, L.; MATISOO-

SMITH, E.A.. Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of

Polynesian chickens to Chile. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 104, p. 10335-10339. 2007

STOREY, A.A.; ATHENS, J.S.; BRYANT, D.; CARSON, M.; EMERY, K.; FRANCE, S.

de; HIGHAM, C.; HUYNEN, L.; INTOH, M.; JONES, S.; KIRCH, P.V.; LADEFOGED, T.;

MCCOY, P.; MORALES-MUÑIZ, A.; QUIROZ, D.; REITZ, E.; ROBINS, J.; WALTER, R.;

MATISOO-SMITH, E.. Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using

ancient mitochondrial DNA signatures. *Plos One*. v. 7, n. 7, p. 1-11. 2012.

STRINGHETA, P.C.; MUNIZ, J.N.. *Alimentos orgânicos*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004.

p.37-128.

UNDERHILL, A.P.. Current issues in Chinese neolithic archaeology. *Journal of World*

Prehistory. v. 11, p. 103-160. 1997.

ZANUSSO, J.T.; DIONELLO, N.J.L.. Produção avícola alternativa – análises dos fatores

qualitativos da carne de frangos de corte tipo caipira. *R. Brás. Agrociências*. v. 9, n.3, p. 191-

194. 2003.

WEI, L.; LI, X.Y.; YAO, Y.Z.; LIANG, J.P.; LAI, D.Y.. Population genetic structure and

maternal origins of Xuefeng black bone chicken based on mtDNA control region sequences.

Não publicado. 2008.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a avicultura brasileira se encontra em uma posição de destaque mundial, possuindo os mais altos padrões sanitários, tecnológicos e genéticos do mundo. Esta é uma das maiores e mais importantes atividades do agronegócio brasileiro.

Além do aumento crescente na produção desta atividade, vem ocorrendo, por parte dos consumidores, uma busca por produtos considerados mais saudáveis. Isto torna as aves caipiras um interessante e lucrativo produto de mercado. Um outro ponto a ser considerado é que o aumento no consumo deste tipo de produto, que é produzido quase que exclusivamente como agricultura familiar, leva a inclusão destas famílias no mercado de trabalho. Portanto, o resgate da galinha caipira não só levou a geração de uma mercadoria diferenciada, como também melhorou a produção e as condições econômicas destas famílias incluindo-as neste mercado. Desta forma, tornou-se importante ao produtor familiar ter uma noção de genética e de métodos de acasalamento destes animais, visando o melhoramento animal e com isso o aumento da produção com um menor custo. Assim, pesquisas que determinem a variabilidade genética e o grau de parentesco de galinhas caipiras são altamente relevantes.

O mtDNA é uma ferramenta muito eficaz para traçar a origem materna dos animais e determinar a variabilidade genética não nuclear. Pesquisas com mtDNA nas galinhas caipiras pode auxiliar na determinação desta origem e estabelecer quais linhagens maternas compõe a formação destas aves. Embora este trabalho não tenha de forma alguma englobado todas as galinhas caipiras brasileiras, estes resultados serviram para traçar a composição de uma pequena parte destas, as quais são em sua maioria originárias de raças de origem asiática.

Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho têm como objetivo contribuir para o conhecimento da composição genética destas aves e de sua variabilidade genética, assim como, servir como uma ferramenta para futuros programas de melhoramento genéticos nestes animais.

REFERÊNCIAS:

AGNOLIN, F.L.; NOVAS, F.E.; LIO, G.. Neornithine bird coracoid from the Upper Cretaceous of Patagonia. *Ameghiniana*. v.43, n.1, p. 245-248. 2006.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.. *Biologia Molecular da Célula*, 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584 p.

ALBINO, L.T.F.; SILVA, J.H.V.; VARGAS JÚNIOR, J.G.. Criação de Frango e Galinha Caipira: Avicultura alternativa. 2. ed. Revisada e Ampliada, Viçosa: Aprenda Fácil, 2005. 208 p.

ALBINO, L. F. T.; MOREIRA, P. Criação de Frango e Galinha Caipira. Viçosa: Centro de Produções Técnicas – CPT, 2006. 198 p.

ARANGUREN-MÉNDEZ, A.J.; ROMÁN-BRAVO, R.; ISEA, W.; VILASSMIL, Y.; JORDANA, J.. Los microsátélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal*, v. 13, n. 1, p. 30-42, 2005.

BARBOSA, F.J.V.; NASCIMENTO, M.P.S.B.; DINIZ, F.M.; NASCIMENTO, H.T.S.; ARAÚJO NETO, R.B.. Sistema alternativo de criação de galinhas. *EMBRAPA*, nov. 2007.

Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/SistemaAlternativoCriacaoGalinhaCaipira/Origemgenealogica.htm>> Acesso em: 3 dez. 2012.

BENSASSON, D.; ZHANG, D.X.; HARTL, D.L.; HEWITT, G.M.. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 16, p. 314-321. 2001.

BNDES. Banco Nacional do Desenvolvimento. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Relato Setorial da Avicultura**. Ago. 1995. 43 f. Disponível em:

<http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/relato/rsfrango.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CLARKE, J.A.. Morphology, phylogenetic taxonomy, and systematics of *Ichthyornis* and *Apatornis* (Avialae: Ornithurae). *Bulletin of the American Museum of Natural History*. v. 286, p. 1-179. 2004.

CLEMENTINO, C.S.; BARBOSA, F.J.V.; CARVALHO, A.M.F.; COSTA-FILHO, R.A.R.; SILVA, G.S.; CAMPELO, E.G.; BRITTO, F.B.; DINIZ, F.M.. Microsatellite DNA loci for population studies in Brazilian chicken ecotypes. *Int. J. Poult. Sci.*, v. 9 , n. 12, p. 1100-6. 2010.

CRAWFORD, R. D. *Poultry Breeding and Genetics*. Developments in Animal and Veterinary Sciences. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1990. 1122 p.

DAMBRÓS JUNIOR, D.. A avicultura no Brasil. *EMBRAPA*, jul. 2010. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=15> Acesso em: 3 dez. 2012.

DANCAUSE, K.H.; VILAR, M.G.; STEFFY, R.; LUM, J.K.. Characterizing genetic diversity of contemporary pacific chickens using mitochondrial DNA analyses. *Plos One*. v. 6, n. 2, p. 1-6. 2011.

DESJARDINS, P.; MORAIS, R.. Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J Mol Biol*. v. 212, p. 599-634. 1990.

ERIKSSON, J.; LARSON, G.; GUNNARSSON, U.; BED'HOM, B.; TIXIER-BOICHARD, M.; STRÖMSTEDT, L.; WRIGHT, D; JUNGRIUS, A.; VEREIJKEN, A.; RANDI, E.; JENSEN, P.; ANDERSON, L.. Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken. *PLOS Genetics*. v. 4, n. 2, p. 1-8. 2008.

FALEIRO, F. G. Marcadores genético-moleculares: Aplicados a programas de

conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FANTASTIC FARM, Types of chicken. Review of different breeds of chicken. *Fantastic farm*, 2012. Disponível em: <http://www.small-farm-permaculture-and-sustainable-living.com/types_of_chickens.html>. Acesso em: 6 dez. 2012.

FAVRETTO, M.A.. As aves do período cretáceo da era mesozóica. *Atualidades ornitológicas*. n.154, p. 60-63. 2010.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220 p.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C.; ÁVILA, V.S.. *Raças e Linhagens de Galinhas para Criações Comerciais e Alternativas no Brasil*. Concórdia, SC: Embrapa, 2003. 8 p.

FLOYD, J.. The aseel (or asil). *Feathersite*, 2001. Disponível em: <<http://www.feathersite.com/Poultry/Games/Asil/AsilShahJune01.html>>. Acesso em: 4 dez. 2012.

FONTEQUE, G.V.. *Investigação da variabilidade genética de quinze loci de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis*. 2011. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2011.

FRAKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A.. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 2008. 280 p.

FUMIHITO, A.; MIYAKE, T.; SUMI, S.; TAKADA, M.; OHNO, S.; KONDO, N.. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 91, p. 12505-12509. 1994.

FUMIHITO, A.; MIYAKE, T.; TAKADA, M.; SHINGU, R.; ENDO, T.; GOJOBORI, T.; KONDO, N.; OHNO, S.. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v. 93, p. 6792–6795. 1996.

GALTIER, N.; NABHOLZ, B.; GLÉMIN, S.; HURST, G. D. D.. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, v. 18, p. 4541–4550. 2009.

GEORGE WASHINGTON UNIVERSITY. The Evolution of Archaeopteryx: First Bird Considered to be 150 Million Years, *George Washington University*, 2002. Disponível em: <<http://www.gwu.edu/~bygeorge/march19ByG!/evolution.html>> Acesso em: 8 jan. 2013.

GISSI, C.; IANELLI, F.; PESOLE, G.. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congenetic especies. *Heredity*, v.101, 301–320. 2008.

GONGORA, J.; RAWLENCE, N.J.; MOBEGI, V.A.; JIANLIN, H.; ALCALDE, J.A.; MATUS, J.T.; HANOTTE, O.; MORAN, C.; AUSTIN, J.J.; ULM, S.; ANDERSON, A.J.; LARSON, G.; COOPER, A.. Indo-European and Asia origins for Chilean and Pacific chickens revealed by mtDNA. *PNAS*, v. 105, n. 30, p. 1008-10313. 2008.

GUAN, X.; GENG, T.; SILVA, P.; SMITH, E.J.. Mitochondrial DNA sequence and haplotype variation analysis in the chicken (*Gallus gallus*). *J. Hered.* v. 98, p. 723-726. 2007.

HAWKINS, D.. Blue Andalusians. *Mediterranean Standard Chicken Breed Class*. 1995. Disponível em: <http://www.afn.org/~poultry/breeds/andalusn.htm>. Acesso em: 4 dez. 2012.

HELLMEISTER FILHO, P. Efeito de fatores genéticos e do sistema de criação sobre o desempenho e o rendimento de carcaça de frangos tipo caipira. 2002. 92 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. 2002.

HOWARD, L.. Galliformes, *Animal diversity web*. 2004. Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Galliformes/> Acesso em: 27 nov. 2012.

IAC, International asil community. The asil – general breed information. IAC, 2007.

Disponível em: <<http://www.ganoi.com/asil/main/asilmania/breed/breed.htm>>. Acesso em: 4 dez. 2012.

KAYA, M.; YILDIZ, M. A. Genetic diversity among turkish native chickens, denizli and gerze, estimated by microsatellite markers. *Biochemical Genetics*, v. 46, p. 480-491, 2008.

KHRC, Keep Hens Raise Chickens. Andalusian – Chicken Breed. KHRC, nov. 2011.

Disponível em: <<http://keep-hens-raise-chickens.com/chicken-breeds/andalusian-chicken-breed>> Acesso em: 4 dez. 2012.

KOMIYAMA, T.; IEKO, K.; GOJOBORI, T.. The evolutionary origin of long-crowing chicken: its evolutionary relationship with fighting cocks disclosed by the mtDNA sequence analysis. *Gene*. v. 333, p. 91-99. 2004a.

KOMIYAMA, T.; IKEO, K.; TATENO, Y.; GOJOBORI, T.. Japanese domesticated chickens have been derived from Shamo traditional fighting cocks. *Mol Phylogenet Evol*. v. 33, p. 16-21. 2004b.

LANA, G. R. Q. Avicultura. Recife UFRPE: Rural, 2000. 268 p.

LCA, The Leghorn Club of Australia. LCA, 2010. Disponível em: <<http://leghornclubaustralia.webs.com/>> Acesso em: 5 dez. 2012.

LIMA-ROSA, C.A.V. *Estudo da variabilidade dos genes B-F (MHC classe I) e de um microssatélite associado a galinhas caipiras brasileiras*. 2004. p.96. Tese (Doutorado Genética e Biologia Molecular). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS.

LIMA-ROSA, C.A.V.; CANAL, C.W.; STRECK, A.F.; FREITAS, L.B.; CAÑEDO, A.D.; BONATTO, S.L.; SALZANO, F.M.. B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken. *Anim Genet*. v. 35, p. 278-384. 2004.

LIMA-ROSA, C.A.V.; CANAL, C.W.; FALLAVENA, P.R.V.; FREITAS, L.B.; SALZANO, F.M.. LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Genet Mol Biol.* v. 28, p. 386-389. 2005.

LIU, Y.P.; WU, G.S.; YAO, Y.G.; MIAO, Y.W.; LUIKART, G.; BAIG, M.; BEJA-PEREIRA, A.; DING, Z.L.; PALANICHAMY, M.G.; ZHANG, Y.P.. Multiple maternal origins of chickens: out the Asian jungles. *Mol Phylogenet Evol.* v. 38, p. 12-19. 2006a.

LIU, Y.P.; ZHU, Q.; YAO, Y.G.. Genetic relationship of Chinese and Japanese gamecocks revealed by mtDNA sequence variation. *Biochem Genet.* v. 44, p. 19-29. 2006b.

MORENG, R. E.; AVENS, J. S. *Ciência e Produção de Aves*. São Paulo: Roca, 1990. 380 p.

MWACHARO, J.M.; BJØRNSTAD, G.; MOBEGI, V.; NOMURA, K.; HANADA, H.; AMANO, T.; JIANLIN, H.; HANOTTE, O.. Mitochondrial DNA reveals multiples introductions of domestic chicken in east Africa. *Molecular Phylogenetics and Evolution.* v. 58, p. 374-382. 2011.

O'CONNOR, J.K.; ZHANG, Y.; CHIAPPE, L.M.; MENG, Q.; QUANGUO, L.; DI, L.. A new enantiornithine from the Yixian formation with the first recognized avian enamel specialization. *Journal of Vertebrate Paleontology*, v. 33, n. 1, p. 1-12. 2013.

OKA, T.; INO, Y.; NOMUARA, K.; KAWASHIMA, S.; KUWAYAMA, T.; HANADA, H.; AMAMO, T.; TAKADA, M.; TAKAHATA, N.; HAYASHI, Y.; AKISHINONOMIYA, F.. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. *Animal Genetics.* v. 38, p. 287-293. 2007.

PALUDO, E.. *Estudo da variabilidade dos genes B-LB do MHC da galinha (Gallus gallus domesticus) em aves caipiras brasileiras*. 2011. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias, Lages, 2011.

POSSAMAI, M. H. P.. *Análise da Variabilidade Genética de Linhagens de Galinhas Caipiras Brasileiras*. 2011. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2011.

POULTRY CRC.. Fancy breed chickens. *POULTRY CRC*, 2006. Disponível em: <<http://www.poultryhub.org/species/fancy-chicken-breeds/>>. Acesso em: 4 dez. 2012.

QUINN, T.W.; WILSON, A.C.. Sequence evolution in and around the mitochondrial control region in birds. *J Mol Evol.* v. 37, p. 417-425. 1993.

SERENO, P.C.. The origin and evolution of dinosaurs. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, v. 25, p. 435-489. 1997.

SINGH, U.; GUPTA, R.K.; SINGH, M.; GURUNG, B.S.. Reproduction and production performance of Aseel, an indigenous breed of chicken. *Indian Journal of Poultry Science.* v. 35, n. 2, p. 202-204. 2000.

STOREY, A.A.; RAMIREZ, J.M.; QUIROZ, D.; BURLEY, D.V.; ADDISON, D.J.; WALTER, R.; ANDERSON, A.J.; HUNT, T.L.; ATHENS, J.S.; HUYNEN, L.; MATISOO-SMITH, E.A.. Radiocarbon and DNA evidence for a pre-Columbian introduction of Polynesian chickens to Chile. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 104, p. 10335-10339. 2007

STOREY, A.A.; LADEFOGED, T.N.; MATISOO-SMITH, E.A.. Counting your chickens: density and distribution of chicken remains in archaeological sites of Oceania. *Int J Osteoarchaeology.* v. 18, p. 240-261. 2008.

STOREY, A.A.; ATHENS, J.S.; BRYANT, D.; CARSON, M.; EMERY, K.; FRANCE, S. de; HIGHAM, C.; HUYNEN, L.; INTOH, M.; JONES, S.; KIRCH, P.V.; LADEFOGED, T.; MCCOY, P.; MORALES-MUÑIZ, A.; QUIROZ, D.; REITZ, E.; ROBINS, J.; WALTER, R.; MATISOO-SMITH, E.. Investigating the global dispersal of chickens in prehistory using ancient mitochondrial DNA signatures. *Plos One.* v. 7, n. 7, p. 1-11. 2012.

STRINGHETA, P.C.; MUNIZ, J.N.. *Alimentos orgânicos*. Viçosa, MG: Editora UFV, 2004. p.37-128.

SULAVE, Galinha dos ovos azuis. *Sulave*, 2002. Disponível em: n<http://www.sulave.com.br/azuis_000.htm>. Acesso: 17 dez. 2012.

TURNER, A.H.; MAKOVICKY, P.J.; NORELL, M.A.. Feather quill knobs in the dinosaur *Velociraptor*. *Science*. v. 317. 2007.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura. História da Avicultura no Brasil. *UBABEF*, dez. 2012. Disponível em: < <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2675>>. Acesso em: 4 dez. 2012.

UCMP - University of California Museum of Paleontology. Archaeopteryx: an early bird. *UCMP*, 2013. Disponível em: < <http://www.ucmp.berkeley.edu/diapsids/birds/archaeopteryx.html>> Acesso em: 8 jan 2013.

UNDERHILL, A.P.. Current issues in Chinese neolithic archaeology. *Journal of World Prehistory*. v. 11, p. 103-160. 1997.

University of Illinois, Incubation and embryology. *University of Illinois Extension*, 2012. Disponível em: < <http://urbanext.illinois.edu/eggs/res10-breedhistory.html#1>> Acesso em: 5 dez. 2012.

USDA – United States Department of Agriculture. *Production, supply and distribution*. 2012. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdquery.aspx>>. Acesso em: 28 nov. 2012.

XU, X.; CLARK, J.M.; MO, J.; CHOINIÈRE, J.; FORSTER, C.A.; ERICKSON, G.M.; HONE, D.W.E.; SULLIVAN, C.; EBERTH, D.A.; NESBITT, S.; ZHAO, Q.; JIA, C.; HAN, F.; GUO, Y.. A Jurassic ceratosaur from China helps clarify avian digital homologies. *Nature*. v. 459, n. 18. 2009.

ZANUSSO, J.T.; DIONELLO, N.J.L.. Produção avícola alternativa – análises dos fatores qualitativos da carne de frangos de corte tipo caipira. *R. Brás. Agrociências*. v. 9, n.3, p. 191-194. 2003.

ZHAO, R.; XU, G.Y.; LIU, Z.Z.; LI, J.-Y.; YANG, N.. A study on eggshell pigmentation: biliverdin in blue-shelled chickens. *Poultry Science*, v.85, n.3, p.546-549, 2006.

