

GRAZIELA VIEIRA FONTEQUE

**INVESTIGAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE QUINZE *LOCI*
DE MICROSSATÉLITES EM GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS DE
OVOS AZUIS**

LAGES-SC

2011

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS
DEPARTAMENTO DE PRODUÇÃO ANIMAL**

GRAZIELA VIEIRA FONTEQUE

**INVESTIGAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE QUINZE *LOCI*
DE MICROSSATÉLITES EM GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS DE
OVOS AZUIS**

Dissertação apresentada à
coordenação do Curso de Mestrado
em Ciência Animal como requisito
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa

LAGES-SC

2011

GRAZIELA VIEIRA FONTEQUE

**INVESTIGAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE QUINZE *LOCI*
DE MICROSSATÉLITES EM GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS DE
OVOS AZUIS**

Dissertação aprovada à coordenação do curso de Mestrado em Ciência Animal,
como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Banca Examinadora

Orientador: _____

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

Membro: _____

Profa. Dra. Jaqueline Battilana
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro: _____

Profa. Dra. Melina Martha Baumgarten
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Lages, 03 de março de 2011

AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar e iluminar meu caminho, por ter me dado o presente do amor.

Ao meu marido Joandes Henrique Fonteque, o meu melhor amigo e companheiro em todas as horas. Você é o melhor presente que Deus me deu, Te Amo Muito!

A toda minha família: mãe Igner, pai Adair, vó Vilma, irmãos Flávia, Edilson, Mateus e família, minha sogra Maria José, a Joyce e família; pelo carinho e admiração.

Ao meu orientador, Professor Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa por aceitar a orientação, oportunizando a realização deste trabalho.

A Dra Jaqueline Battilana pela dedicação e disponibilidade despendida inúmeras vezes, seja na realização do experimento ou na redação da dissertação. Obrigada por fazer além do seu trabalho.

Ao Professor Dr. Altamir Guidolin por permitir a realização do trabalho no Instituto de Melhoramento e Genética Molecular (IMEGEM) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

A colega Ediane Paludo por ter me recebido no laboratório e me auxiliado nos primeiros passos.

As amigas do mestrado Andréia Rosa Machado e Francine B. Stefen Sakata, pelo companheirismo, pelas longas conversas e inúmeras gargalhadas. Foi muito bom conhecê-las, quero tê-las sempre como minhas amigas.

Ao Mestrado em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE QUADROS	7
LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. GALINHAS CAPIRAS	13
2.2. MICROSSATÉLITES.....	17
2.3. VARIABILIDADE GENÉTICA.....	18
3. OBJETIVOS	22
4. ARTIGO CIENTÍFICO	23
5. CONCLUSÃO GERAL.....	40
6. ANEXO.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Pintos caipiras de ovos azuis. (Figura extraída de Lima-Rosa, 2004.).....	14
Figura 2 -	Galinhas caipiras que põem ovos de coloração azul. (Figura extraída de Lima-Rosa, 2004.).....	14
Figura 3 -	Ovos azuis (Figura extraída do site http://www.sulave.com.br/azuis_000.htm).....	14
Figura 4 -	Casal de galinhas da raça Araucana que põem ovos de coloração azul. (Fonte: Site: WWW.fazendacalifornia.com).....	15

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Distribuição da frequência alélica em cada <i>locus</i>	35
Quadro 2 -	Distribuição da frequência gênica por <i>locus</i> . Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base.....	37
Quadro 3 –	Polimorfismo de 15 <i>loci</i> de microssatélites em 87 amostras de DNA de galinhas caipiras de ovos azuis.....	40
Quadro 4 -	Características dos <i>loci</i> de microssatélites utilizados.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AFLP - Amplified Fragment Length Polimorphic.
dATP – Desoxiadenosina Tri-fosfato.
dCTP - Desoxicitosina Tri-fosfato.
dGTP - Desoxiguanina Tri-fosfato.
dTTP - Desoxitimina Tri-fosfato.
DNA – Ácido desoxirribonucléico
EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg.
FAO - Food and Agriculture Organization.
HE – Heterozigosidade esperada.
HO – Heterozigosidade observada.
ISAG - International Society of Animal Genetics.
KCl – Cloreto de potássio.
mM – milimol.
MoDAD - Measurement of Domestic Animal Diversity.
PCR – Reação em cadeia da polimerase.
pH – Potencial hidrogenionico.
RAPDs - Random Amplified Polymorphic DNA.
SSR - Simple Sequence Repeats.

RESUMO

Galinhas caipiras brasileiras são aves rústicas, que, acredita-se, apresentam elevada diversidade genética. Entretanto, quase não há trabalhos científicos que comprovem a suposta alta variabilidade genética das aves caipiras. Trabalhos que investiguem esta questão são muito importantes, pois a comprovação científica deste polimorfismo transforma a manutenção e conservação destes animais imprescindível. O polimorfismo gênico é fundamental para a perpetuação da espécie, além de ser fonte de alelos para programas de melhoramento genético de animais de produção. As aves comerciais, por exemplo, perderam muito de sua variabilidade gênica por terem passado por rigorosos processos de seleção. Mesmo que estes animais sejam altamente produtivos, algumas características relacionadas à produção ainda merecem atenção dos melhoristas, como é o caso da resistência a doenças. Algumas galinhas caipiras brasileiras colocam ovos azuis. Esta coloração da casca do ovo é característica de uma raça sul-americana de galinhas que participou da formação das aves caipiras nacionais. Este trabalho utilizou quinze *loci* de microssatélites para avaliar a variabilidade genética de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Os animais foram provenientes do município de Dois Lajeados – RS. Através da técnica da PCR, os amplicons obtidos com a utilização de iniciadores marcados com fluoróforos foram genotipados em seqüenciador automático e os resultados obtidos analisados através do programa estatístico ARLEQUIN. Foi detectado um total de 168 alelos, com média de 11,2 alelos por *locus*, 288 genótipos, $HE=0,76$ e $HO=0,49$. Estes resultados comprovaram a suspeita de alta variabilidade genética presente em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis.

Palavras-chave: galinhas caipiras, ovos azuis, variabilidade genética, DNA microssatélites, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Brazilian Caipira chicken are hardy birds that, it is believed, show high genetic diversity. However, there is almost no scientific studies that prove the alleged high genetic variability of the Caipira chicken. Studies that investigate this issue are very important, because the scientific evidence of this polymorphism makes the maintenance and conservation of these animals essential. The gene polymorphism is fundamental to the perpetuation of the species, besides being a source of alleles for genetic improvement programs for livestock. The commercial birds, for example, have lost much of their genetic variability because they have been through strict selection processes. Even though these animals are highly productive, some features related to production still deserve the attention of breeders, such as disease resistance. Some brazilian (blue-egg Caipira) chicken. This coloration of the egg shell is characteristic of a South American breed of chickens that participated in the formation of the native caipira chicken. This study used fifteen microsatellite loci to assess the genetic variability of brazilian (blue egg caipira) chicken. The animals were from the city of Two Lajeados - RS. By PCR, the amplicons obtained using a primer labeled with fluorophores were genotyped in an automatic sequencer and the results analyzed using the statistical program ARLEQUIN. It was detected a total of 168 alleles with an average of 11.2 alleles per locus, 288 genotypes, $HE = 0.76$ and $HO = 0.49$. These results confirmed the suspicion of high genetic variability in brazilian (blue egg Caipira) chicken.

Key words: chicken Caipiras, blue egg, genetic variability, DNA microsatellite, molecular marker.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem apresentando uma posição de destaque no setor avícola mundial resultado de uma atividade com alto grau de desenvolvimento tecnológico. Os contínuos avanços em genética, sanidade, nutrição, manejo e ambiência, obtidos tanto em níveis nacionais quanto mundiais, têm sido aplicados no nosso setor avícola. Os avanços genéticos, por exemplo, são frutos dos programas de melhoramento genético, os quais selecionam animais com parâmetros zootécnicos de produção sucessivamente melhores. Estes programas de melhoramento são baseados na variação genética apresentada pelas populações de animais sob seleção. Portanto, a variação genética é a fonte básica do melhoramento animal, pois somente se poderá aumentar a frequência de um alelo (ou de uma combinação gênica) favorável em uma população, e assim melhorá-la geneticamente, se ocorrer polimorfismo no(s) *locus*(s) em questão. Paradoxalmente, os processos seletivos que visam parâmetros produtivos como, por exemplo, desenvolvimento precoce ou produção de ovos, geralmente tornam as linhagens muito uniformes, diminuindo, assim, a variabilidade genética populacional.

Obviamente que, ao se concentrar um determinado alelo favorável em uma população, se estará diminuindo a variação do *locus* gênico deste alelo, o que é o objetivo de um programa de melhoramento. O problema é que, ao mesmo tempo em que isto ocorre, também se diminui a variação de *locus* que não estão relacionados com a característica sob seleção. Esta diminuição tem afetado características como a resistência a doenças que, em geral, não são consideradas nos programas de melhoramento animal, e onde a diminuição da variação irá predispor a população a se tornar mais suscetível a doenças.

Recentemente pode-se ter uma noção da gravidade do problema que pode ser causado na eventualidade de instalação de uma pandemia no setor avícola, principalmente quando se tem a maioria das aves sensíveis ou pouco resistentes a patógenos. Um dos casos mais alarmantes foi o da gripe aviária que, no ano de 2005, em consequência das aves infectadas e o risco do contágio humano optou-se como medida de prevenção pelo abate de cerca de 80 milhões de aves (PADUAN, 2005). Surtos de doenças têm deixado produtores e pesquisadores em estado de alerta e preocupados com a manutenção da variabilidade genética das populações locais.

Nos últimos anos a avicultura nacional tem se voltado para o resgate desta diversidade genética e uma série de linhagens mais rústicas, as chamadas linhagens caipiras, têm sido desenvolvidas por diversas empresas privadas ou órgãos públicos. O objetivo é produzir aves mais resistentes que possam ser criadas em sistemas extensivos ou de semiconfinamento. Entretanto, quase não há trabalhos científicos que comprovem a suposta alta variabilidade genética das aves caipiras, o que torna as pesquisas nesta área imprescindíveis para o aprimoramento da agropecuária nacional.

Tais pesquisas visam o melhor conhecimento dos processos genéticos destes animais, conhecimento esse que é fundamental para os programas de melhoramento animal. Portanto, para o aprimoramento genético das galinhas caipiras é preciso conhecer a variação gênica apresentada por estes animais. E, a partir desta informação, iniciar trabalhos que visem o melhoramento genético destas aves mantendo o polimorfismo em *locus* onde a variação é crucial, o que aumentará a produção, tornando esta atividade ainda mais lucrativa. Para aumentar o conhecimento desta variabilidade é necessário que novos *loci* sejam investigados. Sendo os marcadores moleculares importantes quando se desconhecem os genes responsáveis por uma característica, pois se pode associá-la a um marcador, o qual poderá ser utilizado em programas de melhoramento genético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Galinhas caipiras

As galinhas domésticas são originárias do Sudoeste da Ásia e descendem única ou principalmente, de uma ave silvestre, a galinha Vermelha do Mato (*Red Jungle Fow*), que foi classificada inicialmente como *Gallus bankiva* (CRAWFORD, 1990) e recentemente como *Gallus gallus gallus*; ave selvagem ainda encontrada nas selvas do Sudoeste Asiático (PICOLI, 2004). Outras espécies como a galinha de Java (*Gallus varius*), do Ceilão (*Gallus lafayetti*) e a de Sonnerat (*Galus sonnerati*), para alguns pesquisadores, também contribuíram para o desenvolvimento da galinha moderna – *Gallus gallus domesticus* (NISHIBORI et al. 2005; RODRIGUES et al. 2006).

As galinhas foram introduzidas no Brasil pelos primeiros navegadores europeus que aqui desembarcaram, por volta de 1500 (GOMES e ALBINO, 1998; ALBINO et al. 2001). De acordo com a carta histórica escrita por Pero Vaz de Caminha ao rei de Portugal Dom Manuel, de 22 de abril de 1500, foi de espanto e admiração a reação dos índios ao terem contato com os primeiros exemplares de galinhas trazidas ao Brasil (PICOLI, 2004). Entretanto, é provável que os corsários franceses, muito antes do descobrimento, também tenham trazido galinhas, quando abasteciam seus navios com pau-brasil e animais silvestres e os trocavam por espelhos, pentes, ferramentas e galinhas que sobravam de suas despensas (MESQUITA, 1970).

Eles trouxeram raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa, que foram deixadas em liberdade nos quintais das casas, sítios e fazendas. Proporcionando cruzamentos aleatórios e, desta miscigenação de raças, originaram-se as galinhas caipiras brasileiras, ou simplesmente, galinhas caipiras (caipira em tupi-guarani significa “habitante do campo”), que também são conhecidas como galinhas crioulas, da colônia, de terreiro, de capoeira ou naturalizadas. Algumas destas galinhas caipiras põem ovos de coloração azul (Figuras 1, 2 e 3).



Figura 1 - Pintos caipiras de ovos azuis. (Figura extraída de Lima-Rosa, 2004.)



Figura 2 - Galinhas caipiras que põem ovos de coloração azul. (Figura extraída de Lima-Rosa, 2004.)



Figura 3 - Ovos azuis (Figura extraída do site http://www.sulave.com.br/azuis_000.htm).

Esta coloração da casca do ovo, que vai do azul turquesa ao verde, é característica de uma raça sul-americana de galinhas chamada Araucana (Figura 4). Aves oriundas do Noroeste do Chile, da região de Arauca, a única raça de galinhas que originalmente põe ovos azuis.



Figura 4 – Casal de galinhas da raça Araucana que põem ovos de coloração azul. (Fonte: Site: WWW.fazendacalifornia.com).

Segundo Zhao et al. (2006), a pigmentação azul da casca do ovo é resultante da deposição de biliverdina, a qual tem como local de biosíntese a glândula da casca do ovo. Sendo a determinação do local de biosíntese da biliverdina essencial para o conhecimento do processo bioquímico e base genética da pigmentação da casca do ovo. Kennedy e Vevers (1973), observaram que ovos azuis das galinhas Araucana continham biliverdina-IX, zinco quelato biliverdina e protoporfirina-IX na casca do ovo. Em uma pesquisa de 108 espécies de aves conduzida por Kennedy e Vevers (1976), juntamente com a pesquisa de Schwartz et al. (1980), mostraram que somente biliverdina-IX e zinco quelato biliverdina poderiam ser detectados nos ovos azuis ou verdes de aves domésticas, ovos de casca marrom continham grandes quantidades de protoporfirina.

A origem destas aves ainda é incerta, entretanto há fortes evidências de que seja pré-colombiana, ou seja, quando Colombo, Cabral e os demais “descobridores” das Américas chegaram aqui, estas galinhas já eram bastante difundidas entre os índios, em particular entre os sul-americanos (CRAWFORD, 1990;

<http://home.wanadoo.nl/gjosinga/raseng/araucane.htm>). Por volta de 1880 estas aves expandiram-se pelo Brasil e, por mistura, acabaram participando da formação das galinhas caipiras brasileiras (LIMA-ROSA, 2004).

O processo de domesticação iniciado há mais de 12.000 anos possibilitou a utilização dos animais para diversos fins de interesse humano. A produção de alimentos foi uma das atividades que mais se desenvolveu graças a rigorosos programas de manejo e melhoramento genético animal que, por conseguinte pôs em risco a diversidade genética das populações (SAHAI e VIJH, 2000). Neste contexto, as galinhas caipiras quase foram exterminadas nos anos de 1930, quando a avicultura nacional iniciou um processo de transformação e as aves mais produtivas começaram a substituir as galinhas caipiras, substituições estas intensificadas nas décadas de 1960 e 1970, quando linhagens especializadas em ovos (postura), em carne (corte) ou mistas (dupla aptidão) foram desenvolvidas e a avicultura industrial estabeleceu-se definitivamente no país (MORENG e AVENS, 1990; GOMES e ALBINO, 1998). Na presença de aves altamente produtivas, as galinhas caipiras não tiveram mais espaço e foram preservadas apenas porque permaneceram esquecidas nas pequenas propriedades do interior (CERRI, 1992).

Nos anos 80 ocorreu uma valorização dos produtos naturais. Tal fato tornou as galinhas caipiras potencialmente lucrativas, pois, como são aves criadas de maneira mais natural, são consideradas mais saudáveis, não sendo dependentes de antimicrobianos ou antiestressantes (CERRI, 1992; GESSULLI, 1999; RAMOS, 1995), o que as coloca na categoria dos “alimentos naturais”. Atualmente essas aves são consideradas alimento nobre em todas as regiões do país, uma vez que a cor, textura, odor e sabor da carne, aliadas a ovos com características organolépticas específicas, são elementos que as diferenciam de outras raças disponíveis no mercado (BARBOSA, 2006).

As galinhas caipiras caracterizam-se pela sua alta variabilidade genética e pela sua grande rusticidade (resistência a doenças, a condições adversas de clima, temperatura e alimentação) (ALBINO et al. 2001). Entretanto, em termos científicos, pouco se conhece desta suposta alta variabilidade genética das aves caipiras. Apenas dois trabalhos científicos recentes, Lima-Rosa et al. (2004) e Lima-Rosa et al. (2005) investigaram a variabilidade genética destas aves, e em somente três *loci* gênicos. Estes trabalhos demonstraram que estas aves apresentam grande polimorfismo gênico, muito do qual ainda não descrito para aves comerciais,

tornando-as um bom reservatório genético. Sendo assim, estes organismos são de especial atenção na busca de um maior esclarecimento para esta questão.

2.2. Microssatélites

O estudo genético a partir de marcadores moleculares foi impulsionado pelo desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*). Descoberta por Mullis, em 1983, a técnica consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase (MULLIS, 1990). A sensibilidade e simplicidade dessa técnica são responsáveis pelo impacto gerado no desenvolvimento de novos marcadores. O princípio de amplificação do DNA *in vitro* foi então, utilizado para o desenvolvimento dos marcadores *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPDs), *Amplified Fragment Length Polimorphic* (AFLP) e microssatélites (REGITANO e COUTINHO, 2001; BORÉM e CAIXETA, 2006).

Microssatélites, ou seqüências microssatélites são seqüências de DNA moderadamente repetitivo, conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR), que estão presentes no genoma de vertebrados, insetos e plantas (CHARLESWORTH et al. 1994). Apresentam herança mendeliana codominante e são, presumidamente, neutras em termos seletivos. Em sua maioria, são repetições de mono, tetra ou, principalmente, dinucleotídeos e estão localizadas entre os genes ou dentro de íntrons (ENGEL et al. 1996). Um alelo de microssatélite é designado conforme a variação no número das pequenas subunidades (1-6 pb) que o compõem ou de acordo com a homologia de sua seqüência de bases. O uso destes marcadores de DNA fundamenta-se no fato deles serem altamente polimórficos, representando boas ferramentas para análises de variabilidade genética, e também por que podem atuar como marcadores de genes de interesse, pois podem estar associados diretamente a estes genes (COUTINHO, 1999; ENGEL et al. 1996; SCHMIDT e LEDUR, 1999; YUNIS et al. 2002).

Quando amplificadas via PCR, estas seqüências apresentam grande variação de comprimento ou de alelos entre os indivíduos. A principal causa do polimorfismo encontrado é consequência do deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante o processo de replicação (ELLEGREN, 2004). O alto nível polimórfico, a estabilidade e a herança co-dominante (possibilidade de identificação de homozigotos e

heterozigotos) dos microssatélites tornaram esse marcador altamente eficaz em estudos populacionais (REGITANO e COUTINHO, 2001).

Em 1995 a *Food Agriculture Organization* (FAO) juntamente com a *International Society of Animal Genetics* (ISAG) formaram um grupo de consultores que elaboraram diretrizes e recomendações técnicas para a avaliação da diversidade genética em raças de animais domésticos. Através de um projeto intitulado *Measurement of Domestic Animal Diversity* (MoDAD) (http://www.fao.org/dad_is) selecionaram uma lista de *loci* de microssatélites para estudos de diversidade genética, caracterização de raças de bovinos, ovinos, suínos e aves. No ano de 2004, a lista foi ampliada com a inclusão de novos marcadores (FAO, 2004). Essa iniciativa permite a comparação entre estudos de diversas populações devido à possibilidade de uniformização dos dados gerados ao redor do mundo.

Muitas são as suas utilidades e atualmente eles são empregados como marcadores de DNA para estudos de variabilidade genética na maioria das espécies de animais domésticos. Na avicultura, o uso de microssatélites como marcadores de variabilidade genética também tem sido bastante utilizado.

2.3. Variabilidade genética

A variabilidade genética é de fundamental importância para a definição de estratégias de preservação e conservação de grupos genéticos com características únicas de adaptabilidade, em populações que se encontram em risco de extinção (BARBOSA, 2006).

Segundo Gama (2004), a variabilidade genética total das espécies está representada pela contribuição da variabilidade intra-racial e inter-racial. Diante disso, verifica-se a importância de mensurar a variabilidade genética, visto que a conservação dos recursos genéticos está efetivamente relacionada com a manutenção da variabilidade inter-racial evitando a extinção das raças, assim como a manutenção da variabilidade genética intrarracial evitando a erosão genética (MENEZES, 2005).

Estas raças geralmente apresentam importância regional, e podem fornecer produtos de qualidade superior em termos agroecológicos e socioeconômico, se submetido a práticas de manejo adequadas (SAGRILLO, 2002).

Entretanto, a variabilidade genética encontra-se sob constante pressão de seleção na avicultura industrial (PEREIRA, 2004). O uso intensivo de linhagens na formação de híbridos para a produção de carne e ovos é uma das principais causas da diminuição da variabilidade genética, da mesma forma que a utilização de métodos genéticos para purificação de linhagens comerciais tem resultado em alterações fisiológicas, tornando as aves menos adaptadas e mais dependentes do ambiente disponibilizado pelo homem (BOSCHIERO et al. 2007; LEDUR et al. 2007).

Em programas de melhoramento animal, a informação quanto à diversidade e divergência genética entre os grupos fenotípicos existentes é essencial para o uso dos recursos genéticos (PINTO et al. 2005; SARTÓRIO, 2008). Principalmente, devido ao fato de muitos caracteres de interesse econômico terem o seu modo de herança mais complexo, com a atuação de vários genes de pequeno efeito sobre o fenótipo (PEREIRA, 2004; RAMALHO, 2008).

Tadano et al. (2007) estudaram a diversidade genética e a relação entre nove raças de galinhas Japonesas de cauda longa (Shoukoku, Koeyoshi, Kurokashiva, Minohiki, Ohki, Onagadori, Satsumadori, Toumaru e Toutenkou) junto com duas raças comerciais (Hjite leghorn e White Plymouth Rock). Foram utilizados 40 marcadores microssatélite polimórficos abrangendo 23 grupos de linhagens, e observaram que a menor diversidade foi encontrada em Koeyoshi ($HO=0,27$, $HE=0,29$). Esse resultado reflete o presente estado de criação da Koeyoshi, em que o cruzamento endogâmico está normalmente inserido dentro de uma população com limitações geográficas como no norte do Japão e que sofreram seleção para melhorar a característica do canto do galo.

Vanhala et al. (1998), estudaram a variabilidade genética de oito linhagens de galinhas (White Legorn, Finnish Landrace, Rhode Island Red e galinhas híbridas), usando nove marcadores microssatélites. Os resultados demonstraram que todos os *loci* de microssatélites foram polimórficos e o número de alelos variou entre 4-13 por *locus* e 1-10 por linhagem. Observaram ainda heterozigose de 0,00 a 0,91, sendo a maior heterozigose média por linhagem de 0,67 e a menor de 0,29 em galinhas híbridas e em White Legorn. Confirmando a utilidade dos microssatélites para a pesquisa da variabilidade genética, mesmo com a utilização de pequeno número de microssatélites.

Romanov e Weigend (2001), avaliaram a diversidade genética e a distância genética entre 224 indivíduos de 20 populações utilizando 14 marcadores de

microsatélites em galinhas. As informações sobre população e relação genética entre as raças estimadas pela análise de microsatélites foi útil inicialmente para definir objetivos para futuras investigações de variação genética e desenvolvimento de estratégias de conservação.

Dávila et al. (2009), estudaram a variabilidade genética e a divergência genética de 13 raças de galinhas espanholas usando 24 marcadores microsatélites, e demonstraram que os microsatélites foram úteis para a determinação da variação genética das raças de galinhas mostrando alto grau de polimorfismo, grande capacidade para discriminar paternidade, e alto grau de diferenciação populacional.

Kaya e Yildiz (2008), avaliaram a diversidade genética de galinhas nativas da Turquia (Denizli e Gerzer) utilizando 10 marcadores microsatélites e observaram grande variabilidade genética demonstrando que estas raças estão sendo preservadas como tentativa de conservação.

A diversidade genética de 11 populações preservadas de galinhas de raças nativas foi analisada por 20 marcadores microsatélites com alto polimorfismo por Gao et al. (2004). Cheng et al. (2003) utilizaram cinco marcadores de microsatélites com alto polimorfismo para determinar a diversidade genética de sete raças de galinhas. Tu et al. (2005) utilizaram trinta marcadores microsatélites com médio e alto polimorfismo para determinar a diversidade genética de oito raças de galinhas em Sichuan.

Clementino et al. (2010), avaliaram a diversidade genética em 92 galinhas, distribuídas em quatro populações de galinhas naturalizadas da região meio-norte do Brasil (Graúna, Brejeira, Nordestina e Teresina), através do uso de dez *loci* de microsatélites que se apresentaram polimórficos; e concluíram com este trabalho que as populações estudadas mostraram grande variabilidade genética, estando presente a maior variabilidade genética nos grupos Brejeira e Nordestina.

Segundo Mariante e Cavalcante (2006), o processo de formação das raças atuais envolveu a perda e concentração de alguma diversidade genética nos estágios iniciais. Cada raça formada pode ter adquirido uma combinação única de alelos, sendo a presença e a frequência das formas alélicas a base da variação entre os indivíduos. A diversidade genética dentro de cada uma dessas populações formadas é refletida na variedade de raças que existem e também na variação presente dentro de cada uma delas (GAMA, 2006).

Galinhas nativas são conhecidas por serem boas forrageiras (ir à busca de forragens) e mães eficientes, e requererem o mínimo de cuidado para o desenvolvimento. Elas são, entretanto muito adaptadas para crescer sobre condições controladas. Essas aves necessitam de atenção especial com respeito a sua conservação e melhoramento, pois estas galinhas nativas estão tornando-se extintas devido a sua pobre performance industrial. Conseqüentemente existe a necessidade de definir populações de galinhas e programas de conservação e melhoramento para beneficiar pessoas que moram em áreas rurais. Pode-se assumir que raças locais contem genes e alelos pertinentes a sua adaptação a ambientes particulares e criações locais. Como raças locais são necessárias para manter a fonte genética permitindo a adaptação para cruzamentos imprevistos requeridos no futuro e podem servir como fonte de material de pesquisa (ROMANOV e WEIGEND, 2001).

A importância em manter a diversidade genética em animais domésticos é defendida mundialmente pela *Food and Agriculture Organization* (FAO). Nos últimos anos na avicultura, somente limitadas raças que apresentam demanda econômica são criadas em grande escala. Esta limitação do número de raças provavelmente resultou em uma diminuição da diversidade genética em galinhas domésticas, devido a essas raças comerciais ou seus híbridos serem gerados durante um curto período de tempo para satisfazer o benefício econômico. Por outro lado, raças nativas que não são usadas para propósito industrial têm maior diversidade genética quando comparada com raças comerciais. Portanto, a conservação de raças nativas como fonte genética é importante para a demanda de cruzamentos necessários no futuro (TADANO et al. 2007).

3. OBJETIVOS

- Investigar a variabilidade genética das galinhas caipiras brasileiras que põem ovos azuis em quinze *loci* de microssatélites;
- Caracterizar geneticamente, através dos resultados encontrados nesta investigação, as galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis;
- Calcular as freqüências alélicas e genotípicas para estes *loci* nesta população;
- Comparar as freqüências alélicas e genotípicas encontradas para estes *loci* nesta população com as já descritas na literatura para outras populações.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Investigação da variabilidade genética de quinze *loci* de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis ¹

Graziela Vieira Fontequé² e Carlos André da Veiga Lima-Rosa^{2*}

ABSTRACT.- Fontequé, G.V. & Lima-Rosa, C.A.V. 2011. [Investigation of the genetic variability of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken.] Investigação da variabilidade genética de quinze *loci* de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. *Pesquisa Veterin ria Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Produ o Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC 88.520-000, Brazil. E-mail: grazi.medvet@hotmail.com

The purpose of this study was to investigate the genetic variability of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken. We collected blood samples from 87 Brazilian (blue-egg Caipira) chicken from properties in rural town of Dois Lajeados, RS. After extraction of DNA markers were used for fifteen microsatellite loci: LEI0248, LEI0221, LEI0214, LEI0192, LEI0217, LEI0254, LEI0194, LEI0212, MCW0371, ADL0278, LEI0234, MCW0183, MCW0216, MCW0330 and MCW0081 that were amplified by the technique of Polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was conducted using the program ARLEQUIN see 3.5 and determined the allelic, genotypic and estimates of expected heterozygosity (HE) and observed (HO) and deviations from Hardy-Weinberg equilibrium for each microsatellite locus. The results showed a total of 168 alleles (together accounting for 15 alleles of loci), with fragments ranging from 83 to 490 base pairs, with an average of $11,20 \pm 7,38$ alleles, HE $0,76 \pm 0,14$, and HO $0,49 \pm 0,21$. We conclude that the microsatellites used are polymorphic and can therefore be used for genetic studies in chickens. The population of Caipira blue egg chicken examined gene shows great variability, which

¹ Recebido em

Aceito para publica o em

²Departamento de Produ o Animal, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luiz de Camões 2090, Lages, SC 88519-000, Brasil. *Autor para correspondência: a2ca@cav.udesc.br

makes them an important source of genetic resources, which can then be used in future programs of genetic animal improvement.

INDEX TERMS: Caipira chicken, blue eggs, genetic variability, DNA microsatellite, molecular markers.

RESUMO- O objetivo deste trabalho foi investigar a variabilidade genética de quinze *loci* de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Foram coletadas amostras de sangue de 87 galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis provenientes de propriedades da região rural do município de Dois Lajeados, RS. Após extração do DNA foram utilizados marcadores para quinze *loci* de microssatélites: LEI0248, LEI0221, LEI0214, LEI0192, LEI0217, LEI0254, LEI0194, LEI0212, MCW0371, ADL0278, LEI0234, MCW0183, MCW0216, MCW0330 e MCW0081 que foram amplificados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A análise estatística foi conduzida utilizando o programa ARLEQUIN ver 3.5 e determinadas às frequências alélicas, genotípicas e estimativas de heterozigosidade esperada (HE) e observada (HO) e desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada *locus* de microssatélite. Os resultados demonstraram um total de 168 alelos (somando os alelos dos 15 *loci*), com os fragmentos variando entre 83 e 490 pares de base, com número médio de alelos de $11,20 \pm 7,38$, HE de $0,76 \pm 0,14$ e HO de $0,49 \pm 0,21$. Conclui-se que os microssatélites utilizados são polimórficos e que podem, portanto, serem utilizados para investigações genéticas em galinhas. A população de galinhas caipiras de ovos azuis analisada apresenta grande variabilidade gênica, o que as torna uma importante fonte de recursos genéticos, e que poderão, assim, serem utilizadas em futuros programas de melhoramento genético animal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: galinha caipira, ovos azuis, variabilidade genética, DNA microssatélites, marcadores moleculares.

INTRODUÇÃO

A chegada dos primeiros navegadores europeus ao Brasil em 1500 corresponde à introdução das galinhas neste país (Gomes & Albino, 1998; Albino et al., 2001).

Raças orientais, mediterrâneas e do sul da Europa trazidas por eles, foram deixadas em liberdade, e o cruzamento destas raças deu origem às galinhas caipiras brasileiras, um tipo de ave não comercial. Algumas galinhas caipiras põem ovos azuis, herança de uma raça de galinhas sul-americanas, as Araucanas, que, por mistura, também contribuíram na formação das caipiras nacionais (Lima-Rosa, 2004). Devido a sua rusticidade e diversidade genética, as galinhas caipiras brasileiras têm se adaptado a condições adversas de clima, temperatura e alimentação, assim como se destaca sua alta resistência a doenças (ALBINO et al., 2001). Porém, apesar destas características, muitas destas populações não comerciais encontram-se em risco de extinção, devido, principalmente, a baixa produtividade. O que torna necessário definir estratégias de preservação e conservação destes grupos que apresentam características únicas de adaptabilidade a ambientes rústicos (Barbosa, 2006). A investigação da variabilidade genética das galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis é uma das maneiras de se comprovar a importância da conservação destes animais para preservação da diversidade da espécie. Tal diversidade já foi em parte demonstrada por Lima-Rosa et al. (2004 e 2005) ao analisarem um *locus* de microssatélites e dois genes do sistema imune nesta população. Para uma maior definição desta variabilidade, um maior número de *loci* deve ser avaliado. Este trabalho realizou esta investigação utilizando 15 marcadores microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSR). Marcadores deste tipo são indicados nestas análises, pois, em geral, apresentam elevado polimorfismo (KAISER et al., 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

As análises da variabilidade dos *loci* de microssatélites foram realizadas no Laboratório de Análises Genéticas (DNA UDESC) do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC (IMEGEM) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) localizada no município de Lages, SC. Para as análises experimentais foram utilizadas 87 amostras de sangue de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis provenientes de propriedades da região rural do município de Dois Lajeados, RS. A análise dos *loci* microssatélites foi realizada após a extração do DNA total isolado de amostras de sangue periférico através do protocolo estabelecido por Sambrook et al. (1989). A amplificação dos fragmentos de DNA desejados foi realizada pela técnica da Reação

em Cadeia da Polimerase (PCR), conforme descrita por McConnell et al. (1999), a partir do DNA total. Foram utilizados iniciadores marcados com fluoróforos para quinze *loci* de microssatélites: LEI0234, LEI0248, LEI0221, LEI0214, LEI0192, LEI0217, LEI0254, LEI0194, LEI0212 (McConnell et al; 1999), MCW0371 (Fulton et al; 2006), ADL0278, MCW0183, MCW0216, MCW0330 e MCW0081 (FAO, 2004). As misturas para as reações da PCR e respectivas concentrações dos reagentes foram as seguintes: 50ng de DNA, 2,5µL de tampão 10X (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 0,5-2 µL (10-40 mM) de MgCl₂, 2 µL da mistura de dNTP (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 µM de cada iniciador, 0,25 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e H₂O para completar o volume final de 25 µL. A mistura total da reação PCR foi submetida ao termociclador gradiente modelo *Veriti® 96-well thermalcycler* (Applied Biosystems) nas seguintes condições de amplificação: 1 minuto de desnaturação inicial a 96°C; 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 96°C, 30 segundos de anelamento a 51-58°C (dependendo do par de iniciadores) e 30 segundos de extensão a 72°C; bem como 3 minutos de extensão final a 72°C. Para a tipagem dos microssatélites os produtos amplificados foram submetidos a genotipagem em seqüenciador automático (ABI 3130 da Applied Biosystems) as seqüências foram analisadas com programa Gene Mapper ID Software v3.2 (Applied Biosystems). A análise estatística foi conduzida utilizando o programa ARLEQUIN ver 3.5. Freqüências alélicas, genotípicas e estimativas de heterozigidade esperada (HE) e observada (HO) e desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculados para cada *locus* de microssatélite.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nível de marcadores moleculares a diversidade genética de uma população pode ser mensurada pela freqüência de genótipos e alelos, pela proporção de *locus* polimórficos e pela heterozigidade esperada e observada (NEI, 1973).

Os quinze *loci* de microssatélites utilizados neste estudo mostraram-se eficientes na amplificação e genotipagem do DNA das galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. A amplificação das amostras de DNA de 87 galinhas caipiras nos quinze *loci* de microssatélite gerou um total de 168 alelos (somando os alelos de cada *loci*), com os amplicons variando entre 83 e 490 pares de base.

O número de alelos de um *locus* de microssatélite por população de galinhas pode variar muito, podendo ir de um (monomórfico) até vários (polimórfico) (Cheng et al., 1995). Considera-se um *locus* polimórfico quando o alelo mais comum tem frequência inferior a 0,95. A maioria dos *loci* estudados apresentou alto polimorfismo. Descrições das frequências alélicas e número de alelos encontrados para cada *locus* estão apresentados no Quadro 1.

Este significativo polimorfismo da amostra para a maioria dos *loci* analisados pode ser evidenciado ao se comparar estes dados com o encontrado para os mesmos *loci* em outros trabalhos. Por exemplo, Clementino et al. (2010) ao analisar 92 amostras provenientes de quatro grupos populacionais de aves caipiras nordestinas com o uso de dez *loci* de microssatélites, encontraram 14-16 alelos para o *locus* LEI0192, 8-12 alelos para LEI0221, 9-13 alelos para LEI0217, e 9-10 alelos para LEI0234, nas populações com menor e maior número de alelos respectivamente. Nasiri et al. (2007) reportaram que o *locus* MCW0216 foi monomórfico e para o marcador ADL0278 descreveram 3 alelos em uma população de galinhas nativas iranianas. Em outra população de aves nativas iraniana, Nassiri et al. (2007) detectaram três alelos para o MCW0081, dois alelos para o ADL027, e apenas um alelo para o MCW0216. Nas caipiras de ovos azuis encontrou-se 19 alelos para os *loci* LEI0192 e LEI0217, 14 para LEI0221, 12 para LEI0234, e cinco para MCW0081, MCW0216 e ADL0278.

Um número máximo de 28 alelos foi detectado para o marcador LEI0212. Uma variação deste nível pode significar que este *locus* encontra-se em uma região de elevada taxa de mutação ou de seleção positiva a mutação. O marcador MCW0371, por exemplo, apresentou 17 alelos na amostra. Este microssatélite está mapeado no microcromossomo 16, numa posição muito próxima à região B-F/B-L (MHC da galinha) (Fulton et al., 2006) que possui seleção favorável à perpetuação de mutações. Alguns *loci*, no entanto, apresentaram baixo polimorfismo. O número mínimo de dois alelos foi encontrado para os marcadores LEI0254 e MCW0330, possivelmente estes *loci* encontram-se em regiões de baixa ocorrência de mutação ou de seleção negativa a mutação.

Também em relação ao número médio de alelos por população para todos os *loci* analisados nota-se o alto polimorfismo da amostra estudada. No presente trabalho observou-se uma média de 11,2 alelos, notoriamente superior à maioria dos trabalhos que tem relatado variabilidade de microssatélites em galinhas. Para

galinhas de raça ou linhagens comerciais (corte ou postura) o número médio de alelos por *locus* variou entre 1,3 e 8,1 nas análises de Croojimans et al. (1996), Dávila et al. (2009); Emara et al. (2002), Groen et al. (1994), Hillel et al. (2003), Kaiser et al. (2000), Liu et al. (2008), Vanhala et al. (1998) e Zhang et al. (2002). Para aves não comerciais tem se observados valores entre 3,4 a 9,3 alelos médios por *locus* (HILLEL et al., 2003; KAYA et al., 2008; NASIRI et al., 2007; NASSIRI et al., 2007; SHAHBAZI et al., 2007; ZHANG et al. 2002). O número de alelos por *loci* em aves não comerciais em geral são mais elevados do que em comerciais devido a forte pressão de seleção artificial que estas últimas sofrem, entretanto na população aqui analisada estes valores foram ainda maiores demonstrando a enorme diversidade genética das galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis.

A combinação de alelos dos 15 *loci* produziu 288 genótipos (somando-se cada um dos genótipos encontrados para cada *locus*), sendo 40 genótipos encontrados para o *locus* LEI0192 o qual apresentou o maior número (Quadro 2). O *locus* LEI0254 demonstrou menor número de genótipos, apenas três. Os genótipos que apresentaram maior frequência gênica para os respectivos *loci* estudados foram: LEI0248 genótipo 238/238 (17,44%), LEI0221 genótipo 185/205 (9,2%), LEI0214 genótipo 139/139(17,39%), LEI0192 genótipo 250/250 (12,05%), LEI0217 genótipo 178/242 (12,5%), LEI0254 genótipo 83/83 (73,56%), LEI0194 genótipo 157/157 (27,27%), LEI0212 genótipo 362/362 (22,08%), MCW0371 genótipo 199/199 (18,84%), ADL0278 genótipo 114/114 (34,88%), LEI0234 genótipo 284/288 (25%), MCW0183 genótipo 292/310 (36,49%), MCW0216 genótipo 138/138 (32,76%), MCW0330 genótipo 265/273 (44,29%) e MCW0081 genótipo 109/130 (27,71%).

A heterozigosidade esperada (HE), definida por Nei (1973) como a probabilidade que dois alelos escolhidos ao acaso de uma população sejam diferentes, e a heterozigosidade observada (HO), proporção de indivíduos heterozigotos observados nas amostras da população (Belkhir et al., 1999), podem ser consideradas medidas de variabilidade genética muito eficiente. A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *locus* marcador, este parâmetro depende do número de alelos e da frequência destes na população. Segundo Ott (1992) um marcador é considerado polimorficamente informativo quando apresenta heterozigosidade maior que 70%. Para Menezes (2005) a heterozigosidade média observada é considerada elevada quando apresenta valores superiores a 0,7 e reduzida com valores inferiores a 0,5,

já para heterozigiosidade média esperada, valores superiores a 0,5 indicam elevada diversidade genética dos marcadores.

As médias de heterozigiosidades esperada (HE) e observada (HO) foram respectivamente 0,76 e 0,49 na amostra do presente trabalho (Quadro 1). Para aves comerciais (raças ou linhagens) têm sido observados valores médios de HE entre 0,00 (para linhagens altamente endogâmicas) a 0,74 e HO entre 0,00 a 0,67 (DÁVILA et al., 2009; HILLEL et al., 2003; TADANO et al., 2007; VANHALA et al., 1998; ZHANG et al., 2002; ZHOU & LAMONT, 1999 e LIU et al., 2008). Para galinhas não comerciais os valores ficam em torno de 0,56 a 0,86 para HE e entre 0,38 a 0,63 para HO (HILLEL et al., 2003; KAYA et al., 2008; NASIRI et al., 2007; NASSIRI et al., 2007; SHAHBAZI et al., 2007; ZHANG et al., 2002). Os dados da presente amostra são compatíveis com os valores encontrados em aves não comerciais.

Os valores de HE encontrados por *loci* variaram de 0,35 a 0,89, e os valores de HO de 0,08 a 0,82. O maior valor de HE encontrado foi para o *locus* LEI0192, o maior valor de HO encontrado para o *locus* LEI0221, e os menores valores de HE e HO encontrados para o *locus* LEI0254. Somente este último *locus* apresentou HE menor que 0,5. A HO foi menor do que a HE em todos os *loci* estudados. As heterozigiosidades esperada e observada, os valores de P e do desvio padrão encontram-se descritos no Quadro 3.

Os marcadores LEI0221 e LEI0248 apresentaram elevado grau de heterozigiosidade observada, com valores superiores a 0,7. Apresentando valores intermediários entre 0,7 e 0,5 os marcadores LEI0192, LEI0217, ADL278, LEI0234, MCW0183, MCW0081, e MCW0330. No entanto os marcadores LEI0214, MCW0371, LEI0254, LEI0194, LEI0212, e MCW0216 apresentaram nível reduzido de heterozigiosidade observada, com valores inferiores a 0,5. Sessenta por cento dos marcadores apresentou HO superior a 0,5. Para heterozigiosidade esperada, a grande maioria dos *loci* (93,3%) apresentou valor superior a 0,5. Estes dados indicam uma elevada diversidade genética dos marcadores analisados.

Os quinze *loci* estudados apresentaram desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para a população em estudo. Segundo Menezes (2005) os desvios de EHW podem ser devidos a diversos fatores como: acasalamentos direcionados, subdivisões dentro das populações, antepassados comuns, seleção natural ou

artificial, migração ou fluxo de genes a partir de população externa, além da presença de alelos nulos não detectáveis experimentalmente.

Uma característica comum em aves caipiras é o tipo de sistema de criação a que estas são submetidas: criação extensiva onde pequenas populações são criadas livres em fundos de quintal. Geralmente não são utilizadas vacinações ou antibióticos na criação e os animais sobrevivem a qualquer desafio sanitário ou de condições ambientais adversas pela própria resistência. Estas populações pequenas, geralmente apresentam número reduzido de indivíduos com alto grau de parentesco e utilização de poucos reprodutores machos (que geralmente são selecionados pela beleza ou porte físico), o que predispõe muito a taxas altas de consangüinidade.

As galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis apresentam este sistema de criação comum das aves caipiras, logo são populações pequenas, endogâmicas, submetidas tanto a seleção natural como artificial o que pode justificar estar em desvio do EHW.

A ocorrência de desvios quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi verificada em diversos trabalhos (Granevitze et al., 2007; Dávila et al., 2009; Liu et al., 2008; Nassiri et al., 2007; Nasiri et al., 2007; Vij et al., 2006).

Diante de uma análise geral, os valores de número médio de alelos e heterozigosidades médias encontrados neste estudo sugerem que existe elevada variabilidade genética em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis. Esta elevada variabilidade genética faz com que seja de extrema importância à conservação destes animais como fonte de recursos genéticos. Estes recursos poderão, no futuro, serem utilizados em programas de melhoramento genético animal de galinhas.

Segundo Blackburn, (2006) devido a séculos de domesticação e cruzamentos direcionados, existe hoje grande número de raças de galinhas. Entretanto, muitas destas raças de galinhas locais estão sob ameaça de extinção, e genótipos valiosos assim como características genéticas estão sob risco de serem perdidos.

CONCLUSÃO

As galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis demonstraram elevada variabilidade genética para os *loci* analisados, o que as capacita como fonte de recursos

genéticos e, para tanto, devem ser conservadas. Os microssatélites utilizados nas análises foram significativamente polimórficos, demonstrando alta variação na amostra (excetuando os marcadores LEI0254 e MCW0330). Os microssatélites LEI0192, LEI0194; LEI0212; LEI0214, LEI0217, LEI0221, LEI0234, LEI0248, MCW0183 e MCW0371, apresentaram alto polimorfismo e, portanto, capacitam-se para serem utilizados em análises de variabilidade genética populacional, caracterização de raças e determinação de perfil individual, auxiliando em programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento animal.

REFERÊNCIAS

- Albino, L.F.T., Vargas Jr, J.G., Silva, J.H.V. 2001. Criação de Frango e Galinha Caipira – Avicultura Alternativa. Aprenda Fácil Editora, Viçosa, MG, Brasil. 124p.
- Barbosa, F.J.V. 2006. Eram caipiras, agora são naturalizadas. Sapiência. 2006. FAPEPI. nº. 9, Ano III. Teresina: 2006 (Informativo Científico). Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia9/artigos1.php>> Acesso em: 20 abril, 2009.
- Belkhir, K. 1999. Gnetix: Logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions. CNRS UPR 9060.
- Blackburn, H.D. 2006. The National Animal Germplasm Program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult. Sci.* v.85, n.2, p.210–215.
- Cheng, H.H., Levin, I., Vallegjo, R.L., Khatip, H., Dodgson, J.B., Crittenden, L.B., Hillel, J. 1995. Developing of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poult Sci*, v.74, n.11, p.1855–1874.
- Clementino, C.S. 2010. Caracterização genética de galinhas naturalizadas na região meio-norte do brasil, com uso de microssatélites. 2010. 93p. Dissertação. (Mestrado Ciência Animal). Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI.
- Crooijmans, R.P.M.A., Groen, A.B.F., Van Kampen, A.J.A., Van Der Beek, S., Van Der Poel, J.J., and Groenen, M.A.M. 1996. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. *Poult. Sci.* v.75, n.7, p.904–909.
- Dávila, S.G., Gil, M.G., Resino-Talaván, P., Campo, J.L. 2009. Evaluation of diversity between different Spanish chicken breeds, a tester line, and a White Leghorn

- population based on microsatellite markers. *Poultry Science*, v.88, n.12, p.2518–2525.
- Emara, M.G., Kim, H., Zhu, J., Lapierre, R.R., Lakshmanan, N., Lillehoj, H.S. 2002. Genetic diversity at the major histocompatibility complex (B) and microsatellite loci in three commercial broiler pure lines. *Poult Sci*, v.81, n.11, p.1609–1617.
- FAO. 2004. Guidelines for Development of National Management of Farm Animal Genetic Resources Plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers, Rome, Italy. 2004, 58 p.
- Fulton, J.E., Juul-Madsen, H.R., Ashwell, C.M., Mccarron, A.M., Arthur, J.A., O'sullivan, N.P., Taylor Jr, R.L. 2006. Molecular genotype identification of the *Gallus gallus* major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, v.58, n.5-6, p.407–421.
- Gomes, P.C., Albino, L.F. 1998. Criação de Frango e Galinha Caipira. Filmes CPT. Cód.: 050. Série Avicultura. Viçosa, MG.
- Granevitze, Z., Hillel, J., Chen, G.H., Cuc, N.T.K., Feldman, M., Eding, H., Weigend, S. 2007. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Animal Genetics*, v.38, n.6, p.576–583.
- Groen, A.F., Crooijmans, R.P.M.A., van Kampen, A.J.A., van der Beek, S., van der Poel, J. J., and Groenen, M.A.M. 1994. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines. In 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, University of Guelph, Canada, Vol. 21, pp. 94–97.
- Hillel, J., Groenen, M.A.M., Tixier-Boichard, M., Korol, A.B., David, L., Kirzhner, V.M., Burke, T., Barre-Dirie, A., Crooijmans, R.P.M.A., Elo, K., Feldman, M.W., Freidlin, P.J., Mäki-Tanila, A., Oortwijn, M., Thomson, P., Vignal, A., Wimmers, K., Weigend, S. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*, v.35, n.5, p.533–57.
- Kaiser, M.G., Yonash, N., Cahaner, A., Lamont, S.J. 2000. Microsatellite polymorphism between and within broiler populations. *Poult Sci*, v.79, n.5, p.626–628.
- Kaya, M., Yildiz, M.A. 2008. Genetic diversity among turkish native chickens, denizli and gerze, estimated by microsatellite markers. *Biochem Genet*, v.46, n.7-8, p.480–491.

- 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., Delgado-Cañedo, A., Bonatto, S.L., Salzano, F.M. 2004. B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken. *Animal Genetics*, v.35, n.4, p.278-384.
- Lima-Rosa, C.A.V., et al. 2005. LEI0258 microsatellite variability and its relationship to B-F haplotypes in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Genet Mol Biol*, v.28, n.3, p.386-389.
- Liu, G.Q., Jiang, X.P., Wang, J.Y., Wang, Z.Y., Liu, G.Y., Mao, Y.J. 2008. Analysis of genetic diversity of Yangzhou chicken by microsatellite markers. *International Journal of Poultry Science*, v.7, n.12, p.1237-1241.
- McConnell, S.K.J., Dawson, D.A., Wardle, A., Burke, T. 1999. The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. *Animal Genetics*, v.30, n.3, p.183-189.
- Menezes, M.P.C. 2005. Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras, Ibéricas e canárias. 2005. p.110. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia). Universidade Federal da Paraíba, Universidade Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, Areia-PB.
- Nasiri, B.M.T., F. Shokri, S.E. Khanian & S. Tavakoli. 2007. Study on polymorphism of Island native chicken population using microsatellites markers. *International Journal Poultry Science*, v.6, n.11, p.835-837.
- Nassiri, B.M.T., F. Shorkl, Z. Hamidi & S. Tavakoli. 2007. The investigation of genetic variation at microsatellite loci in Mazandaran native chickens. *International Journal Poultry Science*, v.6, n.9, p.675- 678.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.70, n.12, Part I, p.3321–3323.
- Ott, J. 1992. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*. v.51, n.2, p.238-290.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- Shahbazi, S., Mirhosseini, S,Z,M., Romanov, M.N. 2007. Genetic diversity in five iranian native chicken populations estimated by microsatellite markers. *Biochemical Genetics*, v.45, n.1/2, p. 63-75.
- Tadano R., Nishibori M., Nagasaka, N. & Tsudzuki, M. 2007. Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses. *Poultry Science*, v.86, n.11, p.2301–2308.
- Vanhala, T., Tuiskula-Haavisto, M., Elo, K., Vilkki, J., Ma" Ki-Tanila, A. 1998. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poultry Science*, v.77, n.6, p.783–790.
- Vij, P.K., Tania, M.S., & Vijn, R.S. 2006. Characterization of Punjab Brown chicken. *Animal Genetics Resources Information*, n.39, p.65-67.
- Zhang, X., Leung, F.C., Chan, D.K.O., Yang, G., Wu, C. 2002. Genetic diversity of Chinese native chicken breeds based on protein polymorphism, randomly amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism. *Poult Sci*, v.81, n.12, p.1463–1472.
- Zhou, H., Lamont, S.J. 1999. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. *Animal Genetics*, v.30, n.4, p.256-264.

Quadro 1 – Distribuição da frequência alélica em cada <i>locus</i> .			Quadro 1 – Distribuição da frequência alélica em cada <i>locus</i> . Continua		
<i>Locus</i>	Alelos	Frequência Alélica	<i>Locus</i>	Alelos	Frequência Alélica
LEI0248	210	0.00575		298	0.02299
	214	0.00575		306	0.01149
	222	0.00575		334	0.00575
	226	0.05747		338	0.00575
	230	0.01724		342	0.05747
	234	0.13793		346	0.10920
	238	0.40805		350	0.14943
	242	0.05172		378	0.01149
	246	0.06897		Total	19
	250	0.20690		MCW0371	
	254	0.00575		98	0.01149
	258	0.01724		101	0.02874
Total	12		103	0.00575	
LEI0221			188	0.00575	
	125	0.00575	198	0.01149	
	169	0.00575	199	0.20690	
	177	0.00575	200	0.01149	
	185	0.25862	201	0.13793	
	193	0.09770	202	0.19540	
	197	0.01149	203	0.10345	
	201	0.09770	204	0.01149	
	205	0.12644	205	0.00575	
	209	0.02299	209	0.02299	
	213	0.07471	218	0.01149	
	221	0.08046	220	0.00575	
	225	0.03448	223	0.01149	
	229	0.13218	229	0.00575	
233	0.04598	Total	17		
Total	14		LEI0217		
LEI0214			174	0.03448	
	127	0.04598	178	0.09770	
	135	0.01149	194	0.00575	
	139	0.26437	198	0.00575	
	143	0.05172	206	0.01149	
	147	0.00575	210	0.00575	
	151	0.00575	214	0.02299	
	155	0.02874	218	0.06897	
	159	0.06322	222	0.01149	
	163	0.00575	226	0.01149	
	167	0.01149	230	0.07471	
	267	0.27011	234	0.05172	
	275	0.00575	238	0.02299	
	279	0.02299	242	0.09195	
	Total	13		254	0.08046
LEI0192			286	0.01149	
	230	0.00575	290	0.01724	
	242	0.00575	294	0.01149	
	250	0.21839	330	0.00575	
	254	0.10920	Total	19	
	262	0.00575	LEI0254		
	266	0.06322	83	0.77586	
	270	0.02299	87	0.22414	
	282	0.01149	Total	2	
	286	0.05172	LEI0194		
	290	0.08046	125	0.15517	
	294	0.00575	129	0.00575	

Quadro 1 – Distribuição da frequência alélica em cada locus. Continua

<i>Locus</i>	Alelos	Frequência Alélica
	133	0.04598
	153	0.16667
	157	0.20690
	161	0.02299
	177	0.01149
	181	0.01724
Total	8	
LEI0212		
	310	0.00575
	330	0.01724
	338	0.01149
	350	0.01149
	354	0.06322
	358	0.12069
	362	0.29885
	366	0.01724
	370	0.02299
	374	0.01149
	378	0.03448
	382	0.01724
	386	0.01724
	390	0.00575
	398	0.04598
	406	0.02874
	414	0.01149
	418	0.00575
	422	0.00575
	434	0.01149
	438	0.00575
	442	0.00575
	446	0.04023
	450	0.03448
	454	0.00575
	458	0.00575
	486	0.00575
	490	0.01724
Total	28	
ADL278		
	102	0.07471
	104	0.13793
	106	0.01149
	110	0.15517
	114	0.60920
Total	5	
LEI0234		
	208	0.01149
	212	0.11494
	256	0.00575
	268	0.00575
	276	0.03448
	280	0.02874
	284	0.21839
	288	0.31609
	292	0.09195
	296	0.05747
	300	0.05172

Quadro 1 – Distribuição da frequência alélica em cada locus. Continua

<i>Locus</i>	Alelos	Frequência Alélica
	304	0.02874
Total	12	
MCW0183		
	292	0.39080
	296	0.12644
	300	0.00575
	304	0.04023
	310	0.22414
	318	0.05747
	396	0.00575
Total	7	
MCW0216		
	124	0.01149
	126	0.14943
	138	0.33908
	140	0.15517
	142	0.01149
Total	5	
MCW0330		
	265	0.3448
	273	0.2874
	285	0.1724
Total	3	
MCW0081		
	109	0.35632
	118	0.04023
	124	0.14943
	127	0.01724
	130	0.39080
Total	5	

Quadro 2 – Distribuição da frequência gênica por *locus*. Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base.

<i>Locus</i>	Genótipos	N	(%)
LEI0248			
	210/226	1	1,16
	214/222	1	1,16
	226/238	7	8,14
	226/258	2	2,33
	230/234	2	2,33
	230/246	1	1,16
	234/234	5	5,81
	234/238	6	6,98
	234/250	6	6,98
	238/238	15	17,44
	238/242	4	4,65
	238/246	8	9,30
	238/250	16	18,6
	242/242	1	1,16
	242/250	2	2,33
	242/258	1	1,16
	246/250	3	3,49
	250/250	4	4,65
	250/254	1	1,16
Total	19	86	100,00
LEI0221			
	125/221	1	1,15
	169/185	1	1,15
	177/197	1	1,15
	185/185	6	6,90
	185/193	4	4,50
	185/201	5	5,75
	185/205	8	9,20
	185/213	6	6,90
	185/221	1	1,15
	185/225	2	2,30
	185/229	2	2,30
	185/233	4	4,50
	193/201	3	3,45
	193/205	1	1,15
	193/209	2	2,30
	193/221	3	3,45
	193/225	1	1,15
	193/229	3	3,45
	197/201	1	1,15
	201/205	2	2,30
	201/229	5	5,75
	201/233	1	1,15
	205/205	4	4,50
	205/229	3	3,45
	209/213	1	1,15
	209/229	1	1,15
	213/221	3	3,45
	213/225	3	3,45
	221/221	3	3,45
	229/229	3	3,45
	229/233	3	3,45
Total	31	87	100,00

Quadro 2 – Distribuição da frequência gênica por *locus*. Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base.

Continua.			
<i>Locus</i>	Genótipos	N	(%)
LEI0214			
	127/139	8	11,59
	135/135	1	1,45
	139/139	12	17,39
	139/143	1	1,45
	139/155	1	1,45
	139/167	2	2,90
	139/267	9	13,04
	139/275	1	1,45
	143/143	4	5,80
	147/159	1	1,45
	151/163	1	1,45
	155/155	1	1,45
	155/267	2	2,90
	159/159	5	7,25
	267/267	18	26,09
	279/279	2	2,90
Total	16	69	100,00
LEI0192			
	286/350	1	1,20
	346/350	5	6,02
	254/350	1	1,20
	254/270	2	2,41
	266/286	1	1,20
	270/286	1	1,20
	242/350	1	1,20
	262/294	1	1,20
	250/350	2	2,41
	250/286	5	6,02
	282/298	1	1,20
	250/250	10	12,05
	230/250	1	1,20
	334/338	1	1,20
	254/346	3	3,61
	290/342	1	1,20
	290/350	1	1,20
	306/342	2	2,41
	298/350	1	1,20
	286/342	1	1,20
	298/342	1	1,20
	250/298	1	1,20
	250/290	4	4,82
	266/350	2	2,41
	250/282	1	1,20
	266/342	1	1,20
	250/266	2	2,41
	342/342	1	1,20
	250/342	1	1,20
	266/266	2	2,41
	254/290	5	6,02
	254/266	1	1,20
	346/346	3	3,61
	350/350	6	7,23
	250/342	1	1,20
	254/254	3	3,61

Quadro 2 – Distribuição da frequência gênica em cada *locus*. Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base. Continua

<i>Locus</i>	Genótipos	N	(%)
	270/346	1	1,20
	290/346	3	3,61
	254/378	1	1,20
	346/378	1	1,20
Total	40	83	100,00
MCW0371			
	98/101	1	1,45
	220/229	1	1,45
	98/103	1	1,45
	199/201	2	2,90
	199/199	13	18,84
	223/223	1	1,45
	199/205	1	1,45
	200/200	1	1,45
	209/209	2	2,90
	101/101	2	2,90
	202/203	4	5,80
	199/203	4	5,80
	203/203	5	7,25
	218/218	1	1,45
	201/201	10	14,49
	202/202	12	17,39
	203/204	1	1,45
	201/202	1	1,45
	198/201	1	1,45
	199/202	3	4,35
	198/202	1	1,45
	188/204	1	1,45
Total	22	69	100,00
LEI0217			
	198/2061	1	1,79
	238/238	1	1,79
	230/242	1	1,79
	178/218	1	1,79
	230/254	2	3,57
	222/242	1	1,789
	178/242	7	12,5
	234/254	3	5,36
	178/230	2	3,57
	242/254	3	5,36
	254/254	2	3,57
	218/238	1	1,79
	230/230	2	3,57
	234/242	1	1,79
	222/230	1	1,79
	218/242	2	3,57
	218/234	1	1,79
	206/210	1	1,79
	234/238	1	1,79
	218/218	1	1,79
	174/254	1	1,79
	174/218	3	5,36
	174/230	1	1,79
	174/242	1	1,79
	178/294	2	3,57

Quadro 2 – Distribuição da frequência gênica em cada *locus*. Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base. Continua

<i>Locus</i>	Genótipos	N	(%)
	226/226	1	1,79
	214/234	1	1,79
	178/286	1	1,79
	178/178	1	1,79
	286/330	1	1,79
	194/234	1	1,79
	214/290	3	5,36
	178/234	1	1,79
	218/230	2	3,57
	178/254	1	1,79
Total	35	56	100,00
LEI0254			
	83/83	64	73,56
	83/87	7	8,05
	87/87	16	18,39
Total	3	87	100,00
LEI0194			
	125/125	8	14,55
	125/129	1	1,82
	125/133	2	3,64
	125/153	5	9,09
	125/157	3	5,45
	133/133	2	3,64
	133/157	1	1,82
	153/153	11	20,00
	153/157	1	1,82
	157/157	15	27,27
	157/181	1	1,82
	161/161	2	3,64
	177/177	1	1,82
	181/181	1	1,82
	133/153	1	1,82
Total	15	55	100,00
LEI0212			
	330/362	1	1,30
	330/450	2	2,60
	338/438	1	1,30
	354/354	5	6,49
	354/382	1	1,30
	358/358	8	10,40
	358/362	2	2,60
	358/386	1	1,30
	358/442	1	1,30
	362/362	17	22,08
	362/370	1	1,30
	362/386	1	1,30
	362/398	5	6,49
	362/406	5	6,49
	362/414	1	1,30
	362/450	1	1,30
	362/458	1	1,30
	366/390	1	1,30
	370/370	1	1,30
	370/434	1	1,30
	378/454	1	1,30

Quadro 2 – Distribuição da frequência gênica em cada *locus*. Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base. Continua

<i>Locus</i>	Genótipos	N	(%)
	378/486	1	1,30
	382/398	1	1,30
	382/450	1	1,30
	386/418	1	1,30
	398/398	1	1,30
	446/490	1	1,30
	450/450	1	1,30
	490/490	1	1,30
	310/338	1	1,30
	350/350	1	1,30
	366/366	1	1,30
	374/434	1	1,30
	378/446	4	5,19
	358/414	1	1,30
	374/422	1	1,30
	446/446	1	1,30
Total	37	77	100,00
ADL278			
	102/114	13	15,12
	104/104	4	4,65
	104/110	2	2,32
	104/114	14	16,28
	106/110	1	1,16
	106/114	1	1,16
	110/110	3	3,49
	110/114	18	20,93
	114/114	30	34,88
Total	09	86	100,00
LEI0234			
	208/212	1	1,19
	208/292	1	1,19
	212/212	3	3,57
	212/284	3	3,57
	212/288	5	5,95
	212/292	2	2,38
	212/296	3	3,57
	256/292	1	1,19
	268/288	1	1,19
	276/276	3	3,57
	280/284	2	2,38
	280/292	2	2,38
	280/296	1	1,19
	284/284	5	5,95
	284/288	21	25,00
	284/300	2	2,38
	288/288	11	13,09
	288/296	2	2,38
	288/304	4	4,76
	292/292	4	4,76
	292/300	1	1,19
	292/304	1	1,19
	296/296	1	1,19
	296/300	2	2,38
	300/300	2	2,38
Total	25	84	100,00

Quadro 2 – Distribuição da frequência gênica em cada *locus*. Genótipos baseados no tamanho do alelo em pares de base. Continua

<i>Locus</i>	Genótipos	N	(%)
MCW183			
	292/292	15	20,27
	292/296	8	10,81
	292/310	27	36,49
	292/318	2	2,70
	296/310	3	4,05
	304/310	2	2,70
	304/318	2	2,70
	310/318	6	8,11
	396/310	1	1,35
	292/304	1	1,35
	296/296	5	6,75
	296/304	1	1,35
	300/304	1	1,35
Total	13	74	100,00
MCW216			
	124/138	2	3,45
	126/126	1	1,72
	126/138	16	27,59
	126/140	8	13,79
	138/138	19	32,75
	138/140	3	5,17
	140/140	7	12,07
	140/142	2	3,45
Total	8	58	100,00
MCW0330			
	265/265	8	11,43
	265/273	31	44,29
	265/285	13	18,57
	273/273	8	11,43
	273/285	3	4,29
	285/285	7	10,00
Total	6	70	100,00
MCW0081			
	109/109	13	15,66
	109/124	11	13,25
	109/127	2	2,41
	109/130	23	27,71
	118/130	7	8,43
	124/124	1	1,20
	124/130	13	15,66
	127/130	1	1,20
	130/130	12	14,46
Total	9	83	100,00

Quadro 3 – Polimorfismo de 15 *loci* de microssatélites em 87 amostras de DNA de galinhas caipiras de ovos azuis.

Locus	N_a¹	Ho²	He³	T⁴(pb)	Valor de P⁵	s.d.
LEI0248	12	0.70115	0.76447	210-258	0.00000	0.00000
LEI0221	14	0.81609	0.86944	125-233	0.00000	0.00000
LEI0214	13	0.29885	0.80845	127-279	0.00000	0.00000
LEI0192	19	0.66667	0.89104	230-378	0.00000	0.00000
MCW0371	17	0.26437	0.84905	98-229	0.00000	0.00000
LEI0217	19	0.55172	0.83702	174-330	0.00000	0.00000
LEI0254	02	0.08046	0.34981	83-87	0.00000	0.00000
LEI0194	08	0.17241	0.77138	125-181	0.00000	0.00000
LEI0212	28	0.45977	0.87403	310-490	0.00000	0.00000
ADL278	05	0.56322	0.58328	102-114	0.00894	0.00011
LEI0234	12	0.63218	0.82526	208-304	0.00000	0.00000
MCW0183	07	0.62069	0.75809	292-396	0.00000	0.00000
MCW0216	05	0.35632	0.73145	124-142	0.00000	0.00000
MCW0330	02	0.54023	0.73483	265-285	0.00000	0.00000
MCW0081	05	0.65517	0.69796	109-130	0.00000	0.00000
Média	11,20	0,49195	0,75637			
s.d.	7,38	0,21266	0,13819			

¹Número de alelos por *locus*.

²Frequência de heterozigosidade observada.

³Frequência de heterozigosidade esperada.

⁴Tamanho do alelo em pares de base.

⁵*Locus* em desequilíbrio (P<0,05).

5. CONCLUSÃO GERAL

A investigação da variabilidade genética em uma amostra de 87 galinhas caipiras de ovos azuis, com a utilização de quinze loci de microssatélites, possibilitou comprovar a suspeita de que galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis apresentam alta variabilidade genética. A eficiente amplificação dos loci analisados possibilitou a genotipagem de 168 alelos, no conjunto dos 15 loci, e a combinação destes gerou um total de 288 genótipos (somando-se cada um dos genótipos encontrados para cada locus). Foram encontrados 11,2 alelos por locus em média na população. Estes dados quando comparados a outros trabalhos da literatura demonstram o elevado polimorfismo presente nesta população. Valores de frequências alélicas e genotípicas observados para cada locus, em relação aos trabalhos descritos na literatura, também se apresentaram superiores. A média de heterozigosidade esperada ($HE=0,76$) representa a elevada probabilidade de encontrarmos dois alelos diferentes nesta população, quando escolhidos ao acaso, sendo HE o parâmetro mais largamente utilizado para mensurar a diversidade genética dentro de uma população. Assim, a partir deste elevado polimorfismo encontrado, podemos caracterizar estas aves como potenciais mantenedoras da diversidade genética de galinhas, muito reduzida na avicultura industrial com uso intensivo de aves de linhagens comerciais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, L.F.T., VARGAS JR, J.G., SILVA, J.H.V. **Criação de Frango e Galinha Caipira – Avicultura Alternativa**. Aprenda Fácil Editora, Viçosa, MG, Brasil, 2001. 124p.

BARBOSA, F.J.V. **Eram caipiras, agora são naturalizadas**. Sapiência. 2006. FAPEPI. nº. 9, Ano III. Teresina: 2006 (Informativo Científico). Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia9/artigos1.php>> Acesso em: 20 abril, 2009.

BORÉM, A., CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006. 374p.

BOSCHIERO, C.; CAMPOS, L.R.C.; AMBO, M., ROSÁRIO, M.F., NONES, K., LEDUR, M.C., COUTINHO, L.L. AND ASAMT, M. Associações entre marcadores microsatélites do cromossomo 13 e características de desempenho, carcaça e órgãos em galinhas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE AVICULTURA, 20. **Memórias...** Porto Alegre, RS, p.255-257. 2007.

CERRI, C. Cocoricó de valor. **Globo Rural**, v.85, p.47-55, 1992.

CHARLESWORTH, B., SNIEGOWSKI, P., STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v.371, n.6494, p.215-220, 1994.

CHENG, H.J., YUE, Y.S., FAN, X.Z., ZHANG, C.S., DU, L.X. Analysis of genetic diversity of Shandong indigenous chicken breeds using microsatellite marker. **Yi Chuan Xue Bao**, v.30, n.9, p.855-60, 2003.

CLEMENTINO, C.S. **Caracterização genética de galinhas naturalizadas na região meio-norte do Brasil, com uso de microsatélites**. 2010. 93p. **Dissertação. (Mestrado Ciência Animal)**. Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal do Piauí, Terezina-PI.

COUTINHO, L.L. Uso de marcadores moleculares na avicultura. In: FACTA (ed.). **Anais da Conferência Apinco'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional Sobre Sanidade Avícola**, p.95-101, 1999.

CRAWFORD, R.D. Origin and history of poultry species. In: Crawford RD (ed.). **Poultry Breeding and Genetics – Developments in Animal and Veterinary Science**, 22. Elsevier, Amsterdam, p.1-41, 1990.

DÁVILA, S.G., GIL, M.G., RESINO-TALAVÁN, P., CAMPO, J.L. Evaluation of diversity between different Spanish chicken breeds, a tester line, and a White Leghorn population based on microsatellite markers. **Poultry Science**, v.88, n.12, p.2518–2525, 2009.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature**, v.5, p.438-445, 2004.

ENGEL, S.T., LINN, R.A., TAYLOR, J.F., DAVIS, S.K. Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies. **J Mammalogy**, v.77, n.2, p.504-518, 1996.

FAO. **Guidelines for Development of National Management of Farm Animal Genetic Resources Plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers**, Rome, Italy. 2004, 58 p.

GAMA, L.T. Manutenção da variabilidade genética em programas de seleção. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS (RAÇAS NATIVAS PARA O SEMI-ÁRIDO), 2004, Recife. **Anais...** Recife: 2004. p.38-44.

GAMA, L.T. Programas de seleção e conservação dos Recursos genéticos animais: a experiência da Europa Mediterrânica. In: SIMPÓSIOS DA 43a REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2006. p.755-773.

GAO, Y.S., YANG, N., LI, H.F., WANG, K.H., TONG, H.B. Analysis of genetic diversity of preserved population of native chicken breeds by microsatellites and file foundation of markers. **Yi Chuan**, v.26, n.6, p.859-64, 2004.

GESSULLI, O.P. **Avicultura Alternativa – “Caipira”**. OPG Editores, Porto Feliz, SP, 1999. 218p.

GOMES, P.C., ALBINO, L.F. **Criação de Frango e Galinha Caipira**. Filmes CPT. Cód.: 050. Série Avicultura. Viçosa, MG, 1998.

KAYA, M., YILDIZ, M.A. Genetic Diversity Among Turkish Native Chickens, Denizli and Gerze, Estimated by Microsatellite Markers. **Biochem Genet**, v.46, n.7-8, p.480–491, 2008.

KENNEDY, G.Y., VEVERS, H.G. A survey of avian eggshell pigments. **Comp. Biochem. Physiol**, v.55B, n.1, p.117–123, 1976.

KENNEDY, G.Y., VEVERS, H.G. Eggshell pigments of the Araucano fowl. **Comp. Biochem. Physiol**, v.44B, n.1, p.11–35, 1973.

LEDUR, M.C.; NONES, K.; MOURA, A.S.A.M.T., RIBEIRO, J.B.; COUTINHO, L.L.O. Uso de marcadores moleculares na produção de aves. In: Bridi, A.M., Fonseca, N.A.N., Silva, C.A., Pinheiro, J. W. Zootec 2007 - **A zootecnia frente a novos desafios**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. p.457-482, 2007.

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., 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, n.3, p.386-389, 2005.

LIMA-ROSA, C.A.V., CANAL, C.W., STRECK, A.F., FREITAS, L.B., DELGADO-CAÑEDO, A., BONATTO, S.L., SALZANO, F.M. B-F DNA sequence variability in Brazilian (blue-egg Caipira) chicken. **Animal Genetics**, v.35, n.4, p.278-384, 2004.

MARIANTE, A.S., CAVALCANTE, N. **Animals of the Discovery: domestic breeds in the history of Brazil**, 2ª Ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 274 p.

McCONNELL, S.K.J., DAWSON, D.A., WARDLE, A., BURKE, T. The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. **Animal Genetics**, v.30, n.3, p.183-189, 1999.

MENEZES, M.P.C. **Variabilidade e relações genéticas entre raças caprinas nativas brasileiras. Ibéricas e canárias**. 2005. p.110. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia). Universidade Federal da Paraíba, Universidade Rural de Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, Areia-PB.

MESQUITA, M.B. Subsídios para a história da avicultura no Brasil. **Avicultura Industrial, Chácaras e Quintais**, v.61, p. 726-729, 1970.

MORENG, R.E., AVENS, J.S. **Ciência e Produção de Aves**. Livraria Roca, São Paulo, SP, 1990. 394p.

MULLIS, K.B. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, v. 262, n.4, p.36-42, 1990.

NISHIBORI, M., SHIMOGIRI, T., HAYASHI, T., YASUE, H. Molecular evidence for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius*. **Animal Genetics**, v.36, n.5, p.367-375, 2005.

PADUAN, R. 800 bilhões de dólares: De acordo com o Banco Mundial, essa é a estimativa de prejuízos que uma pandemia de gripe aviária pode causar à economia global. 2005. **Revista Exame**. Disponível em:

<http://portalexame.abril.com.br/revista/exame/edicoes/0855/internacional/m0078574.html>>. Acesso em 04 fev. 2010.

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004. 609p.

PICOLI, K.P. **Avaliação de sistemas de produção de frangos de corte no pasto**. Florianópolis: UFSC, 2004. 74f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. AZEVEDO, P.C.N., CABRAL, G.C., CORASSA, A. . Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.34, n.2, p.589-599, 2005.

RAMALHO, M.A.P., SANTOS, J.B., PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2008. 464p.

RAMOS, M.A. O caipira de sangue azul. **Globo Rural**, v.113, p.39-43, 1995.

REGITANO, L.C.A., COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. EMBRAPA - Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

RODRIGUES, F.P., QUEIROZ, S.A., DUARTE, J.M.B. Genetics relatedness among wild, domestic and Brazilian fighting roosters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.2, p.83-87, 2006.

ROMANOV, M.N., WEIGEND, S. Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and jungle fowl using microsatellite markers. **Poultry Science**, v.80, n.8, p.1057–1063, 2001.

SAGRILLO, E., Agricultura Familiar. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 74p. (Boletim técnico - Embrapa).

SAHAI, R., VIJH, R.K. **Domestic animal diversity - conservation & sustainable development**. Karnal: SI Publications, 2000, 355 p.

SARTÓRIO, S.D. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários utilizando o software R. 2008**. 131f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Estatística e Experimentação Agronômica, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SCHMIDT, G.S., LEDUR, M.C. Interação da genética quantitativa e molecular no processo de seleção de aves. In: FACTA (ed.). **Anais da Conferência APINCO'99 de Ciência e Tecnologia Avícolas - Simpósio Internacional sobre Sanidade Avícola**, p.133-144, 1999.

SCHWARTZ, S.W., RAUX, A., SCHACTER, B.A., STEPHENSON, B.D., SHOFFNER, R.N. Loss of hereditary uterine protoporphyria through chromosomal rearrangement in mutant Rhode Island Red hens. **Int. J. Biochem**, v.2, n.5-6, p.935–940, 1980.

TADANO, R., SEKINO, M., NISHIBORI, M., TSUDZUKI, M. Microsatellite Marker Analysis for the Genetic Relationships Among Japanese Long-Tailed Chicken Breeds. **Poultry Science**, v.86, n.3, p.460–469, 2007.

TU, Y.J., CHEN, K.W., SHEN, J.C., TANG, Q.P., ZHANG, S.J. Analysis of genetic diversity of Sichuan indigenous chicken breeds using microsatellite markers. **Yi Chuan**, v.27, n.5, p.724-728, 2005.

VANHALA, T., TUISKULA-HAAVISTO, M., ELO, K., VILKKI, J., MAKI-TANILA, A. Evaluation of Genetic Variability and Genetic Distances Between Eight Chicken Lines Using Microsatellite Markers. **Poultry Science**, v.77, n.6, p.783–790, 1998.

YUNIS, R., HELLER, E.D., HILLEL, J., CAHANER, A. Microsatellite markers associated with quantitative trait loci controlling antibody response to *Escherichia coli*

and *Salmonella enteritidis* in young broilers. **Animal Genetics**, v.33, n.6, p.407-414, 2002.

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.

6. ANEXO

Quadro 4– Características dos *loci* de microssatélites utilizados.

<i>Locus</i>	Nºalelos	Tamanho alelos	<i>Primer Forward</i> <i>Primer Reverse</i> (3' - 5')	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM) (µL)	PCR Product sizec	Localização no mapa	Referência
LEI0214			[f] TGCCTCGTCTTACTGAGTGA [r] GATCAAGCACTGTATTTTATTC	51	1 5	198	Cromossomo 1	McConnell et al., (1999)
LEI0214	13	127-279	[f] TGCCTCGTCTTACTGAGTGA [r] GATCAAGCACTGTATTTTATTC	48	1 5 1,25		X	Fonteque et al., (2010)
LEI0248			[f] TTTGAAAGTGACCATGATTCTG [r] AAGCAGTTTCCAAGCTAAGAAC	51	1	248	X	McConnell et al., (1999)
LEI0248	12	210-258	[f] TTTGAAAGTGACCATGATTCTG [r] AAGCAGTTTCCAAGCTAAGAAC	56	1 5 1,33		X	Fonteque et al., (2011)
LEI0221			[f] CCTTTATCCACTCTTCATGCAC [r] TGCATAAATTCATGGGTAAGC	58	1 0	203	Cromossomo 1 (C1)	McConnell et al., (1999)
LEI0221	14	125-233	[f] CCTTTATCCACTCTTCATGCAC [r] TGCATAAATTCATGGGTAAGC	54	1 5 0,5		X	Fonteque et al., (2011)
LEI0192			[f] TGCCAGAGCTTCAGTCTGT [r] GTCATTAAGTGTATGTTTATTGC	55	1 0	265	C21	McConnell et al., (1999)
LEI0192	19	230-378	[f] TGCCAGAGCTTCAGTCTGT [r] GTCATTAAGTGTATGTTTATTGC	54	1 5 0,5		X	Fonteque et al., (2011)
MCW0371			[f] CTGCTCCGAGCTGTAATCCTG [r] TTTTCATGGCATCCTAAGATG				X	
MCW0371	17	98-229	[f] CTGCTCCGAGCTGTAATCCTG [r] TTTTCATGGCATCCTAAGATG	56	1 5 0,75		X	Fonteque et al., (2011)
LEI0217			[f] GATGACTGAGAGAAATAACTTG [r] AAATTAAGTGTATGTTTATTGC	51	1 5	198	Cromossomo 1 (C1)	McConnell et al., (1999)

Quadro 4– Características dos *loci* de microssatélites utilizados. Continua.

<i>Locus</i>	Nºalelos	Tamanho alelos	<i>Primer Forward</i> <i>Primer Reverse</i> (3' - 5')	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM) (µL)	PCR Product sizec	Localização no mapa	Referência
LEI0217	19	174-330	[f] GATGACTGAGAGAAATAACTTG [r] AAATTACTGAGGCACAGGAG	51	1,5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
LEI0254			[f] AGACCACTGGCTCCAACCTC [r] GTCTGGAACCTCATCCTTCATC	55	1,5	91	X	McConnell et al., (1999)
LEI0254	2	83-87	[f] AGACCACTGGCTCCAACCTC [r] GTCTGGAACCTCATCCTTCATC	54	1,5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
LEI0194			[f] TCCTTGCCATGTACATATGA [r] ACTGCATGTTCTTTGATAGGC	52	1,5	163	X	McConnell et al., (1999)
LEI0194	8	125-181	[f] TCCTTGCCATGTACATATGA [r] ACTGCATGTTCTTTGATAGGC	48	1,5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
LEI0212			[f] TTTGCCAATCCCTATTGAGC [r] TTTTCATATTTGTGGCGTGC	51	2,5	244	X	McConnell et al., (1999)
LEI0212	27	310-490	[f] TTTGCCAATCCCTATTGAGC [r] TTTTCATATTTGTGGCGTGC	51	1,5 1,25		X	Foneteque et al., (2011)
ADL0278		114-126	[f] CCAGCAGTCTACCTTCCTAT [r] TGTCATCCAAGAACAGTGTG	60			Cromossomo 8	FAO (2004)
ADL0278	5	102-114	[f] CCAGCAGTCTACCTTCCTAT [r] TGTCATCCAAGAACAGTGTG	55	1,5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
LEI0234			[f] ATGCATCAGATTGGTATTCAA [r] CGTGGCTGTGAACAAATATG	50	1,5	289	Cromossomo2 (C2)	McConnell et al., (1999)
LEI0234	12	208-304	[f] ATGCATCAGATTGGTATTCAA [r] CGTGGCTGTGAACAAATATG		1,5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)

Quadro 4– Características dos *loci* de microssatélites utilizados. Continua.

<i>Locus</i>	Nºalelos	Tamanho alelos	<i>Primer Forward</i> <i>Primer Reverse</i> (3' - 5')	Ta (°C)	MgCl ₂ (mM) (µL)	PCR Product sizec	Localização no mapa	Referência
							X	
MCW0183		296-326	[f] ATCCCAGTGTCTGAGTATCCGA [r] TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	58			Cromossomo 7	FAO (2004)
MCW0183	7	292-396	[f] ATCCCAGTGTCTGAGTATCCGA [r] TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	58	1 5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
MCW0216		139-149	[f] GGGTTTTACAGGATGGGACG [r] AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	60			Cromossomo 13	FAO (2004)
MCW0216	6	124-142	[f] GGGTTTTACAGGATGGGACG [r] AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	57	1 5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
MCW0330		256-300	[f]TGGACCTCATCAGTCTGACAG [r] AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	60			Cromossomo 17	FAO (2004)
MCW0330	3	265-285	[f]TGGACCTCATCAGTCTGACAG [r] AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	55	1 5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)
MCW0081		112-135	[f] GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG [r] CCTGTATGTGGAATTA CTTCTC	60			Cromossomo 5	FAO(2004)
MCW0081	5	109-130	[f] GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG [r] CCTGTATGTGGAATTA CTTCTC	55	1 5 0,75		X	Foneteque et al., (2011)

X, Locus não informativo na família.