

MARI HELEN PAGANI POSSAMAI

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS 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, SANTA CATARINA

2011

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

Possamai, Mari Helen Pagani
Análise da variabilidade genética de linhagens de galinhas
caipiras brasileiras / Mari Helen Pagani Possamai – Lages,
2011.
63 p.

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

1. Linhagens caipiras. 2. Microsatélites. 3. mtDNA.
4. Variabilidade genética. I. Título.

CDD – 636.5

MARI HELEN PAGANI POSSAMAI

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS 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^a. Dr^a. Jaqueline Battilana
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

Prof^a. Dr^a. Melina Martha Baumgarten
Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - UERGS

Lages, SC (03/03/2011)

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo quero agradecer a Deus, que com sua bondade guiou-me pelo caminho do bem, dando-me saúde e força para caminhar, e que me levará até outras conquistas iluminada por sua luz.

Agradeço à minha família, meu pai Arcir e meus irmãos Fabricio e Fernando, pelo amor e apoio profissional imprescindível para meu contínuo caminho na educação e construção do saber. Em especial, a minha mãe, Maria Madalena, por todos os anos de dedicação e carinho. Amo demais.

Meus agradecimentos à Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação do curso de Mestrado em Ciência Animal pela infraestrutura e oportunidade para a realização deste trabalho. Em especial, ao laboratório de Análises Genéticas do Instituto de Melhoramento e Genética Molecular da UDESC.

A todos os professores, que com sua dedicação e empenho se propuseram a transmitir seus conhecimentos e que contribuíram para minha formação.

Obrigada ao meu orientador, Prof. Carlos André, pela oportunidade de ingressar no campo da educação continuada, pela confiança, paciência e orientação prestada para a realização deste trabalho.

Aos funcionários, bolsistas e estagiários do laboratório de Análises Genéticas, agradeço a amizade, o apoio e o companheirismo.

Aos meus amigos, que de perto ou de longe torceram por mim.

A todos, que direta ou indiretamente se envolveram na execução deste trabalho, minha gratidão.

“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Não se preocupe em entender, viver ultrapassa qualquer entendimento”.

Clarice Lispector

RESUMO

POSSAMAI, Mari Helen Pagani. **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.

As galinhas caipiras brasileiras são o resultado de cruzamentos aleatórios entre diversas raças de galinhas encontradas no Brasil. Caracterizam-se pela sua rusticidade, resistência a doenças e as condições adversas de clima e alimentação. Nos anos 80, uma mudança nos hábitos de consumo valorizou os produtos naturais, tornando as galinhas caipiras alternativas de grande valor comercial. Porém, sua baixa produtividade inviabilizou a competição desta com a galinha industrial. A saída foi o desenvolvimento das chamadas linhagens caipiras, galinhas que mesclam a rusticidade e resistência das aves caipiras brasileiras com a produtividade das aves industriais. No Brasil foram desenvolvidas algumas destas linhagens, como a Paraíso Pedrês (corte) e a Rubro Negra (postura). Este trabalho teve como objetivo investigar a variabilidade genética nuclear e não nuclear de linhagens de galinhas caipiras brasileiras através da análise de dez loci de microssatélites e da região controladora, alça-D, do DNA mitocondrial (mtDNA). Foram coletadas amostras de sangue de 92 aves das linhagens Paraíso Pedrês (42) e Rubro Negra (50). Foi utilizada a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação das amostras e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em um sequenciador automático ABI 3130 DNA Genetic Analyser. O número de alelos variou de 3 (LEI0254) a 32 (LEI0212) para a linhagem Paraíso Pedrês (PP), e 4 (LEI0254) a 31 (LEI0212) para a linhagem Rubro Negra (RN). A média de alelos por loco foi de 13,40 e 13,10 para a linhagem PP e RN, respectivamente. A heterozigosidade média esperada foi de 0,824 para PP e 0,604 para RN. Na análise do mtDNA, 100% das aves PP possuíam o haplótipo 4, de origem Européia. Na linhagem RN, o haplótipo 4 foi encontrado em 60% das amostras, o haplótipo 3c em 10% e o haplótipo 3d em 30%, os haplótipos 3c e 3d são de origem Asiática. Os resultados obtidos indicam que as linhagens de galinhas caipiras brasileiras analisadas, apresentam uma variabilidade genética superior às observadas em linhagens comerciais típicas de galinhas e semelhante à observada em aves não comerciais. Para a formação da linhagem RN foi utilizado na sua maioria aves de origem Européia e algumas de origem Asiática. E, para a composição da linhagem PP, foi utilizado somente aves de origem Européia, pelo menos no que se refere à linhagem materna.

Palavras-chaves: Linhagens caipiras. Microssatélites. mtDNA. Variabilidade genética.

ABSTRACT

POSSAMAI, Mari Helen Pagani. **Analysis of Genetic Variability of Brazilian Commercial Caipira Chickens Lines** 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.

The Brazilian caipira chickens are the result of random mating between different chicken breeds found in Brazil. They are characterized by their hardiness, disease resistance and the adverse conditions of climate and nutrition. In the 80, a change in consumption habits valued natural products, making these chickens an alternative of great commercial value. However, its low productivity of this prevented the competition with the chicken industry. The output was the development of so-called caipira lines, chickens that blend the hardiness and resistance of native birds with the productivity of Brazilian poultry industry. In Brazil some of these commercial caipira chicken lines were developed, such as Paraíso Pedrês (beef) and Rubro Negra (posture). This study aimed to investigate the genetic variability nuclear and nonnuclear of Brazilian commercial caipira chickens lines through the analysis of ten microsatellite loci and the control region, D-loop, mitochondrial DNA (mtDNA). It was collected blood samples from 92 birds of Paraíso Pedrês lines (42) and Rubro Negra (50). It was used the polymerase chain reaction technique (PCR) to amplify the samples and the amplified products were subjected to electrophoresis on an automated sequencer ABI 3130 DNA Genetic Analyzer. The number of alleles ranged from 3 (LEI0254) to 32 (LEI0212) for Paraíso Pedrês (PP) lines and 4 (LEI0254) to 31 (LEI0212) for Rubro Negra (RN) lines. The number of alleles per locus was 13,40 and 13,10 for PP and RN lines, respectively. Average expected heterozygosity was 0,824 for PP and 0,604 for RN. In the analysis of mtDNA, 100% of birds had PP haplotype 4, from Europe. In the RN line, haplotype 4 was found in 60% of the samples, the haplotype 3c in 10% and 30% in 3d haplotype, the haplotype 3c e 3d, from Asia. The results indicate that Brazilian lines of chickens examined, have a higher genetic variability observed in the typical commercial lines of chickens and the same was found for non-commercial poultry. For the formation of RN lines was used mostly birds of European origin and some of Asian origin. And for the composition of the PP lines were used only birds of European origin, at least as regards the maternal line.

Key words: Brazilian commercial caipira chickens lines. Microsatellites. mtDNA. Genetic variability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Aves da linhagem caipira Paraíso Pedrês.....	23
Figura 2: Aves da linhagem caipira Rubro Negra.....	23
Figura 3: DNA mitocondrial de vertebrados.....	27

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA.....	09
1.1 DESENVOLVIMENTO DA AVICULTURA NO MUNDO.....	09
1.2 DESENVOLVIMENTO DA AVICULTURA NO BRASIL.....	10
1.3 DESENVOLVIMENTO DA AVICULTURA EM SANTA CATARINA.....	11
1.4 PRODUÇÃO E MERCADO AVÍCOLA.....	12
1.4.1 Indicadores mundiais e nacionais da avicultura.....	13
1.5 ORIGEM DAS GALINHAS.....	15
1.5.1 Galinhas caipiras.....	16
1.5.2 Produção de galinha caipira.....	17
1.5.3 Designação de sistemas de criação de galinhas e frangos.....	19
1.5.4 Raças de galinhas.....	19
1.5.5 Linhagens de galinha caipira.....	21
1.5.5.1 Fazenda Aves do Paraíso.....	22
1.5.5.2 Linhagem caipira brasileira Paraíso Pedrês.....	22
1.5.5.3 Linhagem caipira brasileira Rubro Negra.....	22
1.6 CONCEITO DE GENÉTICA APLICADA.....	23
1.6.1 Marcadores moleculares.....	23
1.6.2 Microssatélites.....	24
1.6.3 DNA mitocondrial.....	26
2 CAPÍTULO II: OBJETIVOS.....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	29
3 CAPÍTULO III: ARTIGO - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS (ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY OF BRAZILIAN COMMERCIAL CAIPIRA CHICKENS LINES).....	30
3.1 RESUMO.....	30
3.2 ABSTRACT.....	30
3.3 INTRODUÇÃO.....	31
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.5 RESULTADOS.....	34
3.6 DISCUSSÃO.....	36
3.7 CONCLUSÃO.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE.....	51

1 CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 DESENVOLVIMENTO DA AVICULTURA NO MUNDO

A indústria avícola começou a tomar forma em meados de 1930, com um estilo de desenvolvimento independente. No seu início, a avicultura promoveu a agregação de pequenos produtores para constituir unidades comerciais integradas de galinhas. O investimento financeiro relativamente baixo para iniciar a integração e a flexibilidade na utilização das instalações foram os principais fatores que proporcionaram o desenvolvimento da avicultura em várias regiões do mundo como uma economia rural (MORENG e AVENS, 1990).

Entretanto, de acordo com o Banco Nacional do Desenvolvimento – BNDES (1995), segundo o Relato Setorial da Avicultura, foi somente durante a Segunda Guerra Mundial (1939-1945) que a avicultura no mundo recebeu o incentivo necessário para sua definitiva consolidação. Até então, a avicultura era uma atividade artesanal e de pouca importância. Com o confronto mundial houve a necessidade de destinar oferta de carnes vermelhas para os soldados em combate, sendo preciso aumentar a produção de carnes alternativas, de preferência pequenos animais, que estivessem prontas para o consumo, num curto espaço de tempo. Desta maneira, os Estados Unidos da América começaram a desenvolver pesquisas para obter novas linhagens de frangos e novas fórmulas de rações e alimentos que atendessem aos requerimentos nutricionais das aves e medicamentos específicos para a avicultura. O mesmo ocorreu, no pós-guerra, nos países da Europa.

Livre das medidas de racionamento e outras restrições da Segunda Guerra Mundial, a produção de carne e ovos aumentou rapidamente. Os avanços tecnológicos que foram obtidos a partir dos resultados das pesquisas científicas, deram impulso para uma expansão industrial rápida. Estas pesquisas aplicadas na tecnologia e no manejo de produção resultaram na produção de carne para quase toda a população, independentemente do rendimento econômico da cada pessoa (MORENG e AVENS, 1990).

Ainda segundo o BNDES (1995), a substituição das carnes vermelhas pelas brancas, principalmente o frango, nos países desenvolvidos, decorreu de uma forte queda de seu preço relativo, resultado da eficiência do seu sistema produtivo. Mais recentemente, as carnes brancas tem sido valorizadas em função da busca de uma dieta saudável e mais equilibrada, com base em valores atrelados a um novo enfoque sobre saúde.

A avicultura é uma exploração zootécnica capaz de colaborar na minimização dos graves problemas de alimentação da crescente população mundial. Desta maneira, as carnes de aves tem evoluído de forma expressiva. O encurtamento do ciclo de produção, a maior eficiência produtiva e a conseqüente redução do custo da carne de aves, o ativismo de consciência alimentar privilegiando as carnes brancas, a diversidade de apresentações e o crescente uso dessas carnes em industrialização explicam essa evolução e permitem prognósticos otimistas em relação a essa proteína animal, identificada como a carne do futuro (FAO apud BNDES, 1995, p. 3).

1.2 DESENVOLVIMENTO DA AVICULTURA NO BRASIL

Ao longo da história no Brasil praticou-se uma avicultura tradicional e familiar, conhecida como produção de frango “caipira” ou “colonial”. Nas pequenas propriedades produzia-se carne e ovos para o próprio consumo, vendendo-se os excedentes. Por costume, comprava-se a galinha proveniente do interior ainda viva. O costume de abater as aves e vende-las prontas para o consumo surgiu nos EUA, depois da Segunda Guerra Mundial; no Brasil, este hábito tornou-se comum somente a partir de 1970 (LANA, 2000).

O desenvolvimento da avicultura no Brasil pode ser dividido em períodos de exploração econômica. Silva e Nakano apud Hellmeister Filho (2002, p. 4), apontam que entre os anos de 1900 a 1930 a avicultura passou por um período chamado "colonial", onde as aves eram criadas totalmente soltas, sem critérios de produção. Entre 1930 e 1940, surgiu o período de "romantismo", onde a beleza das aves passou a ser valorizada, de acordo com as variadas cores das penas, tamanho da ave e formação de cristas e barbelas. Criadores de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais buscavam aperfeiçoar as raças e criaram linhagens de penas bonitas destinadas aos concursos promovidos em todo país. Estes avicultores buscavam acompanhar as inovações desta área introduzidas especialmente, dos EUA e da Inglaterra. Malavazzi (1978) afirma que a partir de então, começaram os primeiros acasalamentos e o homem passou a criar aves mais como hobby do que como meio de obter lucro.

Em 1940, mas estendendo-se até os anos de 1960, ocorreu uma fase de escassez alimentar, devido à já referida Segunda Guerra Mundial. Isso ocasionou mudanças significativas na sociedade, e os criadores de aves iniciaram o pensamento de auferir lucros aos seus produtos, tanto em relação à produção de ovos, como à de carne, dando início à fase de "aptidão mista", onde as aves passaram a ser criadas no sistema de parques com acesso livre a áreas de pasto e também dentro de galpões (HELLMEISTER FILHO, 2002). Nesta

fase surgiram os primeiros abatedouros avícolas no Sudeste do Brasil, setor formado por pequenas empresas familiares (LANA, 2000).

Com o fim da guerra, o Brasil dá início às importações de linhagens híbridas americanas de frangos, mais resistentes e produtivas. Com elas, padrões de manejo e alimentação foram se alterando gradativamente (BNDES, 1995). O país entra num processo de incorporação de tecnologias modernas nas áreas de nutrição, manejo, sanidade e genética. Dando início a avicultura comercial brasileira, na qual se começou a produzir aves em escala de comércio, com material genético de alta produtividade, resultando na comercialização de um produto de baixo custo para a população (ALBINO e MOREIRA, 2006).

Com os investimentos nacionais, o setor se estruturou no desenvolvimento de vacinas contra doenças, na introdução de novas tecnologias, no uso de instalações mais apropriadas e de uma alimentação balanceada. Formaram-se associações avícolas e cooperativas, assim como parcerias entre produtor e agroindústria (MALAVAZZI, 1978).

A fase que segue de 1960 a 1970, começa a moldar o que seria os princípios da criação industrial, nessa época iniciou o período de "especialização das raças", surgindo aí o sistema totalmente confinado, utilizado até os dias atuais, com um forte incremento tecnológico. Entre 1970 e 1975 deu-se origem ao período "industrial", onde as linhagens comerciais, no sistema confinado, passaram a dominar o mercado com excelentes resultados de produção. No período de 1975 a 1988 surgiu o período de "exportação" em que o frango inteiro foi o principal produto e, a partir de 1988, com as mudanças das exigências no mercado consumidor nacional e internacional, deu-se início ao período de "processamento", onde os mais variados tipos de produtos produzidos a partir da carne de frango e ovos tomaram conta do mercado (HELLMEISTER FILHO, 2002).

O alto nível tecnológico alcançado pela avicultura nacional coloca a atividade em posição privilegiada em relação a outras atividades pecuárias desenvolvidas no Brasil, com nível de produtividade internacional, comparada a dos países mais tecnificados do mundo (BNDES, 1995).

1.3 DESENVOLVIMENTO DA AVICULTURA EM SANTA CATARINA

O desenvolvimento da avicultura em Santa Catarina ocorreu no final de 1950, na região Sudeste do país. Até o início de 1960, predominavam as empresas estabelecidas nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte, as quais se dedicavam somente a uma

das etapas do processo de produção, ou seja, havia as especializadas na produção de matrizes, outras na produção de ração, no abate ou na comercialização dos frangos (LANA, 2000).

Segundo este mesmo autor esse modelo não foi seguido na região Sul do país, onde ocorreu uma experiência diferente. Empresas de outros setores resolveram diversificar as suas atividades com a avicultura e implantaram uma atividade industrial que controlava as principais etapas de produção. Com o passar do tempo foram sendo fundadas diversas empresas deste tipo nesta região, as quais obtiveram grande sucesso e com isso mudaram a localização geográfica do centro da produção avícola nacional, saindo do Sudeste e indo para o Sul do país.

Nos estados do Sul, principalmente no estado de Santa Catarina, hoje se encontram as empresas tradicionais líderes da produção de frango brasileiro. Um dos traços distintivos destas empresas líderes é a diversificação, atuando tanto no mercado de aves quanto no de suínos e/ou bovinos (BNDES, 1995; LANA, 2000).

Tem sido um mercado liderado por grandes e poucas empresas, mas onde, ao mesmo tempo, coexistem pequenos e médios produtores (BNDES, 1995). A implantação da avicultura mostrou-se e ainda contempla uma boa fonte de renda para as propriedades rurais, tendo em vista o seu potencial produtivo e as perspectivas futuras, especialmente as exportações (HEINZEN, 2006).

1.4 PRODUÇÃO E MERCADO AVÍCOLA

O valor econômico atual da indústria avícola no Brasil é bastante significativo, especialmente ao considerar sua movimentação em uma série de atividades industriais correlatas, bem como, de atividades de intermediação na comercialização, beneficiamento e prestação de serviços de seus produtos. O consumo de carne e ovos cresce ano a ano, constituindo a avicultura, uma atividade econômica de grande destaque (ENGLERT, 1980).

Desde o início da produção e desenvolvimento do mercado de frangos no Brasil, a cadeia produtiva modernizou-se, devido à necessidade de redução de custos e aumento de produtividade, tentando com isso não perder competitividade em nível mundial (GIROTTO e ÁVILA, 2003). Como consequência, tem sido uma das mais organizadas do mundo, destacando-se das demais criações pelos resultados alcançados não só em produtividade e volume de abate, como também no desempenho econômico, onde tem contribuído de forma significativa para a economia do país.

A expansão e a consolidação do complexo avícola podem ser explicadas, principalmente, pela difusão da avançada tecnologia empregada nas diversas áreas que envolvem o setor. Com a elevação dos padrões técnicos empregados, o uso de linhagens cada vez mais produtivas e insumos com maior qualidade possibilitaram a diminuição dos custos de produção, transformando a avicultura numa atividade industrial bastante desenvolvida (BNDES, 1995).

Conforme Lana (2000), o crescimento populacional, o aumento da demanda de alimentos e a urbanização foram fatores significativos, junto com as alterações tecnológicas e organizacionais ocorridas em todo o setor avícola. O autor destaca que o clima no Brasil é favorável a criação de frangos, permitindo a criação durante todo o ano, e a alta produção interna de grãos, para a elaboração de rações, servem de alimento para o plantel. Outro fator importante que levou ao aumento do consumo foi o preço, tanto da carne de frango como do ovo, considerados fontes de proteína animal mais baratos e, portanto de mais fácil acesso às classes sociais com menor poder aquisitivo (HEINZEN, 2006).

Atualmente, com a alteração ocorrida nos padrões alimentares, gerando hábitos de consumo que tentam diminuir as carnes vermelhas, dando preferência às carnes brancas com baixo teor de gordura, aponta uma clara tendência para o frango como a saída para a produção de proteína animal, num curto espaço de tempo e a baixo custo (BNDES, 1995).

O BNDES (1995) destaca ainda que embora o consumo de carne de frango seja um hábito consolidado no Brasil, certamente não se trata de um mercado saturado. Estima-se que um terço da população brasileira esteja fora do mercado de carnes. Isto significa uma parcela substancial de consumidores a serem incorporados ao mercado de frangos, decorrente de uma retomada de crescimento econômico ou de uma melhora na distribuição da renda doméstica.

1.4.1 Indicadores mundiais e nacionais da avicultura

Dados da União Brasileira de Avicultura, UBABEF (2009/2010) relatam que no Brasil, a avicultura emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Os indicadores mundiais e nacionais da avicultura segundo estes dados demonstram que os maiores produtores de carne de frango são os EUA, a China e o Brasil, com uma produção de 15.980, 12.100 e 10.980 milhões de toneladas, respectivamente no ano de 2009. Correspondendo a uma proporção de 22%, 17% e 15% da produção mundial de carne de frango.

No Brasil, desse total, cerca de 67% permanecem no mercado interno, o que comprova a força dessa indústria para o país, e, 33% correspondem às exportações, sendo os principais consumidores da carne de frango brasileira o Oriente Médio, a Ásia e a União Européia. O consumo per capita de carne de aves no Brasil está em aproximadamente 40 Kg por habitante/ano, e o consumo de ovos de 120 unidades/habitante/ano. Os Estados Unidos também se encontram na liderança como maior consumidor mundial de carne de frango. A China foi o segundo maior mercado consumidor, seguido da União Européia e do Brasil em 2009/2010.

Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2009 com a marca de 3,6 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países. Com esse desempenho, a carne de frango brasileira aumentou ainda mais sua presença na mesa dos consumidores no Brasil e no mundo. Os Estados Unidos e a União Européia ocupam o 2º e 3º lugar respectivamente.

Entre todos os tipos de carne produzidas no país a carne de frango ocupa o primeiro lugar no ranking das exportações com 64,32%, seguido da carne bovina com 22,04% e da carne suína com 10,75%.

Numa análise nacional, a região Sul é considerada a maior produtora do país e respondeu sozinha por 58,74% da produção nacional de frango. No 2º e 3º lugar temos o Sudeste com 23,1% e Centro-Oeste com 13,56%, respectivamente.

Quanto à exportação de carne de frango Santa Catarina se encontra na 1º posição do ranking representando 27,1% da exportação nacional. Logo atrás, encontra-se o estado do Paraná com 26,3%, e o estado do Rio Grande do Sul com 21,2%. Podemos concluir que a região Sul é responsável pelo maior volume exportado, representando 74,6% das exportações.

A expansão da avicultura no Brasil coloca-o em posição de destaque no comércio mundial segundo as Projeções do Agronegócio Brasileiro 2009/2010 à 2019/2020. Os dados previstos pela Assessoria de Gestão Estratégica (AGE) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2010), apontam que o país deverá manter a liderança de principal exportador de carne de frango, e irá representar 70% do comércio mundial em 2019/2020. As projeções do consumo mostram preferência crescente dos consumidores brasileiros pela carne de frango, cujo crescimento projetado é de 3,23% ao ano. Isso significa um consumo interno de 10,9 milhões de toneladas daqui a aproximadamente 10 anos.

1.5 ORIGEM DAS GALINHAS

As aves tiveram sua origem cerca de 150 milhões de anos atrás, a partir do *Archaeopteryx*, a “ave” mais primitiva conhecida pelo homem. Já a galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) surgiu a partir do processo de domesticação do *Gallus bankiva*, mais comumente conhecido como galinha Vermelha do Mato (Red Jungle Fowl), que é considerado ser a galinha ancestral das aves comerciais de hoje. Esta ave ainda é encontrada nas florestas do Sudoeste Asiático e vive a maior parte do tempo no chão e subindo em árvores (CRAWFORD, 1990; LANA, 2000; MORENG e AVENS, 1990).

Segundo Darwin, o *Gallus gallus gallus*, denominação atual do *Gallus bankiva*, é o único ancestral do *Gallus gallus domesticus*. Entretanto, diversos autores contrariam esta origem ancestral única da galinha moderna e advogam a idéia de que pelo menos quatro espécies de galinhas silvestres contribuíram para a formação das galinhas domésticas conhecidas hoje: *Gallus gallus gallus* (Índia); *Gallus lafayettii* (Ceilão); *Gallus sonnerattii* (norte da Índia) e *Gallus varius* (Java); todas pertencentes ao gênero *Gallus* (ENGLERT, 1980; LANA, 2000).

Lana (2000) afirma que não há notícia exata da época em que o homem conseguiu trazer a galinha selvagem das florestas para seu quintal. Aparentemente, a domesticação se fez gradativamente, pela aproximação da galinha, acostumada a viver na periferia das florestas, às habitações humanas.

Aproximadamente a 3.200 a.C. foram efetuadas na Índia as primeiras descrições sobre a domesticação das galinhas, com duas finalidades principais: adorno e esporte (briga ou rinha de galos); as que não mais serviam para estes fins eram então abatidas para o consumo. Em seguida, a galinha passou para a China, por volta de 1.400 a.C., e a outros países orientais. Depois passou da Pérsia para a Grécia, de onde se disseminou pela Europa e África (LANA, 2000; MORENG e AVENS, 1990).

Lana (2000) descreve ainda que no século XVI as brigas de galos eram muito difundidas na Europa e os criadores muito exigentes em relação às características de força e agressão das aves. Por volta do século XIX às brigas foram proibidas e, como consequência surgiram as exposições com o objetivo de eleger as aves mais belas em relação à plumagem, tamanho corporal, formato de crista e barbelas. Pode-se dizer, que a partir de então, nascia o interesse pela exploração das aves e o início dos primeiros passos rumo ao desenvolvimento da produção avícola.

Após ampla revisão histórica sobre as origens da galinha no Brasil, Gessulli (1999) relata que existem fortes indícios, apresentados pelo historiador Martin Bueno de Mesquita, que a galinha foi introduzida muitos anos antes do descobrimento, através dos corsários franceses, embora ainda não exista confirmação desta hipótese.

Concretamente sabe-se que Pedro Álvares Cabral ao desembarcar no Brasil, por volta de 1.500, trouxe os primeiros exemplares de aves de raças puras (a carta enviada ao rei de Portugal, Dom Manuel, lavrada por Pero Vaz de Caminha, escrivão de Pedro Álvares Cabral, anunciando o descobrimento do Brasil, registra a presença de galinhas nas caravelas). As aves trazidas pelos portugueses acompanharam tanto os colonizadores que aqui se estabeleciam como, também, rapidamente foram assimiladas pelos nativos (ALBINO et al., 2005; ALBINO e MOREIRA, 2006; GESSULLI, 1999).

Os primeiros exemplares de aves provinham de 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, “galinha caipira”, denominação de origem Tupi Guarani (kai’pira, “habitante do campo”), que também são conhecidas como galinhas crioulas, da colônia, de terreiro ou de capoeira (ALBINO et al., 2001).

1.5.1 Galinhas caipiras

As clássicas galinhas caipiras caracterizam-se pela sua alta variabilidade genética, grande rusticidade, por sua maior resistência a doenças e as condições adversas de clima, temperatura e alimentação, dispensam cuidados especiais e por isso sua criação não demanda muito investimento (ALBINO et al., 2001). Além disto, apresentam crescimento mais lento, menores teores de gordura na carcaça e coloração mais avermelhada da carne e dos ovos (ALBINO e MOREIRA, 2006).

Até o século passado, mais precisamente após o término do “divisor de águas” do setor avícola, a Segunda Guerra Mundial, a avicultura brasileira foi basicamente voltada para a criação das galinhas caipiras. Uma atividade caracterizada como fundo de quintal, com o objetivo de subsistência familiar e onde abastecia pequenas propriedades rurais, vilas e povoados com carne e ovos, proporcionando fontes alternativas de proteínas na alimentação familiar e de renda no orçamento doméstico (ALBINO e MOREIRA, 2006).

Tradicionalmente, as criações domésticas de galinha caipira, praticadas nas unidades agrícolas familiares, se caracterizam pela sua forma de exploração extensiva, na qual inexistem instalações, bem como, a adoção de práticas de manejo que contemplem eficientemente os aspectos reprodutivos, nutricionais e sanitários. Tal fato resulta em índices de fertilidade, natalidade e produtividade reduzidos (SAGRILO et al., 2003).

Hoje a criação de galinha colonial que era restrita ao fundo de quintal cresceu, e vem ganhando adeptos fiéis, dispostos a pagar mais por essa ave. O crescente consumo de ovos e carne de frango caipira além de resgatar costumes e tradições da culinária colonial, representa uma diversificação das atividades da agricultura familiar (ALBINO e MOREIRA, 2006). Além disso, a sua comercialização pode ser efetuada de modo direto (produtor-consumidor), ou com a existência de, no máximo, um intermediário, tornando compensadores e bastante atrativos os preços dos produtos para o produtor (SAGRILO et al., 2003).

O produto caipira é aquele proveniente de uma criação cuja alimentação é suprida basicamente por alimentos naturais, como pasto, capim picado, insetos, minhoca, etc. Esta criação é uma forma alternativa de produzir carne e ovos com sabor diferenciado (ALBINO e MOREIRA, 2006; SILVA e NAKANO, 1998). Em relação ao preço da galinha caipira viva, esta pode atingir até cinco vezes o preço pago pelo frango de corte vivo, e os ovos coloniais valem de duas a três vezes mais do que os ovos brancos (ALBINO e MOREIRA, 2006).

1.5.2 Produção de galinha caipira

A criação de aves em sistemas alternativos tem sido desenvolvida por alguns produtores que buscam eficiência e qualidade de produção em um sistema diferenciado. Os objetivos destes criadores são diminuir os custos de produção e utilizar um sistema de criação mais natural para poder agregar valor ao produto (GESSULLI, 1999; ZANUSSO e DIONELLO, 2003).

Assim, a criação alternativa de frangos, também chamada de sistema de criação caipira, tem evoluído nos últimos anos, tornando-se uma atividade economicamente viável para pequenos e médios produtores que podem explorar este nicho de mercado (TAKAHASHI, 2006).

A mudança nos hábitos de consumo ocorrida no início dos anos 80 valorizou os produtos naturais, tornando as galinhas caipiras alternativas de grande valor comercial, pois, como são aves criadas soltas e de maneira mais natural, sem depender de antimicrobianos ou

antiestressantes, são consideradas mais saudáveis (CERRI, 1992; GESSULLI, 1999; RAMOS, 1995).

O surgimento dessa nova tendência com a preocupação e a exigência dos consumidores com a qualidade dos produtos ingeridos, não só do ponto de vista nutricional, como também de segurança alimentar (alimentação isenta de farinhas e gorduras animais, antibióticos, promotores de crescimento, etc) tem promovido a preferência por carne e por ovos de aves criadas em sistemas alternativos (ALBINO et al., 2005; ZANUSSO e DIONELLO, 2003). Esta tendência também está incentivando cada vez mais o consumo de produtos artesanais, com rastreabilidade em todas as fases do processo produtivo (ZANUSSO e DIONELLO, 2003).

A sociedade está interessada em sistemas de produção que melhorem o bem-estar na criação de animais. As condições ambientais podem influenciar a produção, o comportamento e a condição fisiológica dos animais afetando a qualidade do produto (SILVA et al., 2003).

Segundo Albino e Moreira (2006) os sistemas semi-intensivo (na qual a ave passa parte do tempo em galpões e parte livre em piquetes) e extensivo (somente em piquetes ou soltas em propriedades rurais) de produção são os que oferecem as melhores condições para se criar galinhas dentro do conceito caipira. Permitindo que as aves tenham livre acesso às áreas de pastejo, oferecendo condições da prática de exercícios, fator que ressalta a textura da carne, uma das características diferenciais quando comparada com as aves criadas confinadas. Essas diferenças ocorrem principalmente devido à ingestão pela ave de pasto, verduras, insetos, larvas, minhocas, etc., que são abundantes no sistema extensivo de criação. Esses alimentos irão contribuir para melhorar a pigmentação da gema e da pele das aves. A criação solta também expõe as aves à luz solar, o que auxilia o controle das doenças infecto-contagiosas.

O termo alternativo ou agroecológico podem, inicialmente, remeter à imagem de aves criadas com pouca tecnologia, porém, este tipo de atividade visa atender a uma demanda de mercado, mas está longe de seus objetivos de suprimir o modelo de produção industrial estabelecido no Brasil (ZANUSSO e DIONELLO, 2003).

Salienta-se que o frango caipira não compete com o frango industrial em escala de produção e custo, mas sim em qualidade da carne, principalmente sabor, atendendo a consumidores que podem pagar mais pelo produto com essas características, e aqueles preocupados com o bem estar e manejo na criação de aves (GESSULLI, 1999; ZANUSSO e DIONELLO, 2003).

1.5.3 Designação de sistemas de criação de galinhas e frangos

Braga e Roque apud Figueiredo et al. (2008, p. 6) classificam os sistemas de produção avícola da seguinte maneira: Avicultura Industrial, Avicultura Nativa e Avicultura Caipira ou Colonial. A Avicultura Industrial é a mais conhecida e altamente tecnificada.

A Avicultura Nativa é conhecida como sistema nativo brasileiro, onde as galinhas se reproduzem de forma natural via choco. As aves apresentam resistência às principais doenças e quase nunca são vacinadas nem vermifugadas, recebem apenas suplementação alimentar com grãos, ração e verduras, e apresentam também baixa velocidade de crescimento. Produzem carcaças descarnadas e com pouca gordura. Enquadra-se nessa descrição o Frango da Roça ou Pé duro e a Galinha Caipira típica, levando em consideração os termos regionais.

A Avicultura Caipira ou Colonial é o tipo de criação, em que os pintos são produzidos em incubatórios e, normalmente, vem vacinados. São provenientes de criadores matrizeiros que fazem cruzamentos industriais específicos e apresentam controle de qualidade e velocidade de crescimento médio, diferentemente do frango de corte industrial que possui alta velocidade de crescimento. Os frangos caipiras são alimentados com ração balanceada, complementada com pastagem, frutas, verduras, hortaliças, insetos e tubérculos, ou seja, alimentação mista, ração e pasto.

Com o objetivo de regulamentar os sistemas alternativos de criação de aves, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do DIPOA (Divisão de Inspeção de Produtos de Origem Animal), estabelece normas para criação de frangos e ovos caipiras. O sistema de produção caipira é normatizado pelo ofício circular DOI/DIPOA nº 007/99 de 19/05/99, nos quais as aves são denominadas de frango caipira, frango colonial, frango tipo caipira, frango estilo caipira, frango tipo colonial, frango estilo colonial. Somente linhagens ou raças específicas para os sistemas de criação alternativos são permitidas. A alimentação das aves deve ser constituída por ingredientes exclusivamente de origem vegetal, sendo proibido o uso de promotores de crescimento. O acesso externo das aves deve ocorrer após 25 dias de estadia em galpões. A idade mínima de abate é de 85 dias (BRASIL, 1999).

1.5.4 Raças de galinhas

As galinhas de raça pura podem ser identificadas de acordo com a sua colocação em uma classe específica, raça, variedade e/ou linhagem. O termo classe designa os grupos de raças desenvolvidas e originárias de certas regiões geográficas do mundo. As raças são

diferenciadas, principalmente, pelo tamanho, cor de pele e pela conformação do corpo. As diferenças que podem ser evidenciadas entre variedades de uma mesma raça são primariamente relacionadas à cor das penas, distribuição das estampas e tipo de crista (LANA, 2000; MORENG e AVENS, 1990).

A maioria das raças e variedades de galinhas foi desenvolvida entre 1875 e 1925, principalmente com o propósito de apresentá-las em exposições. Hoje a indústria avícola comercial é baseada primariamente em cruzamentos de linhagens, e os criadores de aves reprodutoras estão constantemente procurando por material adicional para novas misturas de genes (MORENG e AVENS, 1990).

A Associação Americana de Avicultura (*The American Poultry Association*) descreve todas as classes, raças e variedades de importância. Dentre as principais classes e raças puras de galinhas destacam-se: classe Americana (raças Plymouth Rock, New Hampshire, Rhode Island Red, Gigante Negra de Jersey); Asiática (Brahma, Langshan, Cochim); Inglesa (Sussex, Cornish, Dorking) e Mediterrânea (Leghorn, Minorca, Anconas). A descrição apresentada pelo “standard” se limita, particularmente, às características de conformação e pormenores sobre a plumagem, sem referências específicas aos aspectos de produtividade (LANA, 2000).

As raças mais indicadas para o sistema caipira de criação são as aves de raças puras americanas. A condição básica de uma galinha caipira é que as aves apresentem pele amarela, plumagem coloridas e boa adaptação para serem criadas no piso. As aves de pele e plumagem branca, a chamada linhagem industrial, não são aceitas pelo mercado consumidor caipira (ALBINO et al., 2005; ALBINO e MOREIRA, 2006; SILVA e NAKANO, 1998).

Estas aves de raças puras americana possuem a cor da pele amarela e colocam ovos de casca marrom. Também podem ser utilizadas com o objetivo de melhorar o plantel de aves das propriedades rurais, tanto as que possuem as caipiras típicas (crioulas), ao serem usadas em cruzamentos com estas, como também com outras raças ou com marcas comerciais que possam existir nestas propriedades. Mesmo apresentando menores índices de produtividade, em relação às marcas comerciais, estas raças americanas permitem à atividade da avicultura obter várias gerações de aves, sem perdas significativas da produtividade, fazendo com que os produtores tenham maior independência em relação à aquisição ou não de pintos de um dia (ALBINO et al., 2005).

1.5.5 Linhagens de galinha caipira

Uma linhagem é representada por um plantel de galinhas reprodutoras que tem um nome e características próprias comuns de uma raça, que são fixados e mantidos através de confinamento e cruzamentos das aves por pelo menos cinco gerações sucessivas. Os caracteres que as diferenciam são de natureza genética e são selecionados pelo criador para fins específicos (MORENG e AVENS, 1990).

O desenvolvimento das linhagens de galinhas caipiras se deu da necessidade de se obter uma ave com boa produção, mas que mantivessem as características caipiras. Com a nova exigência do mercado, buscando produtos alternativos com certificação diferenciada de qualidade, o resgate da galinha colonial tornou-se inevitável, porém, a galinha caipira “original” caracterizada pela sua baixa produtividade inviabilizou a competição desta com a galinha industrial (RAMOS, 1995). A saída foi o desenvolvimento das chamadas linhagens caipiras, nome genérico dado a linhagens, tanto de corte quanto de postura, que mesclam a rusticidade e a resistência das caipiras com a produtividade das industriais (ALBINO et al., 2001; GOMES e ALBINO, 1998).

A fim de atender a demanda do mercado por produtos alternativos, várias linhagens coloniais foram criadas no Brasil. Já existem disponíveis no mercado marcas comerciais de pintos de um dia de linhagens caipiras para produção de carne (frangos de corte) e para produção de ovos (poedeiras). Estas aves são obtidas por meio de elevado padrão de seleção genética e são altamente rústicas e versáteis (ALBINO et al., 2005).

Estas linhagens comerciais caipiras disponíveis no mercado são todas híbridos duplos, não devem ser utilizadas para reprodução com o objetivo de renovação do plantel. O híbrido é um produto originário de cruzamentos entre raças ou linhagens diferentes, mas que pertence a mesma espécie. As aves híbridas não possuem boa habilidade para retransmitir suas características aos descendentes, ocorrendo perda do potencial genético da produção caso sejam acasaladas (ALBINO e MOREIRA, 2006).

Em relação às marcas comerciais de pintos de um dia destinados à produção caipira de carne, destacam-se: o Frango Caipira Pescoço Pelado Label Rouge; os coloniais da Embrapa 041 e 051 e a Paraíso Pedrês, entre outras variedades de linhagens comerciais. E existem marcas comerciais também caipiras para a produção de ovos, todas de linhagem rústicas adaptadas à criação ao ar livre. São elas: a Galinha Caipira Negra, a Caipira Rouge, e a Rubro Negra.

1.5.5.1 Fazenda Aves do Paraíso

A Fazenda Aves do Paraíso localiza-se em Itatiba, a 100 km de São Paulo. Iniciou-se na atividade avícola na década de 40, formando um plantel de diversas raças de galinhas. No início dos anos 80, com a valorização dos produtos naturais, a produção voltou-se para o desenvolvimento de raças mais rústicas, a partir do resgate de características de raças puras dentro de plantéis de galinhas caipiras.

Quando galos ou galinhas coloniais possuíam traços desejáveis de raças puras, eram selecionados, cruzados e as características apuradas, obtendo-se assim, raças homogêneas a partir de galinhas caipiras (RAMOS, 1995). Estas raças, 11 no total, depois de selecionadas, foram cruzadas e o produto são as linhagens comercializadas pela fazenda.

Atualmente a empresa produz duas linhagens comerciais de galinhas caipiras, a Paraíso Pedrês e a Rubro Negra Caipira.

1.5.5.2 Linhagem caipira brasileira Paraíso Pedrês

A linhagem caipira brasileira Paraíso Pedrês (Figura 1) é o resultado do melhoramento genético do tradicional frango caipira brasileiro. É considerada uma ave de rápido ganho de peso, com boa rusticidade, apresenta plumagem mista e foi desenvolvida para a adaptação às condições do regime semi-intensivo. Embora seja especializada para produção de carne (corte) são também utilizadas para produção de ovos caipiras. É competitiva com o frango branco, quando confinada, sobretudo pelo preço de venda que vem obtendo no comércio (ALBINO e MOREIRA, 2006).

1.5.5.3 Linhagem caipira brasileira Rubro Negra

A linhagem caipira brasileira Rubro Negra (Figura 2) é originada do trabalho de melhoramento genético da tradicional galinha caipira para uma linhagem leve de postura (ovos). A fêmea é uma ave rústica, consome pouca ração e produz mais ovos que a galinha caipira de terreiro. Apesar do nome sugestivo, essa linhagem tem o empenamento multicolorido, e seus ovos possuem como característica pigmentação avermelhada, com diferentes formas e tamanhos, o que garante a legitimidade de seus ovos caipiras (ALBINO et al., 2005).



Figura 1 – Aves da linhagem caipira Paraíso Pedrês.
Fonte: ALBINO et al., 2005.



Figura 2 – Aves da linhagem caipira Rubro Negra.
Fonte: ALBINO et al., 2005.

1.6 CONCEITOS DE GENÉTICA APLICADA

1.6.1 Marcadores moleculares

Em genética, do ponto de vista do melhoramento e conservação animal, o principal objetivo é estudar, identificar e medir a variação existente entre e dentro dos indivíduos de uma população. Do ponto de vista molecular, essa variação decorre de mudanças espontâneas no DNA (ácido desoxirribonucléico) que podem ser medidas através de diferentes técnicas disponíveis (MÉNDEZ et al., 2005).

O termo marcador indica que sua função é identificar alguma coisa. No presente contexto ele é utilizado para marcar alelos, colocando “pontos de referência” sobre um local ou uma região de um cromossomo para então localizar genes de interesse que são de difícil identificação (RAMALHO et al., 2008). Entende-se como marcadores genéticos qualquer característica, processo bioquímico ou fragmentos de DNA herdável que permitam a distinção de indivíduos geneticamente diferentes (FALEIRO, 2007).

Estes marcadores são alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA nas quais denominamos de polimorfismos. Como 90% do genoma é composto por sequências não codificadoras, ou seja, que carregam uma sequência de nucleotídeos que não será transcrita em RNA (ácido ribonucléico) funcional, nem traduzida em proteína, a maioria dessas alterações são estáveis e não acarretam em mudanças fenotípicas. Isto favorece a transmissão para os descendentes e a fixação dos polimorfismos dentro de uma população (DIAS-SALMAN et al., 2009).

Um bom marcador molecular deve reunir uma série de características para maximizar sua utilidade, entre elas, deve possuir uma boa distribuição ao longo do genoma e alto grau de polimorfismo. A técnica para analisar o marcador deve ser rápida, prática e deve ser reproduzível em outros laboratórios de forma confiável (MÉNDEZ et al., 2005).

A técnica mais utilizada para a detecção de regiões de interesse do DNA é a técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR, *Polimerase Chain Reaction*), a qual consiste na síntese *in vitro* de regiões específicas do DNA, simulando a replicação. Esta técnica permite a detecção de marcas no DNA, como por exemplo, os polimorfismos.

Entende-se que um gene (ou loco) é polimórfico quando se caracteriza pela ocorrência de pelo menos duas formas alternativas com frequências superiores a 1%. Essas formas alternativas são chamadas de alelos e da sua combinação resultam os genótipos dos indivíduos. A adoção de um valor mínimo de 1% é feito com o objetivo de assegurar que ambos os alelos circulem na população com uma frequência apreciável e não resultam, apenas, da introdução repetida de novas mutações (ALMEIDA e BEJA-PEREIRA, 2005).

Dentre os diferentes marcadores moleculares existentes destacam-se os do tipo DNA microssatélites e os do tipo DNA mitocondrial. A análise de marcadores microssatélites e mitocondriais são consideradas ferramentas úteis para a determinação da variabilidade genética. Muitos locos microssatélites estão disponíveis para utilização em galinhas para o estudo da variabilidade nuclear, da heterozigosidade e da distância genética dos indivíduos (KAYA, 2008). Também, o estudo do DNA mitocondrial destaca-se como instrumento para a investigação molecular da variabilidade não nuclear, das variações genéticas dentro e entre espécies e das relações evolutivas, buscando o entendimento de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (NIU et al., 2002).

1.6.2 Microssatélites

Microssatélites, ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), são sequências de DNA compostas por unidades muito curtas repetidas em tandem, ou seja, uma após a outra. Em sua maioria, são repetições de mono, di, tri ou tetra-nucleotídeos, localizadas dentro de regiões de sequência única (FALEIRO, 2007). Cada bloco de repetições é formado, geralmente, por 75 a 300 pares de nucleotídeos (KINGHORN, WERF e RYAN, 2006). Do mesmo modo que outras regiões repetitivas do genoma, a variação do número de repetições em cada loco é provavelmente resultante de erros no deslocamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA (REGITANO e COUTINHO, 2001).

Os SSR são muito frequentes e distribuídos ao acaso nos genomas, são classificados de acordo com o número de nucleotídeos e a complexidade da sequência que compõe as repetições, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma eucarioto. A frequência e a distribuição dos microssatélites diferem em plantas e animais. A maioria dos 651 microssatélites mapeados no genoma das galinhas é constituída de repetições do tipo $(CA)_n$ (McCONNELL, 1999).

Regiões contendo sequências simples repetidas são amplificadas individualmente através da PCR, utilizando primers específicos, geralmente de 20 a 25 pb (pares de base) (FALEIRO, 2007). Cada loco que constitui um microssatélite é reconhecido ou demarcado por seus primers.

Microssatélites são bons marcadores genéticos, porque cada um deles possui muitos alelos diferentes (multialelismo), isto é, pode haver muitos comprimentos diferentes da região de repetição em um mesmo loco. Um alelo de um microssatélite é definido de acordo com o número de elementos simples repetidos (o mais comum) ou pela sequência de nucleotídeos destes elementos de repetição. Cada segmento amplificado de tamanho (de dezenas até centenas de pb) ou de sequência diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Cada animal terá dois alelos para cada marcador microssatélite, um herdado da mãe e outro do pai. Quanto maior o número de alelos encontrados, maior a probabilidade de se obter indivíduos heterozigotos (KINGHORN, WERF e RYAN, 2006).

Comparando-se os microssatélites com outros marcadores moleculares, constata-se que este apresenta uma série de vantagens sobre os demais, destacando-se: a expressão codominante dos marcadores, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados, permitindo assim a discriminação entre homozigotos e heterozigotos; são altamente polimórficos, o que significa que há diferentes possíveis alelos que um animal pode apresentar em cada loco; e são altamente multialélicos, numa população onde potencialmente todos os alelos daquele loco podem ser detectados e discriminados. (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996; FALEIRO, 2007).

Muitos trabalhos tem descrito microssatélites em galinhas (BEM-AVRAHAM et al., 2006; JACOBSSON et al., 2004; NAKAMURA et al., 2006; TADANO et al., 2008; WARDECKA et al., 2002; WIMMERS et al., 1999; ZHOU e LAMONT, 1999), mas um deles, McConnel et al. (1999), é de particular interesse por descrever apenas microssatélites cuja repetição são tetranucleotídeos, o que torna as análises muito mais fáceis e seguras (LIMA-ROSA, 2004).

Os microssatélites se aplicam a estudos referentes a identificação individual e provas de paternidade, na caracterização molecular de indivíduos ou espécies, na construção de mapas genéticos e identificação de genes de interesse, em estudos de genética populacional, e em estudos de análise de variabilidade genética.

Em relação a esta última aplicação, vários trabalhos recentes tem demonstrado a utilidade desses marcadores para a análise de variabilidade genética nuclear de galinhas (CLEMENTINO et al., 2010; DÁVILA et al., 2009; LI et al., 2009; LI et al., 2010; TADANO et al., 2010; YAO et al., 2010).

1.6.3 DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas celulares citoplasmáticas presentes nas células dos organismos eucariotos. Possuem formato cilíndrico e alongado envoltas por duas membranas altamente especializadas, uma externa e outra interna, que definem dois compartimentos separados, o espaço intermembranoso e o espaço interno da matriz, respectivamente. Na matriz mitocondrial localizam-se as proteínas e enzimas do ciclo de Krebs, os RNA ribossômicos (rRNA), os RNA transportadores (tRNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA) (ALBERTS et al., 2004).

Essas organelas tem funções essenciais para as células, pois participam do processo de respiração celular e produção de energia (ATP) para as atividades do organismo, atuam na morte celular por apoptose, produção de calor e contribuição genética a partir do DNA mitocondrial (LIMA et al., 2010).

As mitocôndrias possuem seu DNA próprio, que é distinto do DNA nuclear, mas que é igualmente importante para a viabilidade da célula. O tamanho de seu genoma é de aproximadamente 16-17 kb na maioria dos animais, incluindo as aves (GUAN, 2007). Em contraste com o DNA dos cromossomos nucleares, este genoma não nuclear ou extranuclear é compacto e os seus genes não possuem íntrons (OTTO, 2000), possuem origem materna em animais, e é haplóide, e por isso são considerados os diferentes alelos como haplótipos (PANETO, 2006; GUAN, 2007). Apresenta-se como uma fita dupla circular, constituídas por bases complementares: uma fita é denominada de cadeia pesada (H) sendo rica em guaninas e a outra fita é denominada cadeia leve (L) sendo rica em citosinas (SOUZA, 2005).

A maior parte do genoma mitocondrial é formado por genes. Entretanto, há uma região não codificadora, localizada na cadeia pesada, de aproximadamente 1.200 nucleotídeos, sendo conhecida como região controle, alça-D ou região hipervariável (Figura

3). Nesta região estão localizados os promotores para o início da transcrição e replicação tanto para a cadeia leve como para a pesada, a qual ocorre simultaneamente, porém em direções opostas (PANETO, 2006; SOUZA, 2005).

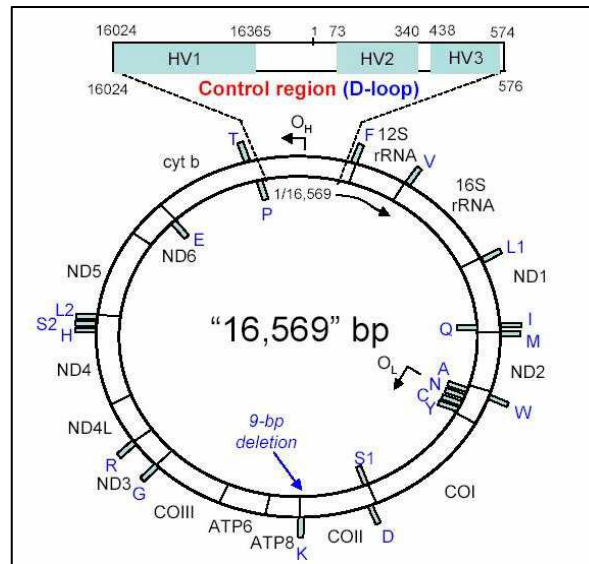


Figura 3 – DNA mitocondrial de vertebrados.
Fonte: BUTLER, 2005.

A sequência da região controle é chamada hipervariável porque acumula mutações pontuais aproximadamente dez vezes mais do que o DNA nuclear (BUDOWLE et al., 2003). Isso se deve a reduzida fidelidade dos processos de replicação da DNA polimerase mitocondrial (um erro a cada 440.000 nucleotídeos); a perda do mecanismo de reparo do mtDNA (LEE e JOHNSON, 2006); ao dano oxidativo causado principalmente por um grande número de radicais livres proporcionando um ambiente favorável a mutação do DNA (CORREIA, 2010); e ainda, o mtDNA não possui histonas, que exerce um papel protetor no DNA nuclear (YAKES e VAN OUTEN, 1997). Como esta região não é transcrita, tais mutações sofrem menor pressão de seleção, permanecendo com maior frequência que as que ocorrem nas partes transcritas do mtDNA.

Sendo assim, a região hipervariável é a que normalmente se analisa e esta região compreende três segmentos da região controle: a região hipervariável I (HVI), a região hipervariável II (HVII) e uma região hipervariável menor (HVIII) (PANETO, 2006).

Durante o desenvolvimento do indivíduo, as moléculas de mtDNA se replicam independentemente umas das outras, existindo a possibilidade de uma população de moléculas de mtDNA, encontradas em um indivíduo, serem diferentes, com variantes das

mesmas replicando e segregando de maneira independente. Essa condição denomina-se heteroplasmia, ou seja, a presença de dois ou mais tipos de mtDNA em um indivíduo. Mutações são acumuladas durante a vida de um indivíduo, logo é esperado que a maioria dos indivíduos possua heteroplasmia (PANETO, 2006).

O método mais utilizado no estudo do polimorfismo do mtDNA consiste em amplificar a região controle, por meio da técnica de PCR e sequenciar o produto amplificado. Então, são verificadas mutações pontuais, inserções e deleções. Muitos trabalhos tem utilizado o mtDNA na análise da variabilidade genética não nuclear em galinhas (GUAN et al., 2007; LIU et al., 2006; OKA et al., 2007; RODRIGRES et al., 2006). Estes estudos permitem além de verificar por si só a variabilidade genética não nuclear, estudar a evolução e os mecanismos migratórios dos indivíduos e a consequente divisão de haplótipos.

2 CAPÍTULO II: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente as duas linhagens de galinhas caipiras brasileiras, Paraíso Pedrês e Rubro Negra.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Investigar a variabilidade genética nuclear e não nuclear de duas linhagens de galinhas caipiras brasileiras através da análise de dez locos de microssatélites e da região controladora, alça-D, do DNA mitocondrial. E, a partir dos haplótipos mitocondriais encontrados, traçar a possível origem materna destas aves.

3 CAPÍTULO III: ARTIGO - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE LINHAGENS DE GALINHAS CAIPIRAS BRASILEIRAS (ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY OF BRAZILIAN COMMERCIAL CAIPIRA CHICKENS LINES)

3.1 RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar a variabilidade genética nuclear e não nuclear de duas linhagens de galinhas caipiras brasileiras através da análise de dez loci de microssatélites e da região controladora, alça-D, do DNA mitocondrial (mtDNA). Foram coletadas amostras de sangue de 92 aves das linhagens Paraíso Pedrês (42) e Rubro Negra (50). Foi utilizada a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR) para a amplificação das amostras e os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em um sequenciador automático ABI 3130 DNA Genetic Analyser. O número de alelos variou de 3 (LEI0254) a 32 (LEI0212) para a linhagem Paraíso Pedrês (PP), e 4 (LEI0254) a 31 (LEI0212) para a linhagem Rubro Negra (RN). A média de alelos por loco foi de 13,40 e 13,10 para a linhagem PP e RN, respectivamente. A heterozigosidade média esperada foi de 0,824 para PP e 0,604 para RN. Na análise do mtDNA, 100% das aves PP possuíam o haplótipo 4, de origem Européia. Na linhagem RN, o haplótipo 4 foi encontrado em 60% das amostras, o haplótipo 3c em 10% e o haplótipo 3d em 30%, os haplótipos 3c e 3d são de origem Asiática. Os resultados obtidos indicam que as linhagens de galinhas caipiras brasileiras analisadas, apresentam uma variabilidade genética superior às observadas em linhagens comerciais típicas de galinhas e semelhante à observada em aves não comerciais. Para a formação da linhagem RN foi utilizado na sua maioria aves de origem Européia e algumas de origem Asiática. E, para a composição da linhagem PP, foi utilizado somente aves de origem Européia, pelo menos no que se refere à linhagem materna.

Palavras-chaves: linhagens caipiras, microssatélites, mtDNA, variabilidade genética

3.2 ABSTRACT

This study aimed to investigate the genetic variability nuclear and nonnuclear of Brazilian commercial caipira chickens lines through the analysis of ten microsatellite loci and the control region, D-loop, mitochondrial DNA (mtDNA). It was collected blood samples from 92 birds of Paraíso Pedrês lines (42) and Rubro Negra (50). It was used the polymerase

chain reaction technique (PCR) to amplify the samples and the amplified products were subjected to electrophoresis on an automated sequencer ABI 3130 DNA Genetic Analyzer. The number of alleles ranged from 3 (LEI0254) to 32 (LEI0212) for Paraíso Pedrês (PP) lines and 4 (LEI0254) to 31 (LEI0212) for Rubro Negra (RN) lines. The number of alleles per locus was 13,40 and 13,10 for PP and RN lines, respectively. Average expected heterozygosity was 0,824 for PP and 0,604 for RN. In the analysis of mtDNA, 100% of birds had PP haplotype 4, from Europe. In the RN line, haplotype 4 was found in 60% of the samples, the haplotype 3c in 10% and 30% in 3d haplotype, the haplotype 3c e 3d, from Asia. The results indicate that Brazilian lines of chickens examined, have a higher genetic variability observed in the typical commercial lines of chickens and the same was found for non-commercial poultry. For the formation of RN lines was used mostly birds of European origin and some of Asian origin. And for the composition of the PP lines were used only birds of European origin, at least as regards the maternal line.

Key words: Brazilian commercial caipira chickens lines, microsatellites, mtDNA, genetic variability

3.3 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira teve início com a chegada dos colonizadores portugueses que trouxeram para o Brasil os primeiros exemplares de aves de raças puras. Estas aves foram criadas soltas, propiciando cruzamentos aleatórios, e surgindo, desta maneira, as chamadas galinhas caipiras brasileiras (GESSULLI, 1999).

Após o término da segunda guerra mundial, o país incorporou tecnologias modernas e, com isso, desenvolveu aves mais produtivas, dando início à avicultura industrial. As galinhas caipiras, pouco produtivas, ficaram esquecidas nos terreiros do interior (ALBINO e MOREIRA, 2006).

Recentemente, uma mudança nos hábitos de consumo ocorrida no início dos anos 80, valorizou os produtos naturais, tornando as galinhas caipiras alternativas de grande valor comercial (CERRI, 1992). Com o aumento da demanda por estes produtos coloniais, ocorreu o desenvolvimento das linhagens caipiras que surgiram da necessidade de se obter uma ave que mesclasse a rusticidade e resistência das aves caipiras originais com a produtividade das industriais (ALBINO et al., 2001).

Existem no mercado avícola, algumas linhagens produzidas no Brasil com esta finalidade, como a Paraíso Pedrês e a Rubro Negra que foram selecionadas a partir do resgate de características de raças puras dentro de plantéis de galinhas caipiras pelos proprietários da Fazenda Aves do Paraíso (RAMOS, 1995). Estas linhagens apresentam uma boa produção de carne e/ou ovos, uma maior resistência a patógenos e uma maior variabilidade genética, quando comparadas às aves industriais típicas (ALBINO et al., 2001). Entretanto, há poucos trabalhos de cunho científico que comprovem estas características.

Atualmente, os avanços na tecnologia molecular tem proporcionado novas oportunidades para avaliar a variabilidade genética em nível de DNA. Os microssatélites, que são sequências repetidas de 1-6 nucleotídeos, são amplamente utilizados para análises de DNA nuclear, uma vez que são numerosos, possuem herança codominante, são de fácil identificação e apresentam grande polimorfismo (KAYA e YILDIZ, 2008).

O DNA mitocondrial (mtDNA) possui uma grande variação em sua estrutura e organização gênica (ZAHA et al., 2003). É herdado maternalmente, contem alto número de cópias e os eventos de recombinação são raros (KANGINAKUDRU et al., 2008). A região controle do mtDNA (alça-D) é a mais frequentemente analisada e vem sendo utilizada em estudos populacionais para a análise de DNA não nuclear devido a alta variabilidade em sua sequência de nucleotídeos (PEREIRA, 2000).

O objetivo deste trabalho foi investigar a variabilidade genética das linhagens de galinhas caipiras brasileiras Paraíso Pedrês e Rubro Negra na região controladora do mtDNA e em dez loci de microssatélites. E também, a partir dos haplótipos mitocondriais encontrados, traçar a origem materna destas aves.

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para as análises foram utilizadas duas linhagens de galinhas caipiras brasileiras, 42 aves da linhagem Paraíso Pedrês e 50 aves da linhagem Rubro Negra, provenientes da Fazenda Aves do Paraíso, localizada no município de Itatiba, estado de São Paulo, Brasil. 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 dos amplicons dos microssatélites desejados foi realizada mediante a técnica de reação em cadeia pela polimerase (PCR), conforme descrita por McConnel et al. (1999) a partir do DNA extraído.

Foram utilizados iniciadores marcados com fluoróforos para dez loci de microssatélites: LEI0192, LEI0194, LEI0212, LEI0214, LEI0217, LEI0221, LEI0248, LEI0254, descritos por McConnel et al. (1999); e MCW0081, MCW0183, descritos em Crooijmans et al. (1997).

As misturas para as reações da PCR e suas respectivas concentrações dos reagentes foram as seguintes: 1 µL de DNA, 2,5 µL de tampão buffer 10x (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl), 0,5-1,33 µL (10-40 mM) de MgCl₂, 1-1,3 µL da mistura de dNTP (1,25 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 µL (µM) de cada iniciador forward e reverse, 1 µL de M13 (µM) (oligonucleotídeo marcado com fluorescência), 0,15-0,20 unidades de Taq Polimerase e H₂O para completar o volume final de 25 µL. Após o preparo, foram levadas a um termociclador e submetidas às seguintes condições de amplificação: 2 minutos de desnaturação inicial a 96°C, 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 96°C, 30 segundos a 1 minuto de anelamento a 48-58°C (dependendo do par de iniciadores) e 30 segundos de extensão a 72°C, bem como 5 minutos de extensão final a 72°C.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese 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.

O cálculo das frequências gênicas foi realizado a mão, e o cálculo para as frequências alélicas, a heterozigosidade esperada e a observada, e a adequação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg para os dez loci de microssatélites foi realizada pelo método de cadeia de Markov (GUO e THOMPSON, 1992) utilizando a versão 3.5 do programa Arlequin (EXCOFIER e LISCHER, 2010).

A amplificação dos fragmentos desejados do mtDNA foi realizada mediante a técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), conforme descrita pelo Dr. Han Jianlin¹, a partir do DNA extraído. Os iniciadores utilizados são os descritos pelo mesmo autor: L16750 e Cr1B.

As misturas para as reações 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

¹ Dr. Han Jialin (comunicação pessoal – 04 jun. 2005).

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 Clustal W (THOMPSON et al., 1994) e, quando necessário, foram corrigidas manualmente, possibilitando a comparação dos alelos encontrados com os já descritos na literatura para as linhagens comerciais típicas.

3.5 RESULTADOS

Os valores de polimorfismo dos loci analisados para as linhagens de galinhas caipiras brasileiras Paraíso Pedrês (PP) e Rubro Negra (RN) estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente (Apêndice da dissertação). Um total de 134 e 131 alelos foram detectados nas populações das linhagens Paraíso Pedrês e Rubro Negra, respectivamente, para os dez loci de microssatélites analisados. O número de alelos por loco variou de 3 (LEI0254) a 32 (LEI0212) na linhagem PP e 4 (LEI0254) a 31 (LEI0212) na linhagem RN, e uma média de 13,40 e 13,10 alelos por loco nas duas linhagens, respectivamente. A diferença entre o tamanho máximo dos alelos observados nos loci variou de 4 (LEI0254) a 180 (LEI0214) e de 6 (LEI0254) a 188 (LEI0214), com uma média de 71,50 e 75,30 pares de base por loco, respectivamente nas linhagens PP e RN.

A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,00 (LEI0254) a 0,976 (LEI0221) para PP e 0,00 (LEI0254) a 0,880 (LEI0221, LEI0212) para RN. A heterozigosidade mínima observada no loco LEI0254 que apresentou 0,00 de heterozigosidade para as duas linhagens analisadas, demonstra que esses indivíduos são homocigotos para este marcador. A frequência média observada de heterozigose na população da linhagem PP para todos os loci foi 0,645 e 0,604 para a linhagem RN.

A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,627 (MCW0081) a 0,948 (LEI0212) para PP e de 0,515 (LEI0254) a 0,956 (LEI0212) para RN. Em todos os loci a frequência média esperada de heterozigose foi 0,824 e 0,604 para PP e RN, respectivamente. A heterozigosidade média observada foi menor que a heterozigosidade média esperada na

linhagem PP e a média das heterozigosidades observadas e esperadas foram iguais nas duas linhagens estudadas.

O número de locos que desviou significativamente ($p < 0,05$) do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi de 5 para a linhagem PP e 6 para RN, com um valor médio de 5,5 para as duas linhagens. Na linhagem Paraíso Pedrês, de todos os locos 50% deles mostraram-se estar em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Enquanto que na linhagem Rubro Negra, de todos os locos 60% deles demonstraram estar em desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

Foi detectado um total de 30 alelos privados na população da linhagem PP em dez locos de microssatélites, distribuídos da seguinte maneira: 11 alelos para o loco LEI0212, 5 para LEI0214, 4 para LEI0192 e MCW0183, 2 para LEI0217 e LEI0248, e 1 para LEI0194 e MCW0081. Do total de 30 alelos privados, 24 apresentaram uma frequência superior a 10%, representado pelos locos LEI0192 e MCW0183 (13%), LEI0214 (17%), LEI0212 (37%). Os locos LEI0254 e LEI0221 não apresentaram alelos privados. Para a população da linhagem RN foi encontrado um total de 26 alelos privados para os dez locos de microssatélites analisados, cujos detalhes foram os seguintes: 9 alelos para o loco LEI0212, 4 para MCW0183 e LEI0214, 3 para LEI0192, 2 para LEI0217 e LEI0248, e 1 para LEI0254 e MCW0081. Do total de 26 alelos privados, 20 apresentaram uma frequência maior que 10%, representado pelos locos LEI0192 (12%), LEI0214 e MCW0183 (15%), LEI0212 (35%). Os locos LEI0194 e LEI0221 não apresentaram alelos privados. Não foi observado loco fixado em nenhuma das duas populações estudadas.

As frequências alélicas encontram-se nas tabelas 3 a 12 e as frequências genótípicas encontram-se nas tabelas 13 e 14 (Apêndice da dissertação). Cada indivíduo apresentou um genótipo único da combinação de todos os locos, ou seja, para os dez locos de microssatélites juntos, ocorreram 92 genótipos diferentes. Em relação ao genótipo particular de um loco, o maior número de genótipos foi encontrado no marcador LEI0212, apresentando 81 genótipos, sendo 41 genótipos na população da linhagem RN, 38 na população da linhagem PP e 2 genótipos pertencentes as duas populações. O menor número de genótipos para um loco, foi encontrado no marcador LEI0254, apresentando 4 genótipos, nos quais 3 estavam presentes nas duas populações e 1 apenas na população da linhagem RN.

Para o marcador LEI0254 nenhum indivíduo heterozigoto foi encontrado em nenhuma das duas populações. O genótipo de maior frequência deste marcador na linhagem RN foi o 081/081, com 66%, e na linhagem PP, o mais frequente foi o genótipo 085/085, com 42,86%. Para o marcador MCW0081, 23 indivíduos estavam em homozigose para o alelo 106, na linhagem RN, representando 46% dos genótipos. Entretanto, na linhagem PP este mesmo

alelo ocorreu em somente 3 indivíduos, representando 7,14% dos genótipos. O genótipo mais frequente para este marcador da linhagem PP foi o 106/126, em 54,77% (este genótipo na RN apresentou a frequência de 26%).

Na linhagem PP, no marcador MCW0081, 23 indivíduos estavam em heterozigose para a combinação de alelos 106/126, representando 54,77% dos genótipos. No entanto, na linhagem RN, foi observada a ocorrência em 13 indivíduos (26%).

Na análise haplotípica do DNA mitocondrial foram detectados duas sequências diferentes para a região controladora, alça-D, do mtDNA na amostra de aves da linhagem Paraíso Pedrês. Porém, ambas as sequências pertencem ao grupo de sequência que fazem parte do haplótipo 4. Assim, 100% das aves Paraíso Pedrês da amostra analisada possuem o mesmo haplótipo (o haplótipo 4), um haplótipo de origem Européia.

Na amostra de galinhas da linhagem Rubro Negra foram encontradas cinco sequências diferentes na região controlada do mtDNA. Três destas cinco sequências pertencem ao haplótipo 4, uma sequência ao haplótipo 3c e outra ao haplótipo 3d. O haplótipo 4, de origem Européia, foi encontrado em 60% das aves amostradas desta linhagem, o haplótipo 3c em 10% e o haplótipo 3d em 30%. Os haplótipos 3c e 3d são de origem Asiática.

Das sequências diferentes pertencentes ao haplótipo 4 encontradas, uma esteve presente em ambas as amostras das duas linhagens de galinha caipira. Uma sequência foi exclusiva das aves Paraíso Pedrês e duas exclusivas das aves Rubro Negra.

3.6 DISCUSSÃO

A maioria dos marcadores microssatélites utilizados neste estudo mostrou um alto grau de polimorfismo. Os resultados do número de alelos obtidos por loco analisado nas duas linhagens estão de acordo com o número mínimo de alelos sugerido por Barker (1994). Segundo este autor, o número médio de alelos por loco deve ser maior que 4 para reduzir o efeito sobre o erro-padrão para cálculos de distância genética nas populações. No presente estudo, apenas 1 marcador microssatélite (LEI0254) da linhagem PP possuía um valor mais baixo. O locus LEI0254 analisado na linhagem PP apresentou 3 alelos por loco, resultado condizente com o encontrado por Ye et al. (2006). Possivelmente, este loco encontra-se em uma região com baixa variabilidade genética em galinhas. Por outro lado, o marcador LEI0212 apresentou elevado número de alelos (32 e 31) para as duas linhagens analisadas. Um número elevado de alelos como este, nos casos de tipificação alélica podem

dificultar a interpretação dos resultados (MENEZES et al., 2006). Possivelmente, este loco encontra-se em uma região hipervariável do DNA no genoma de galinhas.

O número médio de alelos encontrado por loco foi maior do que 10. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Clementino et al. (2010), Granevitze et al. (2007), Romanov e Weigend (2001), Rosenberg et al. (2001) e Zhang et al. (2002), em estudos sobre variabilidade genética em galinhas. Em contraste, Berthouly et al. (2008), Dávila et al. (2009), Li et al. (2010), Marle-Koster e Nel (2000) e Wimmers et al. (2000) observaram valores menores do número médio de alelos.

Os valores de heterozigosidade esperada por loco revelaram elevado grau de polimorfismo, com valores superiores a 0,500 em todos os loci analisados. Os marcadores LEI0212, LEI0217 e LEI0221 mostraram-se igualmente elevados nas duas linhagens de galinhas caipiras, sugerindo que estes marcadores podem ser úteis para estudos de variabilidade genética. Clementino et al. (2010) encontraram resultados semelhantes de He para o marcador LEI0221, utilizando diversas linhagens de galinhas comerciais brasileiras. Este autor ainda demonstra a baixa He encontrada nos marcadores LEI0194 (0,118) e LEI0214 (0,222), o que discorda com o que foi encontrado no presente estudo para estes mesmos marcadores. Porém, para o marcador LEI0192 os resultados de He foram semelhantes. Para os marcadores LEI0192, LEI0194, MCW0081 e MCW0183, Rosenberg et al. (2001) encontraram valores bastante similares para a He em estudos com diferentes populações de galinhas. Ye et al. (2006) encontraram He semelhante ao marcador LEI0254 em seus estudos com galinhas chinesas.

A média da He da linhagem PP foi similar ao estudo feito por Yao et al. (2010) em galinhas chinesas, onde foi observado 0,833 de média. Dávila et al. (2009) também encontraram valores para a média da He semelhantes a linhagem RN utilizando diversas linhagens de galinhas comerciais, como Black Menorca, White Leghorn, Black Castellana, entre outras, onde a média da He foi de 0,637. Em comparação, Granevitze et al. (2007) encontraram a média da He mais baixo, no valor de 0,520, em estudos com populações de galinhas de diferentes continentes. Assim como, Berthouly et al. (2008) que encontraram valores de 0,505 e 0,477 em estudos com galinhas Européias e Asiáticas, respectivamente. A heterozigosidade encontrada nas linhagens em estudo pode ser classificada como alta em comparação com as estimativas obtidas a partir desses estudos.

Em relação à homozigosidade observada no loco LEI0254, que apesar das populações apresentarem 4 (RN) e 3 (PP) alelos, e nenhum indivíduo heterozigoto ter sido encontrado, pode ser consequência de algum tipo de acasalamento direcionado, onde apenas linhas

homozigotas para algum loco de característica de produção específico são acasaladas entre si e os produtos (pintos) misturados para a venda no comércio. Este microssatélite poderia estar em desequilíbrio de ligação com este loco.

Raças e linhagens comerciais de galinhas geralmente passam por uma rigorosa seleção na busca de características consideradas desejáveis o que pode levar a baixa diversidade genética, isto é, uma baixa na heterozigosidade e do número de alelos (TADANO et al., 2008). Neste trabalho, a partir do elevado número médio de alelos e da alta média de H_e da amostra, podemos perceber que apesar de se tratar de duas linhagens comerciais, estes animais mantiveram o elevado polimorfismo característico das suas ancestrais caipiras. Em relação às frequências genotípicas encontradas, que demonstraram alta variabilidade na composição das duas linhagens, ao apresentar um genótipo único da combinação de todos os loci para cada ave, e também ao apresentar muitos genótipos específicos por loco por linhagem, podemos considerar, desta maneira, que estas duas linhagens são geneticamente distintas.

Nas duas populações analisadas foi observado desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg. A linhagem RN foi a que apresentou o maior número de loci em desequilíbrio (6), seguida da linhagem PP (5). Observando-se, desta maneira a diferença de apenas 1 loco em desequilíbrio entre as duas populações. Os marcadores LEI0221 e LEI0248 encontraram-se em HWE nas duas linhagens estudadas. Enquanto que os marcadores LEI0214, LEI0254 e MCW0183 estavam em desequilíbrio em ambas.

Dávila et al. (2009), avaliando a diversidade genética entre diferentes populações de galinhas, encontrou uma média para o HWE de 2,666. Assim como, Granevitze et al. (2007) que também encontrou um valor de média para o HWE de 4,80, valores abaixo do encontrado neste estudo nas duas linhagens de galinhas analisadas. Este desequilíbrio pode ser esperado tanto em populações de raças comerciais com acasalamentos dirigidos, permitindo aumento na frequência de determinados alelos na população (MENEZES et al., 2006), quanto aos efeitos de seleção e endogamia que podem ter ocorrido nessas aves (TADANO et al., 2008). Além disso, o número amostral e de marcadores pode não ter sido representativo para uma análise populacional.

Um total de 30 e 26 alelos privados foram detectados e distribuídos em dez loci de microssatélites, constituindo cerca de 22% e 20% do número total de alelos encontrados nas respectivas linhagens PP e RN. Estes alelos não se repetiram entre as duas populações, sendo então considerados únicos. Granevitze et al. (2007) também encontraram a ocorrência elevada do número de alelos privados chegando a 32 em uma população de galinhas do meio oeste

Europeu, e 29 em uma população de galinhas de origem recente na China. Tadano et al. (2007) em seu estudo sobre diversidade genética em linhagens de galinhas comerciais encontrou um total de 42 alelos únicos, constituindo 16% do total de alelos encontrados, percentual abaixo do encontrado neste estudo.

Um número elevado de alelos privados em loco específico de microssatélites pode indicar que esse marcador esteja situado em uma região do genoma que pode ser mais suscetível a mutações (GRANEVITZE et al., 2007) ou pode-se estimar a ocorrência de fluxo gênico entre as populações (SLATKIN e BARTON, 1989).

Na análise do DNA mitocondrial, Lima-Rosa et al. (dados não publicados) analisando a variabilidade haplotípica do mtDNA em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis encontraram dois haplótipos mitocondriais. O haplótipo 4 (93%) e o 3d (6,7%), demonstrando que a origem dessas galinhas é Européia, com pouca mestiçagem com as raças orientais. Este resultado é semelhante com o encontrado neste trabalho para a linhagem RN, que também apresentou a ocorrência destes haplótipos. E para a linhagem PP, que demonstrou 100% de haplótipos de origem Européia. Conforme comunicação pessoal do Dr. Han Jianlin, os haplótipos mitocondriais de galinhas se dividem em sete: haplótipo 2 e 4 (origem Européia), haplótipo 3a, 3b, 3c e 3d (origem Asiática), e o haplótipo 1 ancestral a todos os grupos.

Segundo Santana et al. (2008), a linhagem Paraíso Pedrês foi desenvolvida a partir do cruzamento das classes Asiáticas (*Gallus bankiva*, *Gallus varius* e Brahma) e Americanas (Plymouth Rock e Rhode Island). Contrastando desta maneira, com o que foi encontrado neste trabalho, que apresentou somente haplótipos de origem Européia.

Nesse sentido, pode-se dizer que para a formação da linhagem comercial de galinha caipira RN foi utilizado na sua maioria animais de origem Européia e algumas de origem Asiática. Assim como, para a composição da linhagem caipira PP a utilização de somente animais de origem Européia. Pelo menos no que diz respeito às origens maternas destas duas linhagens de aves caipiras brasileiras.

3.7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados aqui apresentados podemos concluir que as duas linhagens caipiras de galinhas brasileiras, Paraíso Pedrês e Rubro Negra, apresentam uma variabilidade genética superior às observadas em linhagens comerciais típicas de galinhas e semelhante à observada em aves não comerciais. Comprovando, desta maneira, o que postulam alguns autores de que galinhas ou linhagens caipiras apresentam uma maior variabilidade genética do

que aves comerciais. Na análise haplotípica do mtDNA, pode-se traçar a origem materna destas linhagens. Sendo que, para a formação da linhagem RN foi utilizado na sua maioria aves de origem Européia e algumas de origem Asiática. E, para a composição da linhagem PP, foi utilizado somente aves de origem Européia.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avicultura é hoje um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro e também o que mais cresceu nos últimos anos segundo os dados da União Brasileira de Avicultura. O aumento da demanda de alimentos, oriundos da exploração animal, continua sendo o fator básico do grande desenvolvimento demonstrado no campo da criação de aves, o qual apresenta a vantagem de seu ciclo produtivo ser rápido.

Atualmente, os consumidores estão cada dia mais exigentes em relação à qualidade dos alimentos, e também, mais preocupados com o impacto da produção agropecuária sobre o meio ambiente e o bem estar social. Com isso, os sistemas alternativos de produção de frangos de corte e de aves postura, utilizam as linhagens caipiras, que foram desenvolvidas para atender aos anseios de uma parcela dos consumidores que priorizam o consumo de produtos mais saudáveis. Estas linhagens, formadas através de seleção acentuada, são bem mais produtivas que suas ancestrais caipiras.

Uma das utilidades importantes dos marcadores moleculares é avaliar a variabilidade genética das populações. Os resultados desta avaliação no presente trabalho demonstram que, baseado na heterozigosidade esperada e na quantidade de alelos e genótipos dos microssatélites, existe uma significativa variabilidade genética nas linhagens de galinhas caipiras brasileiras, Paraíso Pedrês e Rubro Negra.

As raças crioulas “típicas” segundo a literatura possuem uma riqueza alélica distintamente mais alta que as raças comerciais especializadas. Pelo que podemos observar neste estudo, as linhagens analisadas, mostraram-se tão polimórficas como as galinhas caipiras originais. Isto demonstra que, apesar do processo de seleção a qual estas linhagens foram submetidas no desenvolver de sua formação, grande parte do polimorfismo original foi mantido, o que torna estes animais de produção capazes de suportar os desafios sanitários do sistema extensivo de criação de aves.

O alto grau de polimorfismo encontrado na análise para a maioria dos lócus estudados habilita tais microssatélites a serem utilizados como marcadores moleculares para estudos de variabilidade populacional, de paternidade e de coeficiente de endogamia, entre outros, em galinhas.

Já para os haplótipos do mtDNA, uma variação pequena foi encontrada, entretanto resultado semelhante foi visto em aves caipiras originais. Isto demonstra, mais uma vez, a manutenção de características das aves caipiras nestas linhagens comerciais caipiras.

A análise da diversidade genética, na alça-D, do mtDNA das amostras estudadas também demonstrou a origem (da linhagem materna) das aves que contribuíram para a formação destas linhagens, na sua maioria de origem Européia.

Os resultados deste trabalho visam contribuir um pouco mais para o conhecimento da variabilidade genética das linhagens de galinhas caipiras brasileiras e dar ferramentas para a implantação de futuros programas de melhoramento genético associado à utilização de marcadores moleculares.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**, 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2004. 1584 p.
- ALBINO, L. F. T. et al. **Criação de Frango e Galinha Caipira: Avicultura alternativa**. 2. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2001. 208 p.
- ALBINO, L. F. T. et al. **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.
- ALMEIDA, N. F. de; BEJA-PEREIRA, A. B. **Genética, Biotecnologia e Agricultura**. Porto: SPI, 2005. 96 p.
- BARKER, J. S. F. A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds. In: PROCEEDINGS 5th WORLD CONGRESS GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 1994, Guelph, Ontario, Canada. Univ. Guelph, Guelph, Ontario, Canadá, p.501-508, 1994.
- BEM-AVRAHAM et al. W-specific microsatellite loci detected by in silico analysis map to chromosome Z of the chicken genome. **Animal Genetics**, n. 37, p. 179-188, 2006.
- 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 out. 2010.
- BERTHOULY, C. et al. Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. **Animal Genetics**, v. 39, p. 121-129, 2008.
- BRAGA, R. M.; ROQUE, M. da S. **Comercialização de galinha viva do tipo “caipira” em Boa Vista, Roraima**. Boa Vista: Embrapa, jul. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Sistema de legislação agrícola e federal – SISLEGIS. **Ofício circular número 7, de 19 de maio de 1999.** Dispõe sobre registro do produto “frango caipira ou frango colonial” ou “frango tipo ou estilo caipira” ou “tipo ou estilo colonial”. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17706>>. Acesso em: 6 out. 2010.

BUDOWLE, B. et al. Forensics and mitochondrial DNA: Applications, debates, and foundations. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 4, p. 119-141, 2003.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing**. 2. ed. London: Elsevier Academic Press, 2005.

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

CLEMENTINO, C. S. et al. Microsatellite DNA loci for population studies in Brazilian chicken ecotypes. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 12, p. 1100-1106, 2010.

CORREIA, R. de L. **Alterações metabólicas e o papel da mitocôndria no processo de tumorigênese de astrocitomas humanos**. 2010. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

CROOIJMANS, R. P. et al. New microsatellite marker in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. **Animal Genetics**, v. 28, p. 427-437, 1997.

DÁVILA, S. G. et al. Evaluation of diversity between different Spanish chicken breeds, a tester line, and a White Leghorn population based on microsatellite markers. **Poultry Science**, v. 88, p. 2518-2525, 2009.

DIAS-SALMAN, A. K.; GIACHETTO, F.; MALAGO, W. J. Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. **Revista eletrônica de Veterinária**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 1-16, 2009.

ENGLERT, S. I. **Avicultura**. 3. ed. Porto Alegre: Agropecuária, 1980. 288 p.

EXCOFFIER, L.; LISHER, H. E. L. **Arlequin suite ver 3.5**: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resouces*, v. 10 p. 564-567, 2010.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares: Aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FERREIRA, M. E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1996. 220 p.

GESSULLI, O. P. **Avicultura Alternativa: sistema “ecologicamente correto” que busca o bem-estar animal e a qualidade do produto final**. Porto feliz: OPG Editores, 1999. 217 p.

GIROTTI, A. F.; AVILA, V. S. de. (jan/2003). Embrapa: Suínos e Aves. **Sistemas de Produção de Frangos de Corte**: Aspectos da produção, exportação, consumo e custos de produção e implantação de aviários. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaodeFrangodeCorte/Importancia-economica.html>>. Acesso em: 30 out. 2010.

GOMES, P. C.; ALBINO, L. F. **Criação de Frango e Galinha Caipira**. Filmes CPT – Centro de Produções Técnicas. Cód.: 050. Minas Gerais: Série Avicultura. 1998.

GRANEVITZE, Z. et al. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. *Animal Genetics*, v. 38, p. 576-583, 2007.

GUAN, X. et al. Mitochondrial DNA sequence and haplotype variation analysis in the chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Hereditary*, v. 98, n. 7, p. 723-726, 2007.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, v. 48, n. 2, p. 361-372, 1992.

HEINZEN, L. F. **A realidade em uma pequena empresa da avicultura catarinense**. 2006. 44 f. (Monografia) – Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, 2006.

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.

JACOBSON, L. et al. Assignment of Fourteen Microsatellite Markers to the Chicken Linkage Map. **Poultry Science**, v. 83, p. 1825-1831, 2004.

KINGHORN, B.; WERF, J. V. D.; RYAN, M. **Melhoramento Animal: Uso de novas tecnologias**. Piracicaba: FEALQ, 2006. 367 p.

KANGINAKUDRU, S. et al. Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 174, p. 1-14, 2008.

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.

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

LEE, H. R.; JOHNSON, K. A. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 47, p. 36236-36240, 2006.

LI, H. F. et al. Analysis of genetic structure and relationship among nine indigenous Chinese chicken populations by the Structure program. **Journal of Genetics**, v. 88, n. 2, p. 197-203, 2009.

LI, H. F. et al. Genetic diversity and population structure of 10 Chinese indigenous egg-type duck breeds assessed by microsatellite polymorphism. **Journal of Genetics**, v. 89, n. 1, p.65-72, 2010.

LIMA T. F. O. de; DUARTE D. A.; SÁ A. L. B. Mitocôndria Revisada. **REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 1, p. 39-51. 2010.

LIMA-ROSA, C. A. da V. **Estudo da variabilidade dos genes B-F (MHC Classe I) e de um microssatélite associado em galinhas caipiras brasileiras**. 2004. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2004.

LIMA-ROSA, C. A. V. et al. **Variabilidade genética da região controladora do mtDNA (alça-D) de galinhas caipiras brasileiras**. Dados não publicados.

LIU, Y. P. et al. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 38, p. 12-19, 2006.

MALAVAZZI, G. **Avicultura**: Manual prático. São Paulo: Nobel, 1978. 156 p.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Acessoria de Gestão Estratégica – AGE. **Projeções do Agronegócio 2009/10 a 2019/20**. Brasília, 2010. 48 f. Disponível em: <http://www20.gencat.cat/docs/DAR/DE_Departament/DE02_Estadistiques_observatoris/24_Estudis_i_documents/01_Novetats_documentals/Fitxers_estatics/BRAZIL_PROSPECTIVA.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2010.

MARLE-KOSTER, E. V.; NEL, L. H. Genetic characterization of native southern African chicken populations: Evaluation and selection of polymorphic microsatellite markers. **South African Journal of Animal Science**, v. 30, p. 1-6, 2000.

McCONNELL, S. K. J. et al. The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. **Animal Genetics**, v. 30, n. 3, p. 183-189, 1999.

MÉNDEZ, A. J. et al. Los microsatélites (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.

MENEZES, M. P. C. et al. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, 2006.

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

NAKAMURA, A. et al. A method for discriminating a Japanese Chicken, the Nagoya breed, using microsatellite markers. **Poultry Science**, v. 85, p. 2124-2129, 2006.

NIU, D. et al. The origin and genetic diversity of Chinese native chicken breeds. **Biochemical Genetics**, v. 40, n. 5/6, 2002.

OKA, T. et al. Analysis of mtDNA sequences shows Japanese native chickens have multiple origins. **Animal Genetics**, v. 38, p. 287-293, 2007.

OTTO, P. G. **Genética Básica para Veterinária**. 3. ed., São Paulo: Rocca, 2000. 299 p.

PANETO, G. G. **Utilização do DNA mitocondrial no contexto forense brasileiro**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestre em Análises Clínicas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2006.

PEREIRA, L. S. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p.745-752, 2000.

RAMALHO, M. A. P; SANTOS, J. B; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 4. ed., Lavras: Ed. UFLA, 2008. 464 p.

RAMOS, M. A. O Caipira de Sangue Azul. **Globo rural**, v. 113, p. 39-43, 1995.

REGITANO, L. C. de A.; COUTINHO, L. L. **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: Embrapa, 2001. 215 p.

RODRIGUES, F. P.; QUEIROZ, S. A.; DUARTE, J. M. B. Genetic 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, p. 1057-1063, 2001.

ROSENBERG, N. A. et al. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. **Genetics**, v. 159, p. 699-713, 2001.

SAGRILO et al. (jan/2003). Embrapa: Meio norte. **Agricultura Familiar**: Validação do sistema alternativo de criação de galinha caipira. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/GalinhaCaipira/index.htm>>. Acesso em: 06 nov. 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTANA, M. I. et al. Irrigação do timo em aves da linhagem Paraíso Pedrês (*Gallus gallus domesticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 307-314, 2008.

SILVA, R. D. de M. e; NAKANO, M. **Sistema Caipira de Criação de Galinhas**. Piracicaba: [s.n.], 1998. 110 p.

SILVA, M. A. N. da, et al. Influência do sistema de criação sobre o desempenho, a condição fisiológica e o comportamento de linhagens de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 208-213, 2003.

SLATKIN, M.; BARTON, N. H. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. **Evolution**, v. 43, p. 1349-68, 1989.

SOUZA C. F. M. de. **Um estudo clínico, bioquímico histoquímico e genético-molecular de pacientes com doenças do DNA mitocondrial**. 2005. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

TADANO, R. et al. Assessing genetic diversity and population structure for commercial chicken lines based on forty microsatellite analyses. **Poultry Science**, v. 86, p. 2301-2308, 2007.

TADANO, R. et al. High genetic divergence in miniature breeds of Japanese native chickens compared to Red Junglefowl, as revealed by microsatellite analysis. **Animal Genetics**, v. 39, p. 71-78, 2008.

TADANO, R. et al. Molecular characterization reveals genetic uniformity in experimental chicken resources. **Experimental. Animals**, v. 54, n. 4, p. 511-514, 2010.

TAKAHASHI, S. E. et al. Efeito do sistema de criação sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte tipo colonial. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 624-632, 2006.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

UBABEF. **União Brasileira de Avicultura. Relatório anual 2009/2010**. São Paulo: UBA, 2009/2010. 36 p. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/publicacoes/relatorio-anual-2010.pdf>>. Acesso em: 18 ago. 2010.

WARDECKA, B, et al. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosomes 1-5 originating from the Rhode Island Red and Green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F2 mapping population. **Journal of Applied Genetics**, v. 43, n. 3, p. 319-329, 2002.

WIMMERS, K. et al. Application of Microsatellite Analysis to Group Chicken According to Their Genetic Similarity. **Archiv Tierzucht**, v. 42, p. 629-639, 1999.

WIMMERS, K. et al. Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. **Animal Genetics**, v. 31, p. 159-165, 2000.

YAKES, M. F.; VAN HOUTEN, B. Mitochondrial DNA damage in human cells following oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 514-519. 1997.

YAO, D. et al. Correlations between microsatellite loci and growth and carcass traits in Chinese silkies. **Research Journal of Poultry Sciences**, v. 3, n. 1, p. 5-10, 2010.

YE, L. H. et al. Genety diversity analysis of Nixi chickens using microsatellite DNA markers. **Zoological Research**, v. 27, n. 1, p. 68-74, 2006.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3. ed., Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. 424p.

ZANUSSO, J. T.; DIONELLO, N. J. L. Produção Avícola Alternativa: Análise dos fatores qualitativos de carne de frangos de corte tipo caipira. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 191-194, jul/set 2003.

ZHANG, X. et al. Comparative analysis of allozyme, random amplified polymorphic DNA, and microsatellite polymorphism on chinese native chickens. **Poultry Science**, v. 81, p. 1093-1098, 2002.

ZHOU, H.; LAMONT, S. J. Genetic characterization of biodiversity in highly inbred chicken lines by microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 30, p. 256-264, 1999.

APÊNDICE

Tabela 1 – Polimorfismo de 10 loci de microssatélites em 42 amostras da linhagem de galinha caipira brasileira Paraíso Pedrês.

Tabela 2 – Polimorfismo de 10 loci de microssatélites em 50 amostras da linhagem de galinha caipira brasileira Rubro Negra.

Tabela 3 – Frequência alélica do marcador LEI0254.

Tabela 4 – Frequência alélica do marcador MCW0081.

Tabela 5 – Frequência alélica do marcador LEI0194.

Tabela 6 – Frequência alélica do marcador LEI0248.

Tabela 7 – Frequência alélica do marcador MCW0183.

Tabela 8 – Frequência alélica do marcador LEI0221.

Tabela 9 – Frequência alélica do marcador LEI0192.

Tabela 10 – Frequência alélica do marcador LEI0217.

Tabela 11 – Frequência alélica do marcador LEI0214.

Tabela 12 – Frequência alélica do marcador LEI0212.

Tabela 13 – Frequência genotípica dos marcadores LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0192 e LEI0248.

Tabela 14 – Frequência genotípica dos marcadores LEI0214, LEI0194, MCW0183, MCW0081 e LEI0254.

Tabela 1 – Polimorfismo de 10 locos de microssatélites em 42 amostras da linhagem de galinha caipira brasileira Paraíso Pedrês.

Loco	N _a ¹	T ² (pb)	Ho ³	He ⁴	Valor de p ⁵	s.d. ⁶	Ap ⁷
LEI0192	16	248-344	0,738	0,852	0,001	0,000	4 (13%)
LEI0194	9	116-162	0,357	0,821	0,000	0,000	1 (3%)
LEI0212	32	338-470	0,857	0,948	0,177	0,000	11 (37%)
LEI0214	18	129-309	0,333	0,867	0,000	0,000	5 (17%)
LEI0217	17	182-276	0,905	0,925	0,119	0,000	2 (7%)
LEI0221	14	181-229	0,976	0,918	0,977	0,000	0 (0%)
LEI0248	9	224-264	0,810	0,825	0,328	0,000	2 (7%)
LEI0254	3	81-85	0,000	0,660	0,000	0,000	0 (0%)
MCW0081	6	97-126	0,833	0,627	0,052	0,000	1 (3%)
MCW0183	10	258-310	0,643	0,797	0,001	0,000	4 (13%)
Média	13,40	71,50	0,645	0,824	-	-	3,00

¹Número de alelos por loco.

²Tamanho do alelo em pares de base.

³Frequência de heterozigosidade observada.

⁴Frequência de heterozigosidade esperada.

⁵Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada; loco em equilíbrio (p>0,05).

⁶Desvio padrão.

⁷Alelo privado, com a máxima frequência dos alelos privados em cada loco entre parênteses (>10%).

Tabela 2 – Polimorfismo de 10 locos de microssatélites em 50 amostras da linhagem de galinha caipira brasileira Rubro Negra.

Loco	N _a ¹	T ² (pb)	Ho ³	He ⁴	Valor de p ⁵	s.d. ⁶	Ap ⁷
LEI0192	15	188-344	0,800	0,853	0,282	0,000	3 (12%)
LEI0194	8	120-162	0,640	0,770	0,096	0,000	0 (0%)
LEI0212	31	352-368	0,880	0,956	0,010	0,000	9 (35%)
LEI0214	17	121-309	0,260	0,834	0,000	0,000	4 (15%)
LEI0217	17	174-250	0,860	0,932	0,000	0,000	2 (8%)
LEI0221	14	181-229	0,880	0,874	0,861	0,000	0 (0%)
LEI0248	9	216-256	0,640	0,694	0,380	0,000	2 (8%)
LEI0254	4	81-87	0,000	0,515	0,000	0,000	1 (4%)
MCW0081	6	97-126	0,380	0,535	0,001	0,000	1 (4%)
MCW0183	10	258-310	0,700	0,794	0,000	0,000	4 (15%)
Média	13,10	75,30	0,604	0,604	-	-	2,60

¹Número de alelos por loco.

²Tamanho do alelo em pares de base.

³Frequência de heterozigosidade observada.

⁴Frequência de heterozigosidade esperada.

⁵Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população estudada; loco em equilíbrio (p>0,05).

⁶Desvio padrão.

⁷Alelo privado, com a máxima frequência dos alelos privados em cada loco entre parênteses (>10%).

Tabela 3 – Frequência alélica do marcador LEI0254.

	081	083	085	087
Paraíso Pedrês	0,310	0,262	0,429	-
Rubro Negra	0,660	0,120	0,200	0,020

Tabela 4 – Frequência alélica do marcador MCW0081.

	097	103	106	114	117	120	126
Paraíso Pedrês	0,012	0,083	0,381	0,036	0,012	-	0,476
Rubro Negra	0,070	0,020	0,630	0,010	-	0,010	0,260

Tabela 5 – Frequência alélica do marcador LEI0194.

	116	120	128	132	144	148	152	158	162
Paraíso Pedrês	0,071	0,262	0,214	0,012	0,238	0,083	0,036	0,024	0,060
Rubro Negra	-	0,410	0,080	0,020	0,140	0,100	0,060	0,170	0,020

Tabela 6 – Frequência alélica do marcador LEI0248.

	216	224	228	232	236	240	244	248	252	256	264
Paraíso Pedrês	-	0,060	0,048	0,083	0,202	0,238	0,262	0,071	-	0,024	0,012
Rubro Negra	0,020	0,040	-	0,100	0,520	0,150	0,040	0,060	0,030	0,040	-

Tabela 7 – Frequência alélica do marcador MCW0183.

	258	262	266	270	272	286	288	290	294	298	300	304	306	310
Paraíso Pedrês	0,024	0,024	0,036	0,012	-	0,369	0,119	0,202	0,083	0,024	-	0,107	-	-
Rubro Negra	0,020	-	-	-	0,010	0,370	-	0,140	0,080	0,100	0,060	0,190	0,020	0,010

Tabela 8 – Frequência alélica do marcador LEI0221.

	181	185	189	193	197	201	205	207	209	213	217	221	225	229
Paraíso Pedrês	0,048	0,036	0,048	0,071	0,060	0,155	0,060	0,060	0,155	0,071	0,012	0,048	0,083	0,095
Rubro Negra	0,040	0,020	0,030	0,020	0,050	0,150	0,250	0,060	0,080	0,150	0,100	0,010	0,030	0,010

Tabela 9 – Frequência alélica do marcador LEI0192.

	188	232	248	252	260	264	268	276	280	284	288	292	296	304	324	328	336	340	344
Paraíso Pedrês	-	-	0,167	0,310	0,024	0,095	0,071	0,012	-	0,012	0,107	0,071	0,024	0,024	0,012	0,012	0,012	0,024	0,024
Rubro Negra	0,010	0,010	0,310	0,050	0,010	0,130	0,070	0,050	0,010	0,090	0,140	0,020	0,030	-	-	-	-	0,060	0,010

Tabela 10 – Frequência alélica do marcador LEI0217.

	174	178	182	186	190	194	198	202	206	210	214	218	222	226	230	234	246	250	276
Paraíso Pedrês	-	-	0,060	0,036	0,095	0,036	0,024	0,036	0,024	0,024	0,167	0,131	0,095	0,060	0,071	0,048	0,024	0,036	0,036
Rubro Negra	0,050	0,010	0,050	0,130	0,070	0,030	0,070	0,030	-	0,010	0,110	0,090	0,070	0,100	0,070	0,010	0,030	0,030	-

Tabela 11 – Frequência alélica do marcador LEI0214.

	121	125	129	133	137	141	145	149	153	157	161	165	177	189	261	265	273,	277
Paraíso Pedrês	-	-	0,024	0,131	0,190	0,024	-	0,012	0,012	0,262	0,095	0,024	-	0,012	0,024	0,012	0,012	0,012
Rubro Negra	0,040	0,030	0,030	0,090	0,240	0,010	0,010	0,010	-	0,310	0,040	-	0,010	0,050	-	0,010	0,020	0,050

Tabela 11 – Frequência alélica do marcador LEI0214 (Continuação).

	297	301	305	309
Paraíso Pedrês	0,024	0,083	0,024	0,024
Rubro Negra	-	0,040	-	0,010

Tabela 12 – Frequência alélica do marcador LEI0212.

	338	348	350	352	358	360	366	374	376	378	380	382	384	390	398	404	406	408	412
Paraíso Pedrês	0,012	0,024	0,024	-	0,036	0,071	0,024	0,024	0,060	-	0,012	0,036	0,036	-	0,083	0,012	0,012	0,024	0,012
Rubro Negra	-	-	-	0,010	0,080	0,060	0,030	0,020	0,010	0,020	0,030	0,090	-	0,010	0,040	-	0,090	0,010	0,020

Tabela 12 – Frequência alélica do marcador LEI0212 (Continuação).

	414	420	422	426	428	430	432	434	436	438	440	442	444	446	448	450	452	454
Paraíso Pedrês	0,071	0,012	0,012	0,012	0,012	0,060	0,012	0,012	-	0,024	0,036	0,012	-	0,024	0,012	-	-	0,167
Rubro Negra	0,050	0,020	0,030	-	0,030	0,010	-	0,010	0,050	0,010	-	0,010	0,030	-	0,010	0,090	0,070	0,030

Tabela 12 – Frequência alélica do marcador LEI0212 (Continuação).

	456	458	462	468	470
Paraíso Pedrês	-	-	0,012	-	0,012
Rubro Negra	0,010	0,010	-	0,010	-

Tabela 13 – Frequência genotípica dos marcadores LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0192 e LEI0248 (Continua).

Genótipo de acordo com os alelos (bp)	LEI0212				LEI0217				LEI0221				LEI0192				LEI0248							
	Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra					
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%		
338/414	1	2,38	x	x	174/186	x	x	2	4,00	181/201	x	x	1	2,00	152/288	x	x	1	2,00	216/232	x	x	1	2,00
348/366	1	2,38	x	x	174/214	x	x	3	6,00	181/205	x	x	3	6,00	168/288	x	x	1	2,00	216/256	x	x	1	2,00
348/412	1	2,38	x	x	178/182	x	x	1	2,00	181/207	1	2,38	x	x	248/232	x	x	1	2,00	224/228	1	2,38	x	x
350/438	1	2,38	x	x	182/182	1	2,38	x	x	181/209	3	7,14	x	x	248/248	3	7,14	5	10,00	224/232	x	x	1	2,00
350/470	1	2,38	x	x	182/186	x	x	3	6,00	185/201	1	2,38	x	x	248/260	1	2,38	x	x	224/236	1	2,38	2	4,00
352/454	x	x	1	2,00	182/194	x	x	1	2,00	185/209	1	2,38	x	x	248/264	1	2,38	4	8,00	224/240	1	2,38	x	x
358/358	x	x	1	2,00	182/214	1	2,38	x	x	185/213	x	x	2	4,00	248/268	x	x	2	4,00	224/244	1	2,38	x	x
358/376	1	2,38	x	x	182/218	1	2,38	x	x	185/229	1	2,38	x	x	248/276	1	2,38	2	4,00	224/248	1	2,38	1	2,00
358/382	x	x	1	2,00	182/230	1	2,38	x	x	189/205	1	2,38	1	2,00	248/284	x	x	5	10,00	228/236	1	2,38	x	x
358/406	x	x	1	2,00	186/186	x	x	1	2,00	189/207	1	2,38	1	2,00	248/288	3	7,14	4	8,00	228/244	2	4,76	x	x
358/412	x	x	1	2,00	186/198	x	x	1	2,00	189/209	1	2,38	1	2,00	248/296	1	2,38	1	2,00	232/236	2	4,76	6	12,00
358/428	x	x	1	2,00	186/214	2	4,76	2	4,00	189/225	1	2,38	x	x	248/340	1	2,38	2	4,00	232/240	2	4,76	1	2,00
358/430	1	2,38	x	x	186/218	1	2,38	1	2,00	193/197	1	2,38	x	x	252/252	6	14,29	x	x	232/244	1	2,38	x	x
358/442	x	x	1	2,00	186/230	x	x	1	2,00	193/201	1	2,38	x	x	252/264	2	4,76	x	x	232/248	1	2,38	x	x
358/444	x	x	1	2,00	186/250	x	x	1	2,00	193/205	x	x	2	4,00	252/268	5	11,90	1	2,00	232/252	x	x	1	2,00
358/448	1	2,38	x	x	190/190	1	2,30	1	2,00	193/209	1	2,38	x	x	252/288	1	2,38	1	2,00	232/256	1	2,38	x	x
360/360	1	2,38	x	x	190/194	1	2,38	x	x	193/213	1	2,38	x	x	252/292	4	9,52	1	2,00	236/236	2	4,76	16	32,00
360/366	1	2,38	x	x	190/198	x	x	1	2,00	193/225	1	2,38	x	x	252/304	1	2,38	x	x	236/240	6	14,29	5	10,00
360/384	1	2,38	x	x	190/202	1	2,38	x	x	193/229	1	2,38	x	x	252/328	1	2,38	x	x	236/244	1	2,38	2	4,00

Tabela 13 – Frequência genotípica dos marcadores LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0192 e LEI0248 (Continuação).

Genótipo de acordo com os alelos (bp)	LEI0212				LEI0217				LEI0221				LEI0192				LEI0248							
	Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra		Paraíso Pedrês		Rubro Negra					
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%				
360/390	x	x	1	2,00	190/214	1	2,38	x	x	197/197	x	x	1	2,00	252/344	x	x	1	2,00	236/248	1	2,38	2	4,00
360/398	1	2,38	x	x	190/218	x	x	1	2,00	197/201	2	4,76	x	x	260/264	1	2,38	x	x	236/252	x	x	1	2,00
360/414	x	x	2	4,00	190/226	1	2,38	2	4,00	197/205	x	x	1	2,00	260/288	x	x	1	2,00	236/256	x	x	2	4,00
360/422	x	x	1	2,00	190/230	1	2,38	x	x	197/209	2	4,76	x	x	264/264	x	x	2	4,00	236/264	1	2,38	x	x
360/432	1	2,38	x	x	190/234	x	x	1	2,00	197/213	x	x	1	2,00	264/268	x	x	1	2,00	240/240	1	2,38	2	4,00
360/436	x	x	1	2,00	190/276	1	2,38	x	x	197/217	x	x	1	2,00	264/284	1	2,38	1	2,00	240/244	8	19,05	1	2,00
360/452	x	x	1	2,00	194/210	1	2,38	x	x	201/201	x	x	1	2,00	264/288	2	4,76	2	4,00	240/248	x	x	2	4,00
366/414	x	x	1	2,00	194/222	1	2,38	1	2,00	201/205	x	x	4	8,00	264/296	x	x	1	2,00	240/252	x	x	1	2,00
366/366	x	x	1	2,00	194/230	x	x	1	2,00	201/207	x	x	1	2,00	264/340	1	2,38	x	x	240/256	1	2,38	1	2,00
374/398	1	2,38	x	x	198/202	1	2,38	x	x	201/209	2	4,76	1	2,00	268/280	x	x	1	2,00	244/244	4	9,52	x	x
374/406	x	x	1	2,00	198/214	x	x	1	2,00	201/213	2	4,76	2	4,00	268/284	x	x	1	2,00	244/248	1	2,38	1	2,00
374/420	x	x	1	2,00	198/222	x	x	1	2,00	201/217	1	2,38	2	4,00	268/288	1	2,38	x	x	248/248	1	2,38	x	x
374/422	1	2,38	x	x	198/226	x	x	1	2,00	201/225	1	2,38	1	2,00	276/188	x	x	1	2,00					
376/376	1	2,38	x	x	198/230	x	x	1	2,00	201/229	2	4,76	1	2,00	276/284	x	x	1	2,00					
376/414	1	2,38	x	x	198/276	1	2,38	x	x	205/205	x	x	1	2,00	276/288	x	x	1	2,00					
376/436	x	x	1	2,00	202/202	x	x	1	2,00	205/207	1	2,38	1	2,00	284/296	x	x	1	2,00					
376/454	1	2,38	x	x	202/218	1	2,38	x	x	205/209	x	x	4	8,00	288/288	x	x	1	2,00					
378/450	x	x	2	4,00	202/222	x	x	1	2,00	205/213	1	2,38	2	4,00	288/292	x	x	1	2,00					
380/382	x	x	1	2,00	206/210	1	2,38	x	x	205/217	x	x	3	6,00	288/296	1	2,38	x	x					

