

CÍNTIA DE SOUZA CLEMENTINO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GALINHAS NATURALIZADAS NA
REGIÃO MEIO-NORTE DO BRASIL, COM USO DE MICROSSATÉLITES**

Teresina, Piauí

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CÍNTIA DE SOUZA CLEMENTINO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GALINHAS NATURALIZADAS NA
REGIÃO MEIO-NORTE DO BRASIL, COM USO DE MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Melhoramento Genético e Produção de Animais de Interesse Econômico

Orientador: Prof. Dr. Elivalto Guimarães Campelo/DZO/ CCA/UFPI

Coorientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz /Embrapa Meio-Norte

Teresina, Piauí

2010

*Dedico a meus pais Francisca Gonçalves de Souza
Clementino e Sérgio da Silva Clementino e meus
irmãos Edna, Sérgio Júnior e Fábio.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em todos os momentos foi a minha fortaleza;

A Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado em Ciência Animal;

A Embrapa Meio-Norte, por proporcionar um ambiente adequado e animais para o desenvolvimento das atividades de pesquisa;

A CAPES, pela concessão de bolsa, fundamental para continuidade dos meus estudos;

A minha amada família, que acreditou que meus sonhos se tornariam realidade;

A família em Cristo que ganhei em Teresina para que tivesse firmeza na caminhada;

A família “Residência Universitária” pelos momentos de consolo e descontração;

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia da Embrapa Meio-Norte que juntos compartilharam experiências fundamentais no dia-a-dia de pesquisa;

Ao meu Orientador e Co-orientador que direcionaram meu perfil profissional e acreditaram na concretização de mais esta etapa de vida acadêmica;

Finalmente a todas as pessoas que de algum modo contribuíram para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

*Dá instrução ao sábio e ele se fará mais sábio;
ensina ao justo e ele crescerá em entendimento.
O temor do Senhor é o princípio da sabedoria e
a ciência do Santo, a prudência.*

(Provérbios 9 ; 9-10)

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GALINHAS NATURALIZADAS NA REGIÃO MEIO-NORTE DO BRASIL, COM USO DE MICROSSATÉLITES

Autor: Cíntia de Souza Clementino
Orientador: Dr. Elivalto Guimarães Campelo
Coorientador: Dr. Fábio Mendonça Diniz

RESUMO

Galinhas naturalizadas distribuídas no Brasil são resultantes de acasalamentos aleatórios desde a colonização do país. Nesse processo adquiriram estrutura genética que lhes conferiu adaptabilidade às condições adversas de clima impostas pelo meio ambiente e pelo homem, ganhando rusticidade e capacidade de se estabelecer em todo país. Contudo, a expansão da avicultura industrial levou a diminuição de sua criação e a variabilidade genética ficou ameaçada, principalmente pela ocorrência de cruzamentos desordenados com galinhas industriais, que apresentam base genética estreita em decorrência do uso de consangüinidade na sua formação. A caracterização genética dessa populações naturalizadas pode fornecer dados preciosos a programas de conservação desses recursos genéticos, bem como conhecer o seu potencial produtivo. Os microssatélites, que são marcadores de DNA multialélicos, co-dominantes e de fácil manipulação, apresentam-se como ferramentas moleculares úteis para o estudo genético sendo, nesse trabalho, usados para caracterizar a variabilidade genética de quatro grupos de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte do Brasil. Nesse estudo, 15 *primers* de microssatélites, desenvolvidos para galinha doméstica, foram selecionados, submetidos a um processo de otimização, através de variações nas concentrações dos reagentes da PCR e nas temperaturas de anelamento e destes 10 marcadores foram considerados eficientes para o estudo. Após essa etapa esses marcadores foram utilizados para discriminação das populações, constatando que os quatro grupos genéticos de galinhas naturalizadas analisados apresentaram valores médios de H_E , H_O e PIC em torno de 0,84, 0,78 e 0,80, respectivamente, indicando a existência de alta variabilidade nessas populações. Baixo índice de endogamia, de subdivisão populacional e diferenciação foram também encontrados de acordo com o índice F . A AMOVA mostrou que a maior variação genética está dentro das populações amostradas havendo moderada estruturação entre elas.

Palavras-chave: galinha naturalizada, transferibilidade, microssatélite, variabilidade genética.

GENETIC CHARACTERIZATION OF NATURALIZED CHICKEN IN THE MID-NORTH REGION OF BRAZIL USING MICROSATELLITES

Author: Cíntia de Souza Clementino
Supervisor: Dr. Elivalto Guimarães Campelo
Co-supervisor: Dr. Fábio Mendonça Diniz

ABSTRACT

The naturalized chicken populations distributed in Brazil are a result of more than 500 years of random mating. During this process Brazilian chickens have probably acquired a genetic structure, which might have given them adaptability to adverse conditions imposed by the environment and anthropogenic activities, and the ability to establish themselves throughout the country. However, naturalized chicken farming has been considerably reduced due to the expansion of industrial aviculture. Matings with commercial chickens, which are birds with a narrow genetic base, is threatening their genetic variability. The genetic characterization of naturalized/native populations can provide accurate data on conservation programs aimed at avoiding the loss of this genetic resource. Among the methods available in the literature, the use of molecular markers for genetic characterization is worldwide recognized as a very effective tool. Microsatellite loci are the most promising molecular tool in genetic variability studies. These repetitive sequences are multiallelic, co-dominant and easy handling DNA markers and therefore useful for the genetic study of chicken populations. In this study fifteen microsatellite primers developed for domestic fowl, were selected and submitted to an optimization process and used to characterize the genetic variability of four groups of Mid-North region naturalized chickens. Ten markers were efficient for the study. The four naturalized chickens genetic groups analyzed showed H_E , H_O and PIC average values around 0.84, 0.78 and 0.80 respectively, revealing the existence of high variability in the populations. Low inbreeding, populational subdivision and differentiation rates were found according to the F index. The AMOVA showed that most genetic variation is within the sampled populations having moderate structuring between them.

Keywords: Naturalized chicken, transferability, microsatellite, genetic variability.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 – Galinhas naturalizadas com características das seguintes raças: a) Andalusian (espanhola, ornamental de ovos brancos); b) Buff Plymouth Rock (americana, mista de ovos marrons); c) Silver-Spangled Hamburgs (poedeira alemã, ornamental de ovos brancos); d) Australorp (australiana, corpo intermediário e ovos marrons); e) Columbian Wyandottes (americana, mista de ovos marrons); f) Assel (oriental e musculosa, ovos brancos e azuis); g) Partridge Plymouth Rock (americana, mista, de ovos marrons); e h) Brown Leghorn (inglesa, poedeira de ovos brancos), Teresina – Piauí, 2009.....	20
---	----

Capítulo I

Figura 1 – Gel de agarose 0,8% mostrando DNA de extrações de 15 amostras de tecido cutâneo de galinha naturalizada, Teresina-PI, 2009.	36
Figura 2 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida mostrando os dez marcadores microssatélites otimizados para galinha naturalizada, amostras 1 - 5. A seta em vermelho destaca a presença de <i>stutter</i> . M1: Marcador de peso 10pb; M2: Marcador de peso 50bp, Teresina – PI, 2009.	42

Capítulo II

Figura 1 - a) Grupo Teresina; b) Grupo Graúna Dourada; c) Grupo Nordeste; e d) Grupo Brejeira, Teresina – PI, 2009.	59
Figura 2 – Mapa de localização das amostras coletadas indicando o município onde cada amostra foi coletada, GRD (Graúna Dourada), BJR (Brejeira), THE (Teresina) e NDT (Nordestina), Teresina – PI, 2009.....	60
Figura 3 – Dendrograma mostrando o agrupamento das populações de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte, Teresina – PI, 2009.....	69

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 – Características dos <i>loci</i> de microssatélites selecionados e utilizados na genotipagem de galinhas naturalizadas, Teresina – PI, 2009.....	37
Tabela 2 – Condições de otimização dos <i>loci</i> de microssatélites utilizando a técnica de PCR para amplificação de DNA de galinhas naturalizadas, Teresina – PI, 2009.....	40
Tabela 3 – Programas utilizados para amplificação dos <i>loci</i> de microssatélites de DNA de galinhas naturalizadas, Teresina – PI, 2009.....	41
Tabela 4 – Dados referentes ao número e comprimento dos alelos amplificados, Teresina – PI, 2009.	43

Capítulo II

Tabela 1– Descrição dos <i>primers</i> e microssatélites utilizados no estudo da diversidade genética de galinhas naturalizadas, Teresina-PI, 2009.....	62
Tabela 2 - Diversidade genética dos dez <i>loci</i> de microssatélite para quatro populações de galinhas caipiras locais. N, número de indivíduos; N _A , número de alelos; H _O , heterozigosidade observada; H _E , heterozigosidade esperada; N _{AT} número total de alelos; A _R , riqueza alélica; F _{IS} , índice de fixação de subpopulações, em Teresina – PI, 2009.....	66
Tabela 3 - Diversidade genética geral das populações de galinhas locais. N, número de indivíduos; N _A , número de alelos; H _O , heterozidiosidade observada; H _E , heterozigosidade esperada; A _R , riqueza alélica; F _{IS} , índice de fixação de subpopulações; PIC, conteúdo de informação polimórfica; F _{IT} , índice de fixação da população total; F _{ST} , índice de fixação de subpopulações dentro da população total, em Teresina – PI, 2009.	68
Tabela 4 – Estatísticas da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 10 <i>loci</i> de microssatélites em populações de galinhas naturalizadas (G – Graúna Dourada; B – Brejeira; N – Nordestina; T – Teresina), Teresina, 2009.	69

APÊNDICE

Tabela 1 – Distribuição da frequência alélica em cada <i>loci</i> nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, em Teresina – PI, 2009.	88
--	----

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISAO DE LITERATURA.....	16
2.1 Origem da galinha doméstica.....	16
2.2 A galinha naturalizada no Brasil.....	17
2.3 Por que estudar a variabilidade genética das galinhas naturalizadas?.....	18
2.4 Caracterização genética de populações locais	22
2.5 Marcadores moleculares e o estudo genético de populações locais.....	23
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
3 CAPITULO I – Marcadores moleculares microssatélites para galinhas naturalizadas da Região Meio-Norte: amplificação cruzada e otimização.....	29
Resumo	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e métodos.....	34
Coleta das amostras.....	34
Extração de DNA genômico	34
Seleção dos <i>primers</i>	36
Condições de PCR.....	38
Eletroforese PAGE.....	38
Resultados.....	39
Discussão	43
Conclusão	48
Referências bibliográficas	48
4 CAPITULO II – Diversidade genética de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte do Brasil.....	51
Resumo	52
Summary.....	54
Introdução.....	56

Material e Métodos	58
<i>Amostragem.</i>	58
<i>Extração de DNA e amplificação de microssatélites.</i>	60
<i>Análise estatística.</i>	63
Resultados.....	64
Discussão	70
Conclusão	75
Referências Bibliográficas.....	75
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	83
APÊNDICE	87
ANEXOS.....	93

1 INTRODUÇÃO GERAL

A variabilidade genética em populações naturalizadas é de fundamental importância para a definição de estratégias de preservação e conservação de grupos genéticos com características únicas de adaptabilidade (Barbosa, 2006), que se encontra em risco de extinção, tanto animal como vegetal. Essas populações geralmente apresentam importância regional que, se submetidos a práticas de manejo adequadas, podem fornecer produtos de qualidade superior em termos agroecológico e socioeconômico (Sagrilo et al., 2002).

Nessa situação se encontram as galinhas naturalizadas no Nordeste do Brasil e os produtores familiares vêem na sua criação uma oportunidade de complementação de renda e melhoria da qualidade de vida (Sagrilo et al., 2002). Além disso, essas aves se apresentam como fonte de variabilidade genética, por terem sido submetidas a acasalamentos diversos desde sua introdução, com isso adquiriram certa adaptabilidade (Barbosa et al., 2007). Porém, outro aspecto relevante é que esses recursos genéticos carecem de estudos de caracterização para definição de programas de conservação.

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

É oportuno ressaltar também que essas tecnológicas preconizadas para a exploração de galinhas em escala industrial tornam os criadores dependentes de insumos externos à propriedade (Pires et al., 2002). Se por um lado o uso de linhagens especializadas responde às necessidades atuais do mercado, contribuindo para o aumento do fornecimento de proteína animal na mesa do brasileiro, por outro, a utilização dessas aves em substituição às galinhas naturalizadas (caipiras) pode resultar em prejuízos para os pequenos produtores, uma vez que essas aves melhoradas são altamente exigentes em termos de infra-estrutura e manejo, o que inviabiliza a produção em pequena escala.

Em programas de melhoramento animal, a informação quanto à diversidade e

divergência genética entre os grupos fenotípicos existentes é essencial para o uso dos recursos genéticos (Pinto et al., 2005; Sartório, 2008). Principalmente, devido ao fato de muitos caracteres de interesse econômico terem o seu modo de herança mais complexo, com a atuação de vários genes de pequeno efeito sobre o fenótipo (Pereira, 2004; Ramalho, 2008).

De acordo com Gama (2004), a variabilidade genética total das populações é representada pela contribuição das variabilidades inter e intra-racial o que justifica a importância de se medir a variabilidade genética dos animais, pois a conservação dos recursos genéticos está efetivamente relacionada à manutenção das variabilidades inter-racial (evita a extinção de raça) e intra-racial (evita a erosão genética).

Diversos métodos têm sido utilizados para medir a diversidade genética das populações locais. A utilização de dados morfológicos foi eficaz por muito tempo, entretanto, o baixo número de marcadores fenotípicos disponíveis, a falta de ligação com características de interesse econômico, a influência do ambiente e o efeito deletério das mutações limitaram sua utilização (Avisé, 2004).

Nesse aspecto os marcadores moleculares têm ganhado destaque em estudos genéticos, porém, a sua utilização tem variado conforme os objetivos da pesquisa. Os mais utilizados são os microssatélites, que é um marcador mútialélico, altamente reprodutível, polimórfico, de fácil manipulação em laboratório. São pequenas seqüências de DNA repetitivo, conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), encontradas no genoma de vários organismos, principalmente eucariotos. Esses seguimentos de DNA são compostos normalmente de repetições simples, di, tri, ou tetranucleotídicas, podendo ainda ser encontradas repetições de cinco ou seis nucleotídeos. Quando amplificadas via PCR, estas seqüências apresentam grande variação de comprimento ou de alelos entre os indivíduos (Ellegren, 2004).

O alto nível polimórfico, a estabilidade e a herança co-dominante (possibilidade de identificação de homozigotos e heterozigotos) dos microssatélites tornaram esse marcador altamente eficaz em estudos populacionais. Apesar de a técnica ser de fácil execução, sua maior limitação é a obtenção de '*primers*' específicos que flanqueiam as regiões de microssatélites (Regitano e Coutinho, 2001).

Assim, a caracterização genética de populações locais fornecerá informações valiosas a programas de melhoramento genético, contribuindo, portanto para o uso desses recursos pelos produtores. Além disto, as informações serão importantes para programas de conservação visando evitar a perda de genes ou erosão genética.

Considerando a importância da implementação de programas de conservação de recursos genéticos, sendo esses raros no Brasil, objetivou-se nessa pesquisa selecionar e otimizar marcadores moleculares microssatélites quanto a eficiência desses para o estudo da variabilidade genética de populações de galinhas naturalizadas na região Meio-Norte e avaliar a diversidade genética de quatro populações de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte do Brasil fazendo uso dos marcadores otimizados.

Seguindo as Normas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPI, esta Dissertação apresenta as partes: Introdução Geral, Revisão de Literatura, Capítulos I e II na forma de Artigo Científico, Considerações Finais e Referências Bibliográficas Geral. O Capítulo I: **Marcadores moleculares microssatélites para galinhas naturalizadas da Região Meio-Norte: amplificação cruzada e otimização**, será submetido à revista *Archivos de Zootecnia*. (ISSN Print 0004 – 0592 ISSN, Online 1885 – 4494). O capítulo II: **Diversidade genética de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte do Brasil** será submetido à revista *Animal Genetic Resource Information - AGRI* (ISSN: 1014-2339, ISSN: 2076-4022). Ambos estão estruturalmente compostos por: Título, Autores, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas, redigidos segundo as Normas dessas revistas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem da galinha doméstica

As galinhas domésticas pertencem ao gênero *Gallus* e são originárias da Ásia. Provavelmente as que são conhecidas hoje descendem da mesma espécie denominada galinha vermelha do mato de Bankiva (*Gallus bankiva*), ave selvagem ainda encontrada nas selvas do Sudoeste Asiático (PICOLI, 2004). Outras espécies como a galinha de Java (*Gallus varius*), do Ceilão (*Gallus lafayetti*) e a galinha de Sonnerat (*Galus sonnerati*) também contribuíram para o desenvolvimento da galinha moderna - *Gallus gallus* (Nishibori, et al., 2005; Rodrigues et al., 2006).

Evidências da domesticação das galinhas no período Neolítico foram encontradas em sítios arqueológicos na China e acredita-se que a domesticação foi relacionada a aspectos religiosos, lazer e ainda com confecção de adornos (Fumihito et al., 1994). A facilidade de reprodução em cativeiro, dispensando condições especiais ou fatores ambientais específicos e a existência de uma “ordem social” entre as galinhas que permite a manutenção de um grande número de aves num mesmo local, foram os principais fatores que contribuíram para a domesticação dessas aves (Arenales & Rossi, 2001).

Com a domesticação a galinha acompanhou a migração humana, não se fixando em apenas um continente. Principalmente durante as grandes colonizações ela pode se difundir, favorecida pelas rotas comerciais e militares. Por outro lado, o isolamento geográfico, deriva genética, mutações, seleção natural e artificial, contribuíram para a formação de muitas raças nos diferentes continentes (Picoli, 2004).

Em países da Ásia, como o Japão, uma forte tradição cultural pode ser observada na criação dessas aves. Existem raças que atualmente fazem parte do Tesouro Nacional Japonês e estão sob a proteção do governo, denominadas raças ornamentais japonesas tradicionais. Outras raças como as de galo de combate (raças esportivas), por muito tempo faziam parte de competições servindo como opção de lazer (Todano et al., 2009). Na Europa essas aves também foram inicialmente criadas para fins de diversão e posteriormente como alimento (Rodrigues et al., 2006). Na África a galinha doméstica era criada para subsistência humana fato que ainda hoje pode ser observado nesse continente (Almeida & Cardoso, 2001). Já nos países ocidentais como o Brasil, a

galinha doméstica foi introduzida por ocasião da colonização (Wimmers et al., 2000; Rodrigues et al., 2006). Portanto, a galinha doméstica tem uma única origem, mas a migração humana possibilitou se espalhar nos continentes em diferentes contextos histórico e cultural, mas com objetivos específicos de criação.

Assim as galinhas eram criadas em pequenas escala, entretanto, a necessidade crescente de alimento de origem animal no pós-guerra impulsionou avicultura industrial, principalmente no ocidente, deixando a produção de aves naturalizadas obsoleta. A partir desse momento a ação do homem foi mais marcante na alteração da constituição genética da galinha doméstica, sendo que a atividade avícola em escala industrial foi favorecida pelo desenvolvimento de híbridos de linhagens consangüíneas, que são altamente produtivos, porém apresentam base genética estreita. Essas aves são mais frágeis e pouco adaptadas a restrição alimentar, manejo e infra-estrutura inadequados, logo indicados para sistemas de produção com alta tecnologia.

Além dos híbridos, algumas linhagens comerciais ganharam espaço em sistema de criação com alta tecnologia e foram disseminadas entre criadores de animais naturalizados. Com isso em alguns países observa-se redução na variabilidade genética de populações locais, em decorrência de cruzamentos com essas aves melhoradas (Wimmers et al., 2000; Nasiri et al., 2007). Entretanto, merece destaque a contribuição das linhagens comerciais para a produção de proteína animal destinada ao consumo humano que, trabalhada em grande escala reduz o custo de produção (Freitas, 2002; Oliveira et al., 2008), porém, atenção deve ser dada a perda dos recursos genéticos das populações e raças de galinhas locais.

2.2 A galinha naturalizada no Brasil

A galinha doméstica teve sua introdução no Brasil em 1500, época do descobrimento. De acordo com a carta histórica escrita por Pero Vaz de Caminha ao rei de Portugal Dom Manuel, de 22 de abril de 1500, foi de espanto e admiração a reação dos índios ao terem contato com os primeiros exemplares de galinhas trazidas ao Brasil (Picoli, 2004). Entretanto, é provável que os corsários franceses muito antes do descobrimento também tenham trazidas galinhas, quando abasteciam seus navios com pau-brasil e animais silvestres e os trocavam por espelhos, pentes, ferramentas e galinhas que sobravam de suas despensas (Mesquita, 1970).

Após a colonização outras raças também foram trazidas ao Brasil, de origem mediterrânea e asiática e cruzadas com as já existentes, formando assim a galinha “caipira” ou “crioula”. Essas aves expandiram seu contingente populacional por todo território brasileiro. Em algumas regiões aves com características peculiares foram agrupadas e descritas como raça brasileira, tais como: a galinha de *Macaé*, *Cabu e Carioca* no estado do Rio de Janeiro e o *Galo-galinha* em Santa Catarina (Gessuli, 1999). Picoli (2004) menciona que encontrou documentos históricos do início do século XX, que notifica outra variedade de galinha, que também poderia ser considerada tipicamente caipira, conhecida como *Cattete*, de pequeno porte, penas lisas, pernas nuas, quatro dedos, crista baixa, cabeça pequena e cauda fina.

No final do século XIX a importação de aves originárias dos continentes Americano, Europeu e Asiático atraiu a atenção dos produtores brasileiros. Essas aves chamavam a atenção pela beleza, coloração e quantidade de penas, formatos da crista e barbelas. A partir de então o interesse dos produtores pelas aves naturalizadas diminuiu e a produção em escala industrial começou a ser vista e desenvolvida no Brasil, tomando grande impulso no início do século XX (Freitas et al., 2002).

Em meados do século XX vários fatores contribuíram para que a avicultura industrial se expandisse, tais como: a expansão da produção de grãos e uso na alimentação de aves, rigoroso manejo sanitário na atividade, infra-estrutura sofisticada e o uso de linhagens com genética consanguínea altamente produtiva. Entretanto, essas vantagens concentram-se inicialmente nas regiões mais desenvolvidas do país, sul e sudeste, chegando posteriormente nas demais regiões. Com isso, a produção de galinhas caipiras diminuiu drasticamente no país e passou a ser praticada apenas por pequenos agricultores e nos quintais de periferias urbanas, principalmente nas regiões mais pobres do país. Dessa forma, ocorreu a marginalização da produção tradicional que, segundo Gessuli (1999), mesmo com a persistência de alguns criadores, principalmente os que se dedicavam à criação de galos de combate, as galinhas naturalizadas atingiram alto risco de extinção.

2.3 Por que estudar a variabilidade genética das galinhas naturalizadas?

As galinhas naturalizadas ainda podem guardar características fenotípicas e genotípicas das aves que foram introduzidas no Brasil por ocasião do descobrimento, conseqüentemente, é uma fonte de variabilidade importante para programas de

melhoramento genético. Em algumas regiões do país, grupos genéticos foram formados por acasalamentos de aves sem padrão racial definido e as aves anteriormente identificadas perderam as suas características originárias, porém mantendo em alguns casos apenas a plumagem (Figura 1) (Barbosa, 2006).

No entanto, independente do porte e da aptidão zootécnica desses animais, eles adquiriram ao longo do tempo, adaptabilidade a condições de baixa tecnologia favorecida pela capacidade de ingestão de alimentos fibrosos, que as possibilitaram resistirem a muitos fatores adversos do ambiente (Sagrilo et al., 2002; Barbosa et al., 2005). Atualmente essas aves são consideradas alimento nobre em todas as regiões do país, uma vez que a cor, textura, odor e sabor da carne, aliadas a ovos com características organolépticas específicas, são elementos que as diferenciam de outras raças disponíveis no mercado (Barbosa, 2006).

A introdução de aves geneticamente melhoradas no sistema tradicional de criação tende a contribuir para que esse material genético desapareça, pois estão sendo acasaladas com as naturalizadas sem nenhum critério de preservação. Um resultado já evidente desse processo de erosão genética é a formação de uma ave mestiça, que se mostra aparentemente produtiva, mas com as exigências da galinha industrial tanto em termos de manejo, instalações e alimentação, porém sem as características positivas da galinha naturalizada em termos de rusticidade (Barbosa, 2006).

Programas mundiais de conservação de recursos genéticos têm sido propostos com objetivo de reduzir a perda da variabilidade genética das populações locais, sendo o primeiro passo na tentativa de êxito, a caracterização genética das populações (Sahai & Viji, 2000). Os trabalhos de caracterização fornecem informações sobre a diversidade genética das populações locais e, uma vez de posse dessas informações, programas de conservação são direcionados para reduzir a perda da variabilidade. Posteriormente, programas de melhoramento sustentáveis poderão ser conduzidos de forma a evitar os prejuízos que poderiam ser causados diretos ou indiretamente como consequência da erosão genética.

No Nordeste já existe interesse em definir estratégias de conservação de raças de animais naturalizados que se encontram em risco desconhecido de extinção, já sendo realidade programas de conservação de pequenos e grandes ruminantes como os bovinos da raça Pé-duro; os caprinos das raças Marota, Canindé e Azul; ovinos deslanados da raça Morada Nova; equinos estabelecidos na Baixada Maranhense e os suínos Piau, Moura e Tatu (Egito et al., 2002).

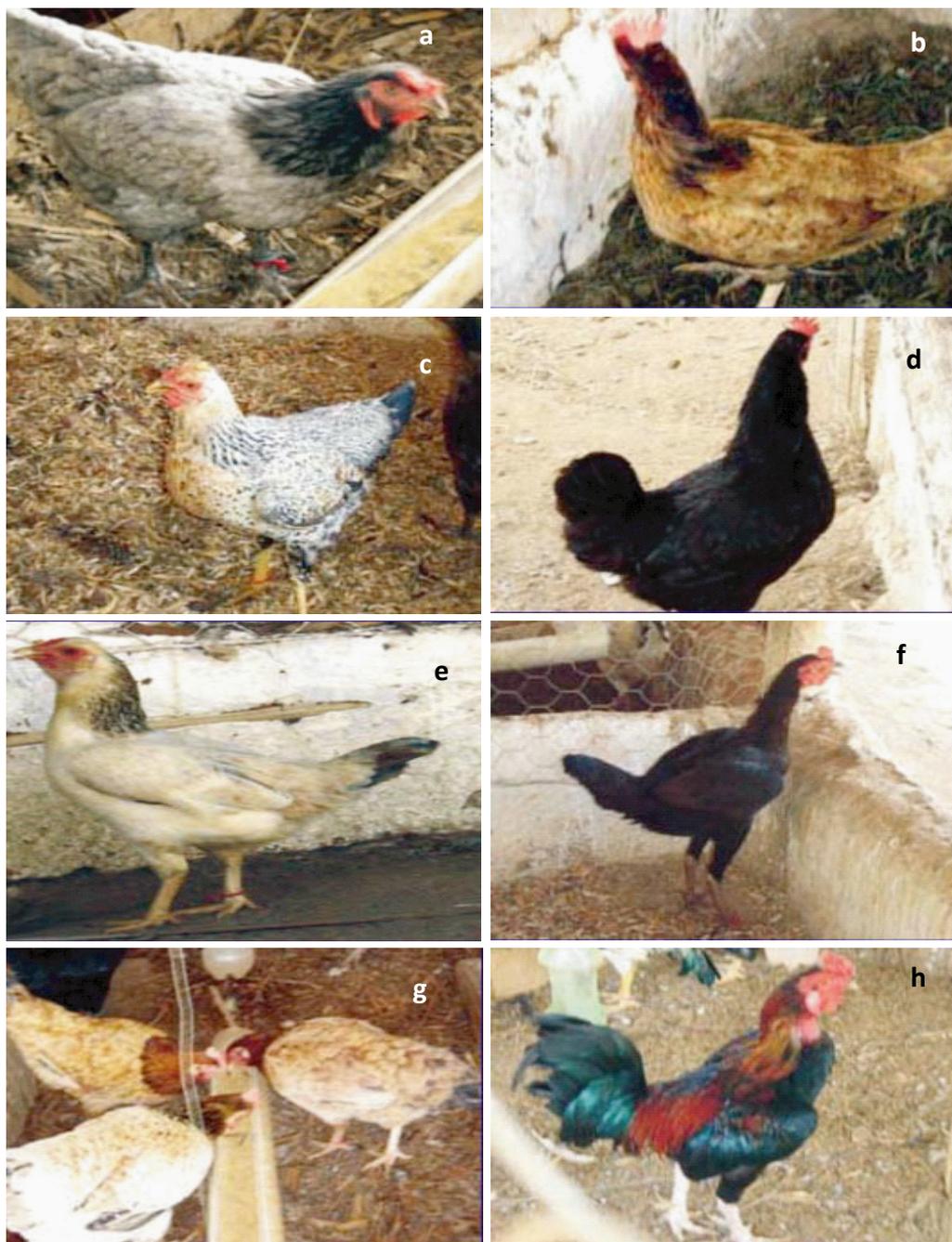


Figura 1 – Galinhas naturalizadas da região Meio Norte, com características das raças: a) Andalusian (espanhola, ornamental de ovos brancos); b) Buff Plymouth Rock (americana, mista de ovos marrons); c) Silver-Spangled Hamburgs (poedeira alemã, ornamental de ovos brancos); d) Australorp (australiana, corpo intermediário e ovos marrons); e) Columbian Wyandottes (americana, mista de ovos marrons); f) Assel (oriental e musculosa, ovos brancos e azuis); g) Partridge Plymouth Rock (americana, mista, de ovos marrons); e h) Brown Leghorn (inglesa, poedeira de ovos brancos), Teresina – Piauí, 2009.

Na mesma situação de risco desconhecido de extinção estão as galinhas naturalizadas da região, mesmo possuindo um mercado promissor e específico, pois essas aves ditas caipiras podem responder de forma compensatória, quando submetidas a práticas de manejo apropriado, especialmente se o interesse for produtos certificados como natural, inclusive para atender demandas externas (Barbosa et al., 2005).

Dessa forma, identificar a variabilidade genética das populações locais é fundamental para estudos genéticos visando a conservação dessas raças, que pode ser visto com uma garantia de que no futuro elas não estarão extintas e a caracterização genética o passo inicial nesse processo. Além disso, a seleção de indivíduos mais resistentes às intempéries climáticas e a doenças, que sejam mais produtivos e capazes de transmitir características desejáveis aos seus descendentes, é uma forma de manter viva a tradição de criar aves naturalizadas, mais especificamente tradição nordestina.

Em várias localidades do Nordeste observa-se baixo índice de desenvolvimento humano, principalmente em núcleos agrícola familiar que, tradicionalmente, guardam costumes de criar animais naturalizados de uma forma muito afetiva, não oferecendo condições necessárias para que possam expressar o seu potencial produtivo e dessa forma, gerar complementação de renda (Sagrilo et al. 2002).

Assim, os pesquisadores precisam repensar o modelo de desenvolvimento a ser proposto, devendo ter por base tecnologias simples e de fácil assimilação. Nesse contexto, a criação racional de animais naturalizados se enquadra perfeitamente nesse prisma de desenvolvimento, uma vez que todo processo de criação busca aproveitar os recursos naturais sem provocar danos à natureza e agregando valor à produção.

Dentro de estudos genéticos, a galinha tem dado sua contribuição muito antes da descoberta dos processos moleculares da hereditariedade. Os trabalhos de Willian Baterson sobre o modo de herança da crista em galinhas, mostram que as aves tem sido uma parte consistente do panorama da investigação genética (Fulton & Delany, 2003; Siegel et al., 2006). E como modelo animal, tem sido fundamental na produção de quimeras para estudo e entendimento de doenças humanas hereditárias, tais como a fissura palatina (Fulton & Delany, 2003). Na produção de alimentos, é a terceira carne mais consumida no mundo, perdendo apenas para as carnes suínas e bovinas (Oliveira et al., 2008). Surto de doenças também têm deixado produtores e pesquisadores em estado de alerta e preocupados com a manutenção da variabilidade das populações locais. Um dos casos mais alarmantes foi o da gripe aviária que, no ano de 2005, em consequência das aves infectadas e o risco do contágio humano optou-se como medida

de prevenção pelo abate de cerca de 80 milhões de aves (Paduan, 2005).

2.4 Caracterização genética de populações locais

O processo de domesticação iniciado há mais de 12.000 anos possibilitou a utilização dos animais para diversos fins de interesse humano. A produção de alimentos foi uma das atividades que mais se desenvolveu graças a rigorosos programas de manejo e melhoramento genético animal que, por conseguinte pôs em risco a diversidade genética das populações (Sahai & Vij, 2000).

Os animais domésticos se disseminaram em vários continentes como resultado da migração humana. Sobre cada grupo fixado em ambientes diferentes daqueles de origem, atuaram uma variedade de forças evolutivas. Eventos como efeito fundador, deriva genética e seleção sob a ação humana, aos poucos moldaram a estrutura genética das populações em formação (Berthouly et al., 2008).

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

Em 2004, a FAO estimou que a variabilidade genética animal era representada por 6.300 raças domésticas. Em primeira vista parece uma estatística boa, contudo, mesmo diante da quantidade atualmente existente, o número de raças que vêm sendo extintas é notadamente preocupante. De acordo com a FAO (2000) estima-se que a cada semana uma ou duas raças estejam sendo perdidas, comprometendo o acesso aos seus genes e combinações que podem ser únicas.

Vários fatores têm contribuído para a situação de risco de extinção que muitas raças locais se encontram atualmente e, provavelmente o mais importante foi a intensificação da agropecuária a partir da Segunda Guerra Mundial. Esta intensificação teve papel importante, pois ao se buscar resposta à necessidade crescente de alimentos em nível mundial, foi preciso alterar as práticas agrícolas tradicionais que colocou em risco os recursos genéticos animais (Scherf, 1995). Sistemas de criação e programas de melhoramento tiveram grande expansão, resultando em uma produção relativamente

uniforme, que se assenta numa base genética estreita e com elevada exigência em infra-estrutura (Gama, 2006).

Esses fatores contribuíram para que ocorresse diminuição da variabilidade genética nas espécies domésticas atuais, porém, com situação mais preocupante nos países em desenvolvimento, onde as mudanças nos sistemas de produção levaram a substituição ou absorção das raças nativas, por cruzamentos com animais melhorados.

2.5 Marcadores moleculares e o estudo genético de populações locais

O desenvolvimento de novas tecnologias tem permitido o acesso direto à informação genética em nível de DNA, por meio da utilização de marcadores moleculares. Essas ferramentas tem sido úteis em diversas áreas da pesquisa genética como genética forense, mapeamento genético, filogenia, mostrando-se também altamente eficazes nos estudos da variabilidade genética de recursos genéticos animais (Ellegren, 2004).

Relatos da importância da utilização desses marcadores em estudos genéticos asseguram que a avaliação genética baseada apenas em características fenotípicas é dificultada, devido a influência de uma série de fatores externos (Beja-Pereira et al., 2003; Vasconcellos et al., 2003).

Os primeiros marcadores moleculares a serem utilizados em estudos genéticos foram as isoenzimas, que tinham como base o polimorfismo de proteínas e por muito tempo foram úteis para calcular a distância genética e diferenciação entre raças nativas. Contudo, o polimorfismo revelado por estes marcadores era resultado da expressão de genes funcionais, mostrando assim um baixo conteúdo de informação polimórfica, com risco de subestimar a variabilidade genética dessas populações (Avisé, 2004; Mariante & Cavalcante, 2006).

Após a descoberta das enzimas de restrições, foi possível acessar a informação genética diretamente a partir do DNA por uma técnica denominada polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*). As enzimas utilizadas nessa técnica são capazes de cortar a molécula de DNA em sítios específicos (Regitano & Coutinho, 2001). A perda ou surgimento de sítios de restrição caracterizam o polimorfismo. Embora seja uma técnica bastante eficaz, principalmente por ser um marcador co-dominante, na caracterização de

indivíduos geneticamente diferente e no mapeamento genético e comparativo, o seu elevado custo e complexidade têm dificultado sua utilização em estudos populacionais.

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

A utilização desses marcadores tem variado conforme os objetivos de pesquisa. Em estudos populacionais, os RAPDs e os microssatélites têm sido preferidos. A técnica de RAPD utiliza ‘*primer*’ único que tem seqüência arbitrária, é um marcador dominante de custo reduzido, fácil aplicação e largamente utilizado no estudo genético de diversas raças domésticas (Mariante & Cavalcante, 2006). Entretanto, sua utilização tem diminuído em função da baixa reprodutibilidade, baixo conteúdo de informação por loco e devido a falta de conhecimento sobre a base genética das bandas de RAPD (Avisé, 2004; Borém & Caixeta, 2006).

Os microssatélites, por sua vez, são pequenas seqüências de DNA repetitivo, conhecidos como SSR (*Simple Sequence Repeats*), encontradas no genoma de vários organismos, principalmente eucariotos. Esses segmentos de DNA são compostos normalmente de repetições simples, di, tri, ou tetranucleotídicas, podendo ainda ser encontradas repetições de cinco ou seis nucleotídeos. Quando amplificadas via PCR, estas seqüências apresentam grande variação de comprimento ou de alelos entre os indivíduos. A principal causa do polimorfismo encontrado é consequência do deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante o processo de replicação (Ellegren, 2004).

O alto nível polimórfico, a estabilidade e a herança co-dominante (possibilidade de identificação de homozigotos e heterozigotos) dos microssatélites tornaram esse marcador altamente eficaz em estudos populacionais. Apesar de a técnica ser de fácil execução, sua maior limitação é a obtenção de ‘*primers*’ específicos que flanqueiam as regiões de microssatélites. Esta etapa requer a construção de bibliotecas genômicas enriquecida com os microssatélites de interesse, metodologias eficientes para o

screening das bibliotecas e seqüenciamento de DNA em larga escala, necessitando de laboratórios com infra-estrutura especializada (Regitano & Coutinho, 2001).

Mesmo diante das limitações citadas, a utilidade de microssatélites em estudos genéticos é inquestionável. São úteis no mapeamento genético, na identificação de similaridades entre raças, e ainda fornecem informações sobre relações evolutivas e padrões de migração entre espécies relacionadas (Borém & Caixeta, 2006). Assim, um número relativamente grande de espécies domésticas já possui seus genomas mapeados com uso de microssatélites (Mariante & Cavalcante, 2006).

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

No Brasil, a utilização de microssatélites para estudos de caracterização de populações locais em risco de extinção foi iniciada com algumas espécies e raças em núcleos de conservação da Embrapa Recursos Genéticas e Biotecnologia. Como resultado desses estudos parte das raças de animais domésticos de interesse econômico introduzidas no Brasil na época do descobrimento já foi caracterizada: o bovino Pé-Duro, os ovinos Morada Nova, caprinos Moxotó (Mariante & Cavalcante, 2006). Contudo, ainda existem populações de animais locais de interesse econômico que carecem de estudos de caracterização, como é o caso das galinhas naturalizadas.

Assim, os marcadores moleculares, principalmente os microssatélites despontaram no cenário mundial como uma das ferramentas mais importantes nos estudos de caracterização genética, uma vez que, os dados gerados a partir deles poderão junto com informações fenotípicas, fornecer diretrizes para programas de conservação e programas de melhoramento genético.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.M. & CARDOSO, L.G.A. A avicultura africana – limitações e perspectivas de desenvolvimento. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96: p. 114-123, 2001.
- ARENALES, M. C. & ROSSI, F. **Criação orgânica de frangos de corte e aves de postura**. Viçosa, MG, CPT, 2001.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history**. 2nd ed. Sinauer, 2004, 684p.
- BARBOSA, F.J.V.; ARAUJO NETO, R.B.; RIBEIRO, V.Q.; et al.. Características de carcaça e composição corporal de frangos naturalizados submetidos a sistema alternativo de criação. In: VI SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ, 2005, **Anais...** Teresina, PI. VI Simpósio de Produção Científica da UESPI. Teresina, PI: UESPI, 2005. p. 214-214.
- BARBOSA, F.J.V. **Eram caipiras, agora são naturalizadas**. Sapiência. 2006. FAPEPI. n°. 9, Ano III. Teresina: 2006 (Informativo Científico). Disponível em: <<http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia9/artigos1.php>> Acesso em: 20 abril 2009.
- BARBOSA, F.J.V.; NASCIMENTO, M.P.S.C.B.; DINIZ, F.M.; et al. **Sistema Alternativo de Criação de Galinhas Caipiras**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007 (Sistema de Produção).
- BEJA-PEREIRA, A.; ALEXANDRINO, P.; BESSA, I. et al.. Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 4: p. 243-250, 2003.
- BERTHOULY, C.; BED'HOM, B.; TIXIER-BOOICHARD, M.; 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.
- BOSCHIERO, C.; CAMPOS, L.R.C.; AMBO, M. et al. Associações entre marcadores microssatélites do cromossomo 13 e características de desempenho, carcaça e órgãos em galinhas. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE AVICULTURA, 20. **Memórias...** Porto Alegre, RS, p.255-257. 2007.
- BORÉM, A. & CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa, MG: UFV, 2006.
- EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51: p. 39-52, 2002.
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature**, v. 5: p. 438-445, 2004.
- FAO. **Guidelines for Development of National Management of Farm Animal Genetic Resources Plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers**, Rome, Italy. 2004, 58 p.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **World watch list for domestic animal diversity**. 3.ed. Rome, 2000. 744p. Editado por B. D. Scherf.

- FREITAS, L.A.R.; BERTOGLIO, O.; NUNES, O.M. A tecnologia na avicultura industrial brasileira. In: XXII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2002, Curitiba, **Anais...** Curitiba, 2002
- FULTON, J.N.; DELANY, M.E. Poultry genetic resources – operation rescue needed. **Science**, v. 300: p. 1667-1668, 2003.
- FUMIHITO, A; MYIATE, T; SUMI, S.I.; TAKADA, M.; OHN, S. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91: p. 12505-12509, 1994.
- GAMA, L.T. Manutenção da variabilidade genética em programas de seleção. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS (RAÇAS NATIVAS PARA O SEMI-ÁRIDO), 2004, Recife. **Anais...** Recife: 2004. p. 38-44.
- GAMA, L.T. Programas de seleção e conservação dos Recursos genéticos animais: a experiência da Europa Mediterrânea. In: SIMPÓSIOS DA 43ª REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 2006, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, 2006. p. 755-773.
- 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.
- LEDUR, M.C.; NONES, K.; MOURA, A.S.A.M.T. et al. Uso de marcadores moleculares na produção de aves. In: Bridi, A.M., Fonseca, N.A.N., Silva, C.A., Pinheiro, J. W. Zootec 2007 - **A zootecnia frente a novos desafios**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. p. 457-482, 2007.
- MARIANTE, A.S. & CAVALCANTE, N. **Animals of the Discovery: domestic breeds in the history of Brazil**, 2ª Ed. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2006. 274 p.
- MESQUITA, M.B. Subsídios para a história da avicultura no Brasil. **Avicultura Industrial, Chácaras e Quintais**, n.61, p. 726-729, 1970.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**, v. 262: p. 36-42, 1990.
- NASIRI, B.M.T.; SHOKRI, F.; KHANIAN, S.E.; TAVAKOLI, S. Study on polymorphism of Island native chicken population using microsatellites markers. **International Journal Poultry Science**, v. 6, n. 11: p. 835-837, 2007.
- NISHIBORI, M.; SHIMOGIRI, T.; HAYASHI, T.; YASUE, H. Molecular evidence for hybridization of species in the genus *Gallus* except for *Gallus varius*. **Animal Genetics**, v. 36: p. 367-375, 2005.
- OLIVEIRA, A.A.P.; NOGUEIRA FILHO, A.; EVANGELISTA, F.R.; **A avicultura industrial no Nordeste: aspectos econômicos**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2008. 158 p. (Série Documentos do ETENE, n. 23).
- PADUAN, R. 800 bilhões de dólares: De acordo com o Banco Mundial, essa é a estimativa de prejuízos que uma pandemia de gripe aviária pode causar à economia global. 2005. **Revista Exame**. Disponível em: <http://portalexame.abril.com.br/revista/exame/edicoes/0855/internacional/m0078574.html>. Acesso em 04 fev. 2010.

- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004. 609p.
- PICOLI, K.P. **Avaliação de sistemas de produção de frangos de corte no pasto**. Florianópolis: UFSC, 2004. 74f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.
- PINTO, L.F.B.; ALMEIDA, F.Q.; QUIRINO, C.R. et al. Análise multivariada das medidas morfométricas de potros da raça Mangalarga Marchador: análise de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 34, n. 2: p. 589-599, 2005.
- PIRES, A.V.; CARNEIRO, P.L.S.; TORRES FILHO, R.A. et al. Estudo da divergência genética entre seis linhagens de frangos Legorn utilizando técnicas de análise multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3: p. 314-319, 2002.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 2008. 464p.
- REGITANO, L.C.A. & COUTINHO, L.L.; **Biologia molecular aplicada à produção animal**. EMBRAPA-INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2001. 215 p.
- RODRIGUES, F.P.; QUIROZ, S.A.; DUARTE, J.M.B. Genetics relatedness among wild, domestic and brazilian fighting roosters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2: p. 83-87, 2006.
- SAGRILO, E.; RAMOS, G.M.; GIRÃO, E.S. et al. **Agricultura Familiar**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 74p. (Boletim técnico - Embrapa)
- SAHAI R. & VIJH, R. K. **Domestic animal diversity - conservation & sustainable development**. Karnal: SI Publications, 2000, 355 p.
- SARTÓRIO, S.D. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários utilizando o software R. 2008**. 131f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Estatística e Experimentação Agrônômica, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from chicken genetics to the chicken genome. **Poultry Science**, v. 85: p. 2050–2060, 2006.
- SCHERF, B.D. **World Watch List for Domestic Animal Diversity**. 2nd, 769 p., 1995. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
- TODANO, R.; NISHIBORI, M.; TSUDZUKI, M. Genetic structure and differentiation of Japanese extremely long-tailed chicken breed (Onagadori), associated with plumage colour variation: suggestions for its management and conservation. **Animal Genetics**, v. 40: p. 989-992, 2009.
- VASCONCELLOS, L.P.M.K.; TAMBASCO-TALHARI, D.; PEREIRA, A.P. et al. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26: p. 133-137, 2003.
- WIMMERS, K.; PONSKSILI, S.; VALLE-ZARATE, A. et al. Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. **Animal Genetics**, v. 31: p. 159-165, 2000.

3 CAPÍTULO I – Marcadores moleculares microssatélites para galinhas naturalizadas da Região Meio-Norte: amplificação cruzada e otimização.

1 **Marcadores moleculares microssatélites para galinhas naturalizadas da Região**
2 **Meio-Norte: amplificação cruzada e otimização**

3
4 **Cintia de Souza Clementino¹, Adriana Márcia Ferreira de Carvalho², Ricardo**
5 **Azevedo do Rêgo Costa Filho¹, Geice Ribeiro da Silva¹, Firmino José Vieira**
6 **Barbosa^{2,3}, Elivalto Guimarães Campelo¹, Fábio Barros Britto^{3,4}, Fábio Mendonça**
7 **Diniz^{3*}**

8 **Resumo**

9 A utilização de marcadores microssatélites em táxons relacionados para estudar a
10 variabilidade genética de populações naturais tem sido uma estratégia eficaz na redução
11 do tempo e custo com o desenvolvimento de novos marcadores para a espécie a ser
12 pesquisada. Contudo, a eficiência desses marcadores decresce com o aumento da
13 distância genética entre as espécies e erros de genotipagem podem existir, em virtude do
14 aparecimento de alelos nulos, alelos *dropout* e bandas *stutter*. Esses problemas podem
15 ser minimizados ou evitados através de um rigoroso processo de escolha e otimização
16 de *primers* heterólogos. Nesse trabalho 15 *primers* de microssatélites desenvolvidos
17 para galinha doméstica foram selecionados e testados, de acordo com tipo de repetição e
18 grau de polimorfismo. Em seguida foram submetidos a PCR. Aqueles que apresentaram
19 problemas durante a amplificação foram otimizados, através de variações nas
20 concentrações dos reagentes da PCR e nas temperaturas de anelamento dos *primers*.
21 Dentre estes, dez marcadores mostraram-se eficientes na amplificação do DNA, com
22 evidente presença de polimorfismo cujo número de alelos amplificados variou de três a
23 sete, mostrando assim, serem úteis para estudar a variabilidade de populações de
24 galinhas naturalizadas na região Meio-Norte.

25

26 **Palavras-chave:** microssatélites, galinhas naturalizadas, tetranucleotídeos, erros de
27 genotipagem

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Campus Agrícola da Socopo, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

² Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual do Piauí, Campus Pirajá, CEP 64002-150, Teresina-PI, Brasil.

³ EMBRAPA Meio-Norte, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brasil.* *E-mail:* fmd1@cpamn.embrapa.br

⁴ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Campus Cinobelina Elvas, BR 125 Km 3, Planalto Cibrazem, Bom Jesus, PI 64900-000, Brasil.

28 **Molecular markers for naturalized chicken populations across the Mid - North**
29 **Region of Brazil: cross-species amplification and optimization**

30
31 **Cintia de Souza Clementino¹, Adriana Márcia Ferreira de Carvalho², Ricardo**
32 **Azevedo do Rêgo Costa Filho¹, Geice Ribeiro da Silva¹, Firmino José Vieira**
33 **Barbosa^{2,3}, Elivalto Guimarães Campelo¹, Fábio Barros Britto^{3,4}, Fábio Mendonça**
34 **Diniz^{3*}**

35 **Abstract**

36 The use of species-specific molecular markers to related taxa to study the genetic
37 variability of natural populations has been an effective strategy of reducing time and
38 costs in the development of new markers for the studied species. However, the
39 efficiency of these markers decreases with an increasing in the genetic distance between
40 species. Moreover, genotyping errors may start occurring due to the presence of null
41 alleles, allele dropouts and stutter bands. These problems can be minimized or avoided
42 through a rigorous process of selection and optimization of these heterologous primers.
43 In this study 15 microsatellite primers developed for commercial domestic chicken were
44 selected according to repeat motif and degree of polymorphism, and then optimized via
45 PCR. Microsatellite primers with amplification problems were optimized by varying
46 PCR reagent concentrations and annealing temperatures. Among all tested microsatellite
47 primers, ten markers were efficient for the amplification of naturalized chicken DNA,
48 showing significant levels of polymorphism, with allele number varying from three to
49 seven, which shows their feasibility to study the genetic diversity of naturalized chicken
50 populations in the Mid-North region of Brazil.

51

52 **Keywords:** microsatellites, naturalized chicken, tetranucleotides, genotyping errors.

53

¹ Department of Animal Sciences, Federal University of Piauí, Campus Agrícola da Socopo, 64049-550, Teresina, PI, Brazil.

² Department of Animal Sciences, State University of Piauí, Pirajá, CEP 64002-150, Teresina-PI, Brazil.

³ EMBRAPA Meio-Norte, CP: 01, CEP: 64.006-220, Teresina, PI, Brazil. E-mail: fmd1@cpamn.embrapa.br.

⁴ Department of Animal Sciences, Federal University of Piauí, Campus Cinobelina Elvas, BR 125 Km 3, Planalto Cibrazem, Bom Jesus, PI 64900-000, Brazil.

54 **Introdução**

55

56 O desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares em estudos genéticos
57 tem sido uma das práticas da biotecnologia que mais se desenvolveu nas últimas
58 décadas. Entre os marcadores mais utilizados, poucos ou nenhum encontraram tamanha
59 distribuição e amplo espectro de uso como os microssatélites de DNA.

60 Os microssatélites ou SSRs (*Simple Sequence Repeats*) são regiões do DNA que
61 apresentam sequências simples repetidas lado a lado, que podem apresentar de duas a
62 seis bases em sua estrutura. O SSR possui vantagens por ser um marcador mutialélico,
63 altamente reprodutível e co-dominante, ou seja, permite a distinção entre indivíduos
64 homozigotos e heterozigotos em uma população segregante. Podem estar presentes
65 tanto em regiões codificadoras como em não codificadoras, sendo encontrados em
66 organismos eucariontes e procariontes, nestes últimos em menor número (Zane et al.,
67 2002). O polimorfismo gerado por mutações, principalmente pelo deslizamento da DNA
68 polimerase durante o processo de replicação, quando não corrigidas pelas enzimas de
69 reparo, forma a base da variação genética dos microssatélites entre os organismos
70 (Ellegren, 2004). Essa variação natural tem tornado os microssatélites úteis para
71 mapeamento genético, estudos de instabilidade genômica do câncer, genética forense,
72 genética de populações e conservação biológica (Ambary et al., 2002; Hillel et al.,
73 2003; Shinde et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Gholizadeh & Mianji, 2007).

74 Na avicultura, o desenvolvimento de marcadores moleculares tem ganhado
75 destaque em função do notável crescimento dessa atividade no mundo. Os estudos
76 genéticos com marcadores nessa área, inicialmente, têm sido direcionados a construção
77 de mapas de ligação e a identificação de *loci* que controlam características quantitativas
78 (QTL – *Quantitative Traits Loci*), objetivando entender o controle genético de

79 características produtivas e melhorá-las, para atender as exigências do mercado
80 consumidor (Gibbs et al., 1997; Crooijmans et al., 1997; McConnell et al.1999;
81 Jacobsson et al., 2004; Siegel et al., 2006; Gholizadeh e Mianji, 2007). Entretanto, a
82 diminuição na variabilidade genética de populações de galinhas naturalizadas e o risco
83 de extinção a que muitas raças estão submetidas têm conduzido a utilização dos
84 microssatélites também, em estudos variabilidade genética de populações locais (FAO,
85 2000; Mariante & Cavalcante, 2006).

86 Segundo Groenen et al. (2000), existem em torno de 801 microssatélites
87 desenvolvidos para a espécie *Gallus domesticus*. Contudo, a sua utilização entre
88 espécies relacionadas ou subpopulações (raças) de uma espécie requer um rigoroso
89 processo de escolha, otimização e análise dos marcadores selecionados.

90 O uso dos marcadores desenvolvidos para uma espécie/raça em outras, dá-se em
91 consequência do desenvolvimento dos *primers* ser realizado a partir de sequências
92 flanqueadoras, presentes nas extremidades dos microssatélites, e normalmente
93 conservadas entre espécies/raças relacionadas (Zane et al., 2002; Ellegren, 2004).
94 Contudo, a eficiência desses marcadores em estudos de conservação decresce de acordo
95 com a distância evolutiva entre as espécies/raças (Soulsbury et al., 2009). Problemas
96 como a maior incidência de alelos nulos (não amplificação de um alelo, como resultado
97 de mutações no sítio de ligação do *primer*), homoplasia (fenômeno causado pela
98 inserção ou deleção no fragmento amplificado) e alelo *dropout* (resultante de falha
99 estocástica ao amplificar um alelo), podem ocasionar erros de genotipagem e
100 consequentemente interferirem nos resultados do estudo, pelo aumento ou diminuição
101 da variabilidade genética (Pompanon et al., 2005; Soulsbury et al., 2009). Todos estes
102 parâmetros devem ser levados em consideração na escolha e utilização dos
103 microssatélites, sendo o processo de otimização dos marcadores uma etapa fundamental

104 nos estudos genéticos. A partir da otimização é possível detectar tais problemas a ponto
105 de se evitar erros na genotipagem.

106 Este trabalho objetivou selecionar e otimizar um conjunto de microssatélites de
107 DNA, desenvolvidos originalmente para raças de galinhas comerciais, para o estudo da
108 diversidade genética de populações de galinhas naturalizadas na região Meio-Norte do
109 Brasil.

110

111 **Material e métodos**

112

113 *Coleta das amostras*

114

115 Amostras de tecido cutâneo foram coletadas a partir de aves pertencentes ao
116 SACAC (Sistema Alternativo de Criação de Aves Caipiras) da Embrapa Meio-Norte. Os
117 experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia – Biologia Molecular
118 da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI. Uma fração de aproximadamente 1 cm de
119 diâmetro de tecido foi retirada, da porção inferior da asa, seguido de cuidados
120 necessários quanto a assepsia e cicatrização do ferimento nas aves. As amostras foram
121 então acondicionadas em um microtubo de 2 mL contendo etanol absoluto seguida de
122 armazenamento a -20°C . Ressalta-se que somente uma porção de cada amostra coletada
123 foi utilizada para extração do DNA genômico sendo o restante novamente armazenado.

124

125 *Extração de DNA genômico*

126

127 O DNA genômico foi extraído utilizando o protocolo padrão fenol-clorofórmio-
128 álcool isoamílico (25: 4:1, v:v:v). As amostras de tecido cutâneo foram maceradas e

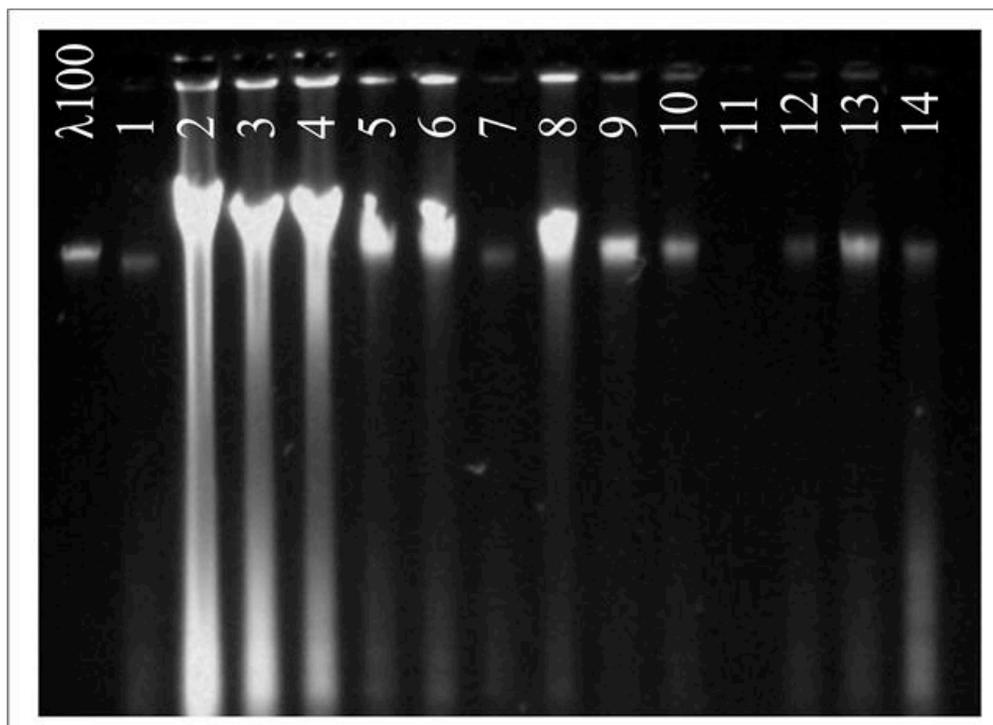
129 adicionadas em tampão de extração. Em seguida, foi adicionada proteinase-K para
130 digestão inicial do tecido, e então incubadas a 55°C durante a noite em banho-maria
131 (Sambrook et al., 1989). Depois dos processos de separação dos lipídios e proteínas, e
132 de lavagem, o DNA, de alto peso molecular, foi isolado por precipitação em etanol, a
133 diferentes concentrações, e ressuspenso em tampão de eluição (Tris – 1 mM pH 8,0 /
134 EDTA – 10 mM pH 8,0).

135 As amostras de DNA extraídas foram preparadas com adição de tampão de
136 carregamento (azul de bromofenol + xileno cianol) e submetidas à eletroforese em gel
137 de agarose a 0,8% com tampão TBE 0,5 × (10 × TBE: 108 g/L Tris base, 55 g/L de
138 ácido bórico, 8,3 g/L EDTA, pH 8,0) a 100 V. Logo em seguida o gel corado com
139 brometo de etídio (10 mg/mL) foi visualizado sob luz ultravioleta e fotodocumentado. O
140 DNA foi quantificado através da comparação da resolução do DNA extraído com
141 padrões predefinidos do marcador de peso DNA de fago lambda – 100 ng/μL, Figura 1.

142 As amostras utilizadas para reações em cadeia da polimerase (PCR) foram
143 diluídas em água ultra pura estéril, para uma concentração de aproximadamente 15
144 ng/μL. Após a quantificação, as amostras foram divididas em duas alíquotas e uma
145 delas foi armazenada a -20°C para análises posteriores.

146

147



148

149 Figura 1 – Gel de agarose 0,8% mostrando DNA de extrações de 15 amostras
150 de tecido cutâneo de galinha naturalizada, Teresina-PI, 2009.

151

152 *Seleção dos primers*

153

154 Foram inicialmente selecionados, um total de 15 marcadores microssatélites
155 isolados para a espécie de galinha doméstica, com *primers* desenvolvidos por
156 Crooijmans et al. (1997), McConnel et al. (1999) e indicados pela FAO (2004),
157 conforme revisão de literatura para identificar os marcadores mais relevantes para o
158 estudo de diversidade genética em populações de galinhas locais. Esses, 15 foram
159 escolhidos conforme o tipo de repetição, comprimento da repetição e grau de
160 polimorfismo. Critérios como o tamanho do *primer* e repetições tretranucleotídicas de
161 cada *locus* foram priorizados (Tabela 1). Os *primers* foram testados com o DNA de
162 cinco aves diferentes para verificação da amplificação e padronização das reações PCR.

163 Tabela 1 – Características dos *loci* de microssatélites selecionados e utilizados na genotipagem de galinhas naturalizadas, Teresina – PI,
 164 2009.

Nome dos <i>loci</i>	Ta (°C)	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')	Tipo de repetição	Tamanho dos alelos (pb) *	Localização no mapa	Referência
LEI0192	60	TGCCAGAGCTTCAGTCTGT	GTCATTACTGTTATGTTTATTGC	(CTTT) ₁₂ (CA) ₈ (ACACA) ₂ (CA) ₅	244-370	Cromossomo 6	FAO (2004)
LEI0166	60	CTCCTGCCCTTAGCTACGCA	TATCCCCTGGCTGGGAGTTT	(AC) ₉	354-370	Cromossomo 3	FAO (2004)
LEI0221	58	CCTTTATCCACTCTTCATGCAC	TGCATAAATCCATGGGTAAGC	(CTTT) ₂₁	203	Cromossomo 1	McConnel et al., 1999
MCW0213	55	CTGTTCACTTTAAGGACATGG	GACAAGTCAACAACCTTGCCAG	(AC) ₂₅	309-311	Cromossomo 13	Crooijmans et al., 1997
LEI0258	58	CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG	AGCTGTGCTCAGTCTCAGTGC	(TTCTTTCTTCC) ₅	205	Cromossomo 16	McConnel et al., 1999
LEI0246	55	TTGCACTGAGACCAAATGTC	CATAGATTTTCCTTAGTAGGTAACCTG	(CTTT) ₂₈	250	Cromossomo 1	McConnel et al., 1999
LEI0237	57	GTTAAGTGTCTCTGATGTAGC	CTTCAACTATAAAGCATAGCTG	(CTTT) ₁₇	224	Cromossomo 2	McConnel et al., 1999
LEI0234	60	ATGCATCAGATTGGTATTCAA	CGTGGCTGTGAACAAATATG	(CTTT) ₃ (TTCT) ₁₉	216-364	Cromossomo 2	FAO (2004)
LEI0217	51	GATGACTGAGAGAAATAACTTG	AAATTACTGAGGCACAGGAG	(CTTT) ₃₁	198	Cromossomo 1	McConnel et al., 1999
LEI0209	49	AATTTGGTGTACACCTCTCC	GACTTTCCAGTGTCTCGTTTAG	(CTTT) ₂₂	169	Cromossomo 1	McConnel et al., 1999
MCW0104	60	TAGCACAACCTCAAGCTGTGAG	AGACTTGCACAGCTGTGTACC	(AGC) ₅ (GT) ₁₇	190-134	nd	FAO (2004)
MCW0098	60	GGCTGCTTTGTGCTCTTCTCG	CGATGGTCGTAATTCTCACGT	(TTTA) ₅ (TG) ₆ (TG) ₇	261-265	nd	FAO (2004)
MCW0248	60	GTTGTTCAAAAGAAGATGCATG	TTGCATTAACCTGGGCACTTTC	(AC) ₉	205-225	Cromossomo 1	FAO (2004)
LEI0194	52	TCCTTGGCATGTACATATGA	ACTGCATGTTCTTTGATAGGC	(TTTC) ₁₅ (T) ₁₀	163	Cromossomo 1	McConnel et al., 1999
LEI0214	50	TGCCTCGTCTTACTGAGTGA	GATCAAGCACTGTATTTTATTC	(CTGT) ₇ (CTTT) ₈	159	Cromossomo 11	McConnel et al., 1999

165 * Nota: De acordo com referencia; nd: não determinado.

166 ***Condições de PCR***

167

168 PCRs foram realizadas em um volume final de 10 μ L com os seguintes
169 componentes: 15–30 ng de DNA genômico, 1–1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada
170 dNTP, 0,3 μ M para cada *primer* de microssatélites (*forward* e *reverse*), 1,0 μ L de
171 tampão de reação 10 \times (40 mM Tris-HCl; 100 mM KCl), 0,1 U/ μ L de *Taq* DNA
172 polimerase (Invitrogen) e água deionizada para completar o volume final da reação
173 (Tabela 2). A mistura total da reação PCR foi submetida ao termociclador gradiente
174 modelo *Veriti*[®] *96-well thermalcycler* (Applied Biosystems) nas seguintes condições
175 iniciais: desnaturação inicial 94°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a
176 94°C, 30 segundos a temperatura de anelamento de cada par de *primer* e 50 segundos a
177 72°C. A extensão final foi feita a 72°C por 2 minutos, seguido de armazenamento a -
178 12°C.

179 A técnica *Touchdown PCR*, desenvolvida por Don et al. (1991), foi também
180 utilizada para auxiliar na otimização. Normalmente essa técnica é desenvolvida em um
181 programa de amplificação com dois conjuntos de ciclos após a desnaturação inicial. No
182 primeiro, ao final de cada ciclo a temperatura de anelamento decresce 1 ou 2°C. Já no
183 segundo conjunto, todos os ciclos são conduzidos com a menor temperatura de
184 anelamento do primeiro.

185

186 ***Eletroforese PAGE***

187

188 Os fragmentos de DNA amplificados via PCR, ou *amplicons*, foram analisados
189 por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) desnaturante a 6%. Utilizou-se uma
190 fonte de eletricidade *PowerPac 3000* (BioRad) ajustada à 1500 volts, 60 A e 55 W com

191 corrente constante, com tempo de corrida variável, conforme o tamanho das bandas, ou
192 alelos, para uma boa separação dos fragmentos amplificados, seguido por coloração
193 com nitrato de prata de acordo com o protocolo desenvolvido por Benbouza et al.
194 (2006), com as seguintes modificações: solução de fixação (etanol 20 %, ácido acético
195 PA glacial 0,5 %) por 5 min; solução de nitrato de prata (9 mM) com formaldeído (1,5
196 mL / L) por 7 min; e, revelador (NaOH 0,37 M) com formaldeído (2,0 mL / L) 5 a 7 ou
197 até o aparecimento das bandas.

198 Após aproximadamente duas horas uma imagem do gel de poliacrilamida foi
199 digitalizada em um scanner para posterior análise dos *amplicons*.

200 Foi utilizado um marcador de DNA com bandas de comprimento conhecido
201 variando em 10 pares de bases (pb) (Invitrogen) para auxiliar na determinação do
202 tamanho dos alelos. Quando os fragmentos de DNA foram superiores a 330 pb, um
203 outro marcador foi utilizado (50 pb, Invitrogen). No gel desnaturante, o tamanho em
204 pares de base (pb) foi verificado de acordo com o tipo de repetição dos microssatélites,
205 tamanho dos fragmentos citados na referência original dos *primers* desenvolvidos para
206 cada *locus* e com o auxílio dos marcadores de peso molecular.

207

208 **Resultados**

209

210 Um total de 10 *loci* de microssatélites foram otimizados para a amplificação de
211 bandas reproduzíveis e de fácil visualização dos alelos. As temperaturas de anelamento
212 e as concentrações de cloreto de magnésio variaram entre os pares de *primers* dos
213 diferentes *loci*, conforme a Tabela 2. As concentrações de cada primer, dNTP e *Taq*
214 *DNA polimerase* foram fixadas em 0,33 mM, 200 mM e 0,1 U/ μ L, respectivamente.

215

216

217 Tabela 2 – Condições de otimização dos *loci* de microssatélites utilizando a técnica de
 218 PCR para amplificação de DNA de galinhas naturalizadas, Teresina – PI,
 219 2009.

<i>Loci</i>	Ta (°C)	[MgCl ₂] (mM)
LEI0192	60	1,5
LEI0166	60	1,5
LEI0221	60	1,5
MCW0213	55	1
LEI0258	66	1,5
LEI0246	60	1
LEI0237	60	1
LEI0234	60	1
LEI0217	56	1
LEI0209	63 – 53	1

220

221

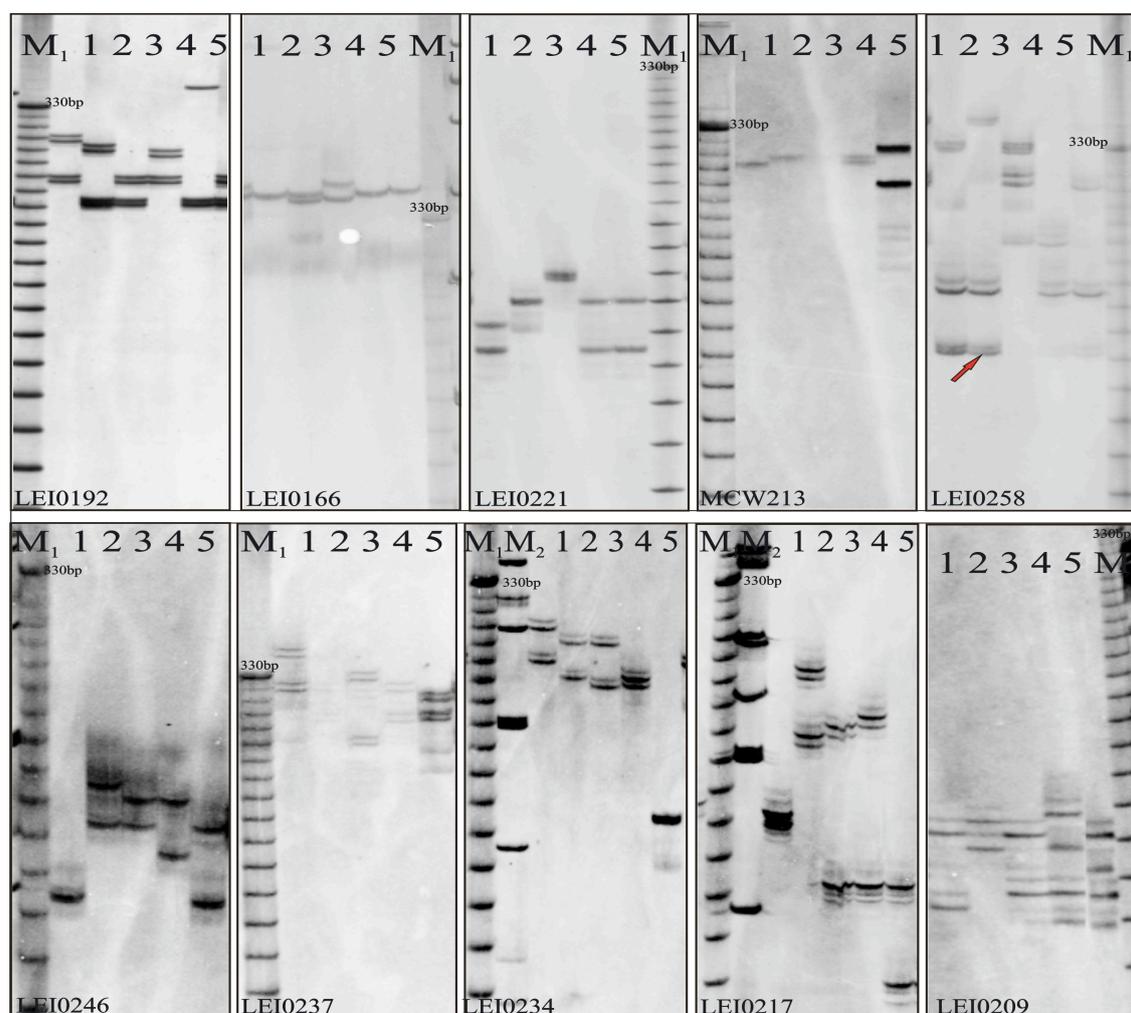
222 Apenas em um *locus* (LEI0209), dentre os dez *loci* obtidos, foi necessário utilizar
 223 a técnica de *Touchdown PCR* (Don et al., 1991) para otimização. Diferentes programas
 224 de amplificação foram utilizados e variaram, em sua maioria, de acordo com o *locus* do
 225 microssatélites (Tabela 3). Foi possível observar polimorfismo em todos os *loci* de
 226 microssatélites otimizados (Figura 2).

227 Tabela 3 – Programas utilizados para amplificação dos *loci* de microssatélites de DNA de galinhas naturalizadas, Teresina – PI, 2009

<i>Loci</i> de microssatélites									
LEI0166	LEI0192	LEI0209*	MCW0213	LEI0217	LEI0221	LEI0234	LEI0237	LEI0246	LEI0258
<i>1 ciclo:</i> 94°C - 1'									
-	-	<i>10 ciclos:</i> 94°C - 30" 63°C - (-1°C) até 53°C - 1' 72°C - 1'	-	-	-	-	-	-	-
<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 60°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 60°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>30 ciclos:</i> 94°C - 30" 53°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 55°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 56°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 60°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 60°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 60°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 60°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞	<i>35 ciclos:</i> 94°C - 30" 66°C - 30" 72°C - 50" 72°C - 2' 12°C - ∞

228 *Nota: Touchdown PCR (Don et al., 1991).

229 Nas amostras estudadas os *loci* que apresentaram o maior número de alelos
 230 foram os LEI0192 e LEI0234 (Tabela 4).



231
 232 Figura 1 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida mostrando os dez
 233 marcadores microssatélites otimizados para galinha naturalizada,
 234 amostras 1 - 5. A seta em vermelho destaca a presença de *stutter*. M1:
 235 Marcador de peso 10pb; M2: Marcador de peso 50bp, Teresina – PI,
 236 2009.

237
 238

239 A amplificação do DNA de cinco amostras de galinhas naturalizadas nos dez
 240 *loci* otimizados gerou um total de 51 alelos diferentes com os fragmentos variando de
 241 153-406 (Tabela 4.).

242

242 Tabela 1 – Dados referentes ao número e comprimento dos alelos
 243 amplificados, Teresina – PI, 2009.

<i>Loci</i>	Nº de alelos Observados	Varição no comprimento dos alelos observados (pb)
LEI0192	7	246-406
LEI0166	3	248-354
LEI0221	4	208-216
MCW0213	4	289-321
LEI0258	6	201-293
LEI0246	5	230-258
LEI0237	6	292-328
LEI0234	7	216-300
LEI0217	6	178-254
LEI0209	6	153-173

244

245

246 **Discussão**

247

248 A amplificação cruzada ou utilização de *primers* de microssatélites
 249 desenvolvidos para uma espécie/raça em outras, é uma boa alternativa para reduzir o
 250 custo e tempo gasto no desenvolvimento de novos marcadores (Abdelkrim et al.,
 251 2009). Entretanto, problemas na amplificação podem ocorrer em função do DNA
 252 extraído e principalmente da distância evolutiva entre a espécie alvo e a espécie de
 253 interesse (Pompanon et al., 2005; Zhou et al., 2009).

254 A qualidade do DNA extraído pode influenciar na amplificação dos marcadores,
 255 contudo não é fator determinante para os microssatélites. Na visualização do DNA das
 256 amostras utilizadas nesse estudo foi possível observar uma pequena degradação,
 257 provavelmente como resultado de falha durante o processo de extração ou em
 258 consequência do estado de conservação da amostra. Esse fato, porém, não prejudicou
 259 os trabalhos, devido à alta frequência de amplificação desses marcadores. Em virtude
 260 do pequeno tamanho dos fragmentos amplificados, que variam de 100 a 300 pb, os

261 *primers* de microssatélites são capazes de reconhecer as sequências alvo utilizando
262 amostras de DNA mesmo que este esteja degradado e obter êxito na amplificação,
263 sendo o sucesso desta proporcional ao tamanho do fragmento (Selkoe & Toonen,
264 2006).

265 No presente estudo, ao utilizar 15 marcadores microssatélites desenvolvidos
266 para aves comerciais em galinhas locais, foi obtido 67% de transferibilidade. Embora,
267 isolados a partir de outras raças de galinhas, a utilização dos microssatélites entre
268 diferentes raças e mesmo em outros Galináceos tem obtido sucesso (Levin et al.,
269 1995; Liu et al., 1996; Faria & Miyaki, 2006). Todano et al. (2008), estudaram a
270 variabilidade de raças miniaturas de galinhas japonesas através da utilização de 40
271 *loci* de microssatélites desenvolvidos para galinha doméstica obtendo resultados
272 precisos de amplificação e análise genética, em todos os *loci* estudados. Pang et al.
273 (1999) selecionaram 48 *primers* desenvolvidos para galinha doméstica obtendo
274 aproximadamente 60% de transferibilidade em codornas japonesas.

275 Contudo, esses resultados declinam de acordo com a distância genética entre os
276 indivíduos (Primmer & Merilâ, 2000), ou seja, a proximidade filogenética é o
277 principal fator no sucesso para o uso de *primers* heterólogos, embora outros fatores
278 como tamanho, complexidade e localização do microssatélite possam também
279 influenciar no processo de transferibilidade (Oliveira et al., 2006; Zucoloto et al.,
280 2006; Küpper et al., 2008).

281 A menor transferibilidade dos marcadores pode também ser consequência de
282 falhas durante a otimização do marcador. Após um criterioso processo de otimização
283 de 25 *primers* de microssatélites (desenvolvidos para codornas e galinhas), Zhou et al.
284 (2009) obtiveram 80% de êxito na amplificação cruzada em perdizes. O sucesso na
285 utilização de marcadores para espécies relacionadas requer, dessa forma, além de

286 proximidade filogenética, um rigoroso processo de escolha e otimização dos *primers*
287 que serão utilizados.

288 A precisão desses estudos genéticos depende ainda de uma boa replicação dos
289 fragmentos de forma que seja possível uma análise minuciosa dos polimorfismos. Nos
290 trabalhos que utilizam *primers* heterólogos, esse parâmetro somente é obtido com a
291 otimização das concentrações dos reagentes da PCR, que variam de acordo com o
292 tamanho e composição dos nucleotídeos, e das temperaturas de anelamento, através
293 de tentativas e erros (Ogliari et al., 2000).

294 Na maioria dos *loci* analisados, nesse estudo, foi possível observar a presença
295 de muitas bandas provavelmente como consequência do anelamento não específico do
296 *primer*. Nesse caso, dois procedimentos podem ser utilizados para diminuir a
297 intensidade dos fragmentos inespecíficos ou eliminá-los: primeiro, a redução na
298 concentração de cloreto de magnésio e segundo, a elevação da temperatura de
299 anelamento do *primer*. No primeiro procedimento a concentração do cloreto de
300 magnésio age como co-fator para a atividade da enzima *Taq DNA polimerase*. Dessa
301 forma, ao diminuir a quantidade desse reagente elimina-se a possibilidade de
302 amplificação de produtos inespecíficos. Já no segundo, a elevação da temperatura de
303 anelamento permite que as sequências iniciadoras se liguem apenas ao fragmento
304 alvo. O segundo procedimento é aplicado alternativamente quando os resultados do
305 primeiro não forem satisfatórios. Koret et al. (1996), afirma que a temperatura de
306 anelamento ótima varia de 3 a 12°C acima da $T^{\circ}m$ teórica.

307 De acordo com Selkoe & Toonen (2006), na otimização dos marcadores é
308 importante o uso de temperaturas de anelamento que são as mais altas possíveis e uma
309 redução no tempo de extensão do fragmento. Esse procedimento contribui para a
310 diminuição no número de bandas inespecíficas, dado ao conhecimento da taxa de

311 incorporação de nucleotídeos pela *DNA polimerase* (35 – 100 nucleotídeos por
312 segundos em 70 – 80°C para *Taq DNA polimerase*).

313 Somente os *loci* LEI0246 e LEI0217 mostraram-se otimizados na primeira
314 tentativa. Para os marcadores que ao amplificarem apresentaram bandas fracas e de
315 difícil visualização, foi aumentada a concentração do MgCl₂. O íon magnésio nesse
316 caso se liga ao fosfato dos nucleotídeos nos ácidos nucléicos tendo efeito benéfico nas
317 interações entre eles (Rahman et al., 2002). Variações na concentração desse reagente
318 menores que 4 mM podem melhorar a PCR por não afetar a especificidade (Blanchard
319 et al., 1993). Para todos os *locus* testados foi fixada uma concentração de 0,3 µM de
320 *primer* e 200 µM da mistura do dNTP, estando de acordo com indicação de Koret et
321 al. (1996).

322 O *locus* LEI0209 foi o que apresentou maiores problemas no processo de
323 otimização. Grande número de fragmentos inespecíficos foi observado de forma que a
324 diminuição na concentração do cloreto de magnésio não produziu resultados
325 satisfatórios. Apenas nesse marcador foi necessária a utilização de programa diferente
326 de termociclagem para amplificação, através da técnica *Touchdown PCR*. Ogliari et
327 al. (2000) ao utilizarem essa técnica na otimização de 125 *primers* de microssatélites
328 para milho obtiveram 65% de amplificação. Israel et al. (2004), também utilizaram a
329 TD – PCR na otimização de *primers* de microssatélites para o estudo de diferenciação
330 genética em esturjão verde.

331 Um problema comum na utilização da técnica de microssatélites, inclusive
332 observado nesse estudo, foi a presença de “*stutter*” caracterizado pela presença de
333 estruturas semelhantes a bandas próximas aos *amplicons*, principalmente com os
334 microssatélites de repetição dinucleotídicas. A ocorrência de “*stuter*” é um reflexo do
335 deslizamento da enzima *Taq DNA polimerase in vitro*, durante o processo de

336 replicação, semelhante ao que ocorre nas células dos organismos, porém, sem a
337 atividade das enzimas de reparo que corrigem mutações decorrentes desse processo
338 (Ellegren, 2004; Selkoe & Toonen, 2006). De acordo com Shinde et al., (2003),
339 experimentos quantitativos mostraram que a taxa de deslize da *Taq polimerase*
340 aumenta com o número de unidades repetitivas e é inversamente correlacionada com
341 o comprimento das unidades. Portanto, marcadores com repetições tetranucleotídicas
342 normalmente apresentam uma menor quantidade de bandas “*stutter*” que
343 dinucleotídeos e especialmente mononucleotídeos.

344 Em cinco marcadores testados não foi possível obter sucesso na otimização. Os
345 *loci* MCW0104, MCW0098, MCW0248, LEI0194 e LEI0214, mostraram
346 amplificação de muitos fragmentos menores que mesmo diante de mudanças nas
347 concentrações de cloreto de magnésio, concentração do *primer* e temperatura de
348 anelamento não foi possível obter resultados satisfatórios. Dessa forma, a utilização
349 desses *primers* em estudos populacionais, de galinhas naturalizadas da região Meio-
350 Norte, geraria uma quantidade de fragmentos que não corresponderia ao alelo
351 verdadeiro do microssatélite. Estes alelos aqui encontrados, possivelmente são os
352 denominados alelos *dropout* (o que somente pode ser confirmado a partir de
353 seqüenciamento dos fragmentos), que causam erros de genotipagem e são
354 particularmente problemáticos em estudos de conservação (Pompanon et al., 2005).
355 Estudos feitos por Soulsbury et al. (2009), sugerem que a presença de *dropout* pode
356 estar relacionada a mutações em certos alelos e que este problema pode ser mais
357 prevalente quando se utiliza *primers* heterólogos, desenvolvidos para outra espécie.

358 Neste estudo, o aparecimento de uma possível quantidade de *dropout* pode estar
359 ligado a utilização desses *primers* em uma raça de galinha doméstica diferente
360 daquela em que eles foram isolados. Embora possa ocorrer a existência desses alelos á

361 medida que cresce a distância evolutiva entre espécies diferentes (Soulsbury et al.,
362 2009), a utilização de microssatélites desenvolvidos para galinha doméstica tem
363 obtido sucesso na amplificação e estudos populacionais em outras aves (Pang et al.,
364 1999; Galbusera et al., 2000).

365 A presença de bandas polimórficas foi observada em todos os marcadores
366 otimizados (Figura 2). O elevado nível de polimorfismo podem ser um indicador de
367 grande variabilidade, microssatélites com altas taxas mutacionais podem ser úteis para
368 estudar demografia atual, o padrão de conectividade ou, detectar mudanças recentes
369 em populações locais (Selkoe & Toonen, 2006).

370

371 **Conclusão**

372

373 Os microssatélites otimizados revelaram grande potencial para estudos de
374 diversidade genética em grupos genéticos de galinhas naturalizadas da região Meio-
375 Norte.

376

377 **Referências bibliográficas**

378

379 ABDELKRIM, J.; ROBERTSON, B.C.; STANTON, J.-A.L.; GEMMELL, N.J. Fast,
380 cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic
381 sequencing. **BioTechniques**, v.46, p.185-192, 2009.

382 AMBARY, S.; CHENG, H.H.; de LEO'N, P.; Development and mapping of
383 microsatellites markers derived from chicken chromosome-specific libraries. **Journal**
384 **Poultry Science**, v.81, p.1644-1646, 2002.

385 BENBOUZA, H.; JACQUEMIN, J.M.; BAUDOIN, J.P.; MERGEAI, G. Optimization
386 of reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in
387 polyacrylamide gel. **Biotechnolgy Agronomy Society and Environment**, v.10, n.2.
388 p. 77-81, 2006.

389 BLANCHARD, M.M.; TAILON-MILLER, P.; NOWOTNY, P.; NOWOTNY, V. PCR

- 390 buffer optimization with a uniform temperature regimen to facilitate automation. **PCR**
391 **Methods Application**, v.2, p.234–40, 1993.
- 392 CROOIJMANS, R.P.M.A.; DIJKIHOFF, R.J.M.; VAN Der POEL, J.J.; GROENEN,
393 M.A.M. New microsatellite marker in chicken optimized for automated fluorescent
394 genotyping. **Animal Genetics**, v.28, p.427-437, 1997.
- 395 DON, R.H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B.J.; BAKER, K.; MATTICK, J.S.
396 ‘Touchdown’ PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic**
397 **Acids Research**. v.19, p.4008, 1991.
- 398 ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature**
399 **Review**, v.5, p.435-445, 2004.
- 400 FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **World watch list for**
401 **domestic animal diversity**. 3.ed. Rome, 2000. 744p.
- 402 GALBUSERA, P.; VAN DOGEN, S.; MATTHYSEN, E.; Cross-species amplification
403 of the microsatellites in passerine birds. **Conservation Genetics**, v.1, p.163-168,
404 2000.
- 405 GIBBS, M.; DAWSON, D.A.; McCAMELY, C.; WARDLE, A.F.; ARMOUR, J.A.L;
406 BURK, T. Chicken microsatellites marker isolated from libraries enriched for simple
407 sequence repeat. **Animal Genetics**, v. 28, p.401-417, 1997.
- 408 GHOLIZADEH, M.; MIANJU, G.R. Use microsatellite marker in poultry research.
409 **International Journal of Poultry Science**, v.6: p.145-153, 2007.
- 410 GROENEN, M.A.M.; CHENG, H.H.; BUMSTEAD, N. et al. A consensus linkage
411 map of the chicken genome. **Genome Research**, v.10: p.137-147, 2000.
- 412 HILLEL, J.; GROENEN, M.A.M.; TIXIER-BOICHARD, M. et al. Biodiversity of 52
413 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. **Genetics**
414 **Selection Evolution**, v.35, p.533-557, 2003.
- 415 ISRAEL, J.A.; CORDES, J.F.; BLUMBERG, M.A.; MAY, B. Geographic patterns of
416 genetic differentiation among collections of green sturgeon. **North American**
417 **Journal of Fisheries Management**, v.24, p.922–931, 2004.
- 418 JACOBSSON, L.; PARK, H.B.; WAHLBERG, P.; JIANG, S.; SIEGEL, P.B.;
419 ANDERSSON, L. Assignment of fourteen microstellite markers to the chicken
420 linkage map. **Journal Poultry Science**, v.83, p.825-1831, 2004.
- 421 KORETH, J.; O'LEARY, J.J.; McGEE, J.O'D. Microsatellites and PCR genomic
422 analysis. **Journal of Pathology**, v.178, p.239-248, 1996.
- 423 KÜPPER, C.; BURKE, T.; DAWSON, A. Enhanced cross-species utility of conserved
424 microsatellite markers in shorebirds. **BMC Genomics**, v.9, p.1-20, 2008.
- 425 LEVIN, I.; CHENG, H.H.; BAXTER-JONES, C.; HILLEL J. Turkey microsatellite
426 DNA loci amplified by chicken-specific primers. **Animal Genetics**, v.26, p.107-110,
427 1995.
- 428 LIU, Z.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. Use
429 of chicken microsatellite markers in turkey: a pessimistic view. **Animal Genetics**,
430 v.27, p.191-193, 1996.
- 431 MARIANTE, A.S.; CAVALCANTE, N. **Animals of the Discovery: domestic breeds**

- 432 **in the history of Brazil**, 2.ed. Brasilia: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia,
433 2006. 274 p.
- 434 McCONNELL, S.K.J.; DAWSON, D.A.; WARDLE, A.; BURKE, T. The isolation
435 and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. **Animal**
436 **Genetics** v.30, p.183-189, 1999.
- 437 OGLIARI, B.J.; BOSCARIOL, R.L.; CAMARGO, L.E.A. Optimization of PCR
438 amplification of maize microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, v.23,
439 n.2, p.395-398, 2000.
- 440 OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.J.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA,
441 M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and**
442 **Molecular Biology**, v. 29, n. 2: p. 294-307, 2006.
- 443 PANG, S.W.Y.; RITLAND, C.; CARLSON, J.E.; CHENG, K.M. Japanese quail
444 microsatellite loci amplified with chicken-specific primers. **Animal Genetics**, v. 30:
445 p. 195–199, 1999.
- 446 POMPANON, F.; BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Genotyping errors:
447 causes, consequences and solutions. **Nature Review Genetics**, v.6, p.847-849, 2005.
- 448 PRIMMER, C.R.; MERILÄ, J. A low rate of cross-species microsatellite
449 amplification success in Ranid frogs. **Conservation Genetics**, v.3, p.445-449, 2000.
- 450 RAHMAN, M.U.; MALIK, T.A.; ASLAM, N.; AHMAD, M.A.R.; KHAN, I. A.;
451 ZAFAR, Y. Optimization of PCR conditions to amplify microsatellite loci in cotton
452 (*Gossypium hirsutum* L.) genomic DNA. **International Journal of Agriculture &**
453 **Biology**, v.4, n.2, p.282–284, 2002.
- 454 SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning. A laboratory**
455 **manual**, 2.ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor: New York,
456 1989.
- 457 SELKOE, K.A.; TOONEN, R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to
458 using and evaluating microsatellite marker. **Molecular Letters**, v.9, p.615-629, 2006.
- 459 SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from chicken genetics
460 to the chicken genome. **Poultry Science**, v.85, p.2050–2060, 2006.
- 461 SHINDE, D.; LAI Y.L.; SUN F.Z.; ARNHEIM N. *Taq* DNA polymerase slippage
462 mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: $(CA/GT)_n$ and $(A/T)_n$
463 microsatellites. **Nucleic Acids Res**, v.3, p.1974–980, **2003**.
- 464 SOULSBURY, C.D.; IOSSA, G.; EDWARDS, K.J. The influence of evolutionary
465 distance between cross-species microsatellites and primer base-pair composition on
466 allelic dropout rates. **Conservation Genetics**, v.10, p.797-802, 2009.
- 467 TODANO, R.; NISHIBORI, M.; IMAMURA, Y. et al. High genetic divergence in
468 miniature breeds of Japanese native chickens compared to Red Junglefowl, as
469 revealed by microsatellite analysis. **Animal Genetics**, v.39, p.71–78, 2008.
- 470 ZHOU, X.; XU, Y.; RAN, J. et al. Polymorphic microsatellites in Buff-throated
471 partridge developed by cross-species amplification. European Journal of Wildlife
472 Research, v.55, p.81–83, 2009.

473 ZUCOLOTO, R.B.; VILLELA, P.M.S.; VERDADE, L.M.; COUTINO, L.L. Cross-
474 species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman* spp and
475 *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p 75-78, 2006.

4 CAPITULO II – Diversidade genética de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte do Brasil.

1 GENETIC DIVERSITY OF NATURALIZED CHICKEN

2

3 **Diversidade Genética de Galinhas Naturalizadas na Região Meio-**

4 **Norte do Brasil**

5

6 *Clementino, Cíntia de Souza¹; Barbosa, Firmino José Vieira^{2,3}; Campelo, Elivalto*

7 *Guimarães¹; Britto, Fábio Barros.^{3, 4}; Diniz, Fábio Mendonça^{3*}*

8 **Resumo**

9

10 As populações de galinhas naturalizadas na região Meio-Norte do Brasil são resultado
11 da miscigenação de raças de origens diversas e o processo de modernização da
12 avicultura no país pode ter posto em risco a variabilidade genética dessas aves, que
13 representam um importante recurso genético para a exploração zootécnica regional. A
14 caracterização genética e fenotípica dessas populações significa um passo relevante em
15 termos de iniciativas para sua conservação e utilização. Nesse aspecto, ferramentas
16 moleculares como os microssatélites têm tornado possível o estudo genético de
17 populações naturais em risco de extinção, uma vez que fornecem informação precisa da

¹ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Campus Agrícola da Socopo, 64049-550, Teresina, PI, Brasil.

² Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual do Piauí, Pirajá, CEP 64002-150, Teresina-PI, Brasil.

³ EMBRAPA Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, Cx. Postal: 01, Teresina, PI, CEP: 64.006-220, BRAZIL, Tel: +55 (86) 3225 1141 (Ext. 270), Fax: +55 (86) 3225 1142, Email: fmdl@cpamn.embrapa.br.

⁴ Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Piauí, Campus Cinobelina Elvas, BR 125 Km 3, Planalto Cibrazem, Bom Jesus, PI 64900-000, Brasil.

18 estruturação e variabilidade genética das populações, em nível de DNA. Objetivando
19 caracterizar quatro grupos genéticos de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte do
20 Brasil, 10 loci de microssatélites, que foram submetidos a procedimento de otimização,
21 foram utilizados nesse trabalho. Os valores de PIC em torno de 0,80 revelaram o alto
22 poder de discriminação dos marcadores para essas populações. Foram encontradas
23 heterozigosidade média esperada e observada em torno de 0,84 e 0,78 respectivamente,
24 para as quatro populações. Os índices de fixação F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} foram calculados
25 revelando a ocorrência de excesso de homozigotos, que pode também ser consequência
26 de erros de genotipagem. Baixa subdivisão e diferenciação nas populações também
27 foram encontrados nesse estudo. A análise de variância molecular (AMOVA) calculada
28 em três níveis hierárquicos em cada população revelou moderada estruturação entre os
29 grupos. A análise de distância molecular gerou dendrograma mostrando o agrupamento
30 das populações Graúna Dourada e Teresina, que geograficamente se localizam próximas
31 às capitais dos estados do Maranhão e Piauí, em um único clado. O estudo revelou a
32 existência de alta variabilidade genética nos grupos avaliados, porém, um número maior
33 de indivíduos poderá fornecer informações mais precisas sobre a diversidade genética
34 dessas galinhas naturalizadas.

35

36 **Palavras-chave:** *galinhas naturalizadas, microssatélite, região Meio-Norte.*

37

38

39

40

41

42

43

44

45 **Genetic diversity of naturalized chicken populations across the Mid-**
46 **North of Brazil**

47

48 *Clementino, Cíntia de Souza¹; Barbosa, Firmino José Vieira^{2,3}; Campelo, Elivalto*
49 *Guimarães¹; Britto, Fábio Barros^{3,4}; Diniz, Fábio Mendonça^{3*}*

50 **Summary**

51

52 Naturalized chicken populations located in the Mid-North region of Brazil are a result
53 of random mating of breeds from diverse origins. The modernization of aviculture in the
54 country may have jeopardized the genetic variability of these naturalized birds, which
55 represent an important genetic resource for zootechnical exploitation. The genetic and
56 phenotypic characterization of these populations is a relevant step in terms of initiatives
57 for their conservation and sustainable use. In this respect, molecular tools such as
58 microsatellites have made possible the genetic study of natural populations at risk of
59 extinction, since these markers provide precise data on structuring and genetic
60 variability of the population at DNA level. In order to genetic characterize the four
61 groups of naturalized chicken distributed in the mid-north region of Brazil, 10
62 microsatellites loci were used in this study. The values of PIC, around 0.80, revealed the
63 high discrimination power of microsatellites for these populations. Average expected

¹ *Department of Animal Sciences, Federal University of Piauí, Campus Agrícola da Socoço, 64049-550, Teresina, PI, Brazil.*

² *Department of Animal Sciences, State University of Piauí, Pirajá, CEP 64002-150, Teresina-PI, Brazil.*

³ *EMBRAPA Meio-Norte, Av. Duque de Caxias, 5650, Cx. Postal: 01, Teresina, PI, CEP: 64.006-220, BRAZIL, Tel: +55 (86) 3225 1141 (Ext. 270), Fax: +55 (86) 3225 1142, Email: fnd1@cpamn.embrapa.br.*

⁴ *Department of Animal Sciences, Federal University of Piauí, Campus Cinobelina Elvas, BR 125 Km 3, Planalto Cibrazem, Bom Jesus, PI 64900-000, Brazil.*

64 and observed heterozygosities were around 0.84 and 0.78 respectively, for all four
65 populations, but with a higher value in the Brejeira population. The indexes F_{IS} , F_{IT} and
66 F_{ST} were calculated and revealed the occurrence of excessive homozygosity, which may
67 also be a result of weak population subdivision and differentiation on populations. The
68 analysis of molecular variance (AMOVA) calculated in three hierarchical levels in each
69 population showed moderate structuring between the groups. The analysis of genetic
70 distance showed a dendrogram clustering the populations of Graúna Dourada and
71 Teresina, both geographically located next to the capitals of Maranhão and Piauí states.
72 The study showed genetic variability in the four assessed groups, however, a larger
73 number of individuals can provide a more precise information on the genetic diversity
74 of these naturalized chicken.

75

76 Keywords: Naturalized chicken, microsatellite, Mid-north region.

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88 **Introdução**

89

90 Originária da Ásia, a galinha doméstica difundiu-se pelos mais diversos
91 continentes e países (Rodrigues et al., 2006), chegando ao Brasil possivelmente na
92 época da colonização. A criação sem práticas racionais de manejo contribuiu para
93 aquisição de vantagens adaptativas e constituição genética que lhes permitiram
94 sobreviver em ambientes e condições adversas (Gessuli, 1999).

95 Até meados dos anos 60, a criação dessas aves naturalizadas de forma extensiva
96 no país era uma atividade muito praticada, o que além de caracterizar a avicultura
97 brasileira como ‘artesanal’, denotou-a como “caipira” (Gessuli, 1999). Entretanto,
98 devido à demanda de mercado, o esse tipo de criação foi substituída pela ‘Avicultura
99 Industrial Moderna’ altamente tecnificada com uso de linhagens consangüíneas,
100 importadas e de alto padrão genético (Malazzi, 1980). A nova configuração do setor
101 avícola permitiu então, elevação na produção de forma a abastecer o mercado interno e
102 externo com produtos de qualidade a um baixo custo (ABEF, 2009). A criação
103 tradicional de galinhas passou a ser praticada somente por pequenos produtores
104 (agricultores familiares) e na maioria das vezes nos quintais das periferias urbanas.
105 Certamente que, a mudança na forma de criação pode ter contribuído para a diminuição
106 do contingente populacional dessas aves no Brasil. Em países da África, Ásia e América
107 do Sul é provável que cruzamentos aleatórios ou dirigidos de galinhas naturalizadas
108 com aves melhoradas, objetivando aumentar a produção, tenham reduzido a
109 variabilidade genética das populações de aves nativas (Wimmers et al., 2000; Nasiri et
110 al., 2007).

111 Em trabalhos de melhoramento genético a variabilidade de populações nativas
112 e/ou naturalizadas está diretamente relacionada com o sucesso em programas de

113 seleção. A redução da variabilidade das aves locais implica diretamente na resposta à
114 seleção, comprometendo dessa forma todo o programa de melhoramento genético
115 (Hillel et al., 2003; Qu et al., 2006; Nasiri et al., 2007).

116 Estudos de caracterização e programas de conservação de galinhas
117 nativas/naturalizadas foram iniciados em poucos países, com o objetivo de evitar perda
118 de material genético (FAO, 2007). Contudo, de acordo com Holffmann (2009), apenas
119 cerca de 25% das raças de frango estão em algum tipo de programa de conservação e,
120 além disto, estes não apresentam informações sobre sua eficiência.

121 No Brasil é possível que as aves naturalizadas carreguem um conjunto gênico que
122 lhes confira grande variabilidade genética, sobretudo nas regiões do país em que ainda é
123 praticada a agricultura de subsistência como é o caso da região Meio-Norte. Estas
124 características peculiares das aves naturalizadas, como tolerância a altas temperaturas e
125 resistência a algumas doenças, provavelmente foram conservadas devido ao modo de
126 criação extensivo e cruzamentos aleatórios em mais de 500 anos (Barbosa, 2006). A
127 caracterização desse recurso genético é fundamental em programas de conservação e
128 melhoramento genético.

129 Muitas ferramentas têm sido utilizadas nos estudos de caracterização genética de
130 populações de galinhas nativas. Recentemente avanços em tecnologias moleculares têm
131 fornecido novas oportunidades de estimar a variabilidade genética em nível de DNA. Os
132 marcadores moleculares, assim conhecidos por serem marcas distintas nas moléculas de
133 DNA, RNA ou proteínas, possuem vantagens sobre os métodos tradicionais de
134 caracterização por inferirem diretamente sobre a variabilidade genética de uma
135 população (Gholizadeh & Mianji, 2007). Dentre os mais utilizados destacam-se os
136 microssatélites, pequenos fragmentos de DNA com muitas repetições em *tandem* as
137 quais variam normalmente de dois a seis pares de bases (Ellegren, 2004). Como

138 consequência de seu alto grau de polimorfismo, herança co-dominante, repetibilidade e
139 praticidade de uso, são marcadores úteis para mapeamento genético, identificação de
140 QTL e testes de parentescos (Hillel et al., 2003). Diversos trabalhos vêm sendo
141 realizados utilizando essa poderosa ferramenta para analisar a diversidade genética em
142 populações de galinhas locais (Hillel et al., 2003; mwacharro et al., 2007; Nasiri et al.,
143 2007; Berthouly et al., 2008ab) mostrando ser uma ferramenta altamente eficaz em
144 estudos com este escopo.

145 O objetivo com esse trabalho foi realizar a caracterização genética de galinhas
146 naturalizadas na região Meio-Norte do Brasil, por meio de marcadores moleculares
147 microssatélites, tendo em vista o direcionamento de futuros programas de conservação.

148

149 **Material e Métodos**

150

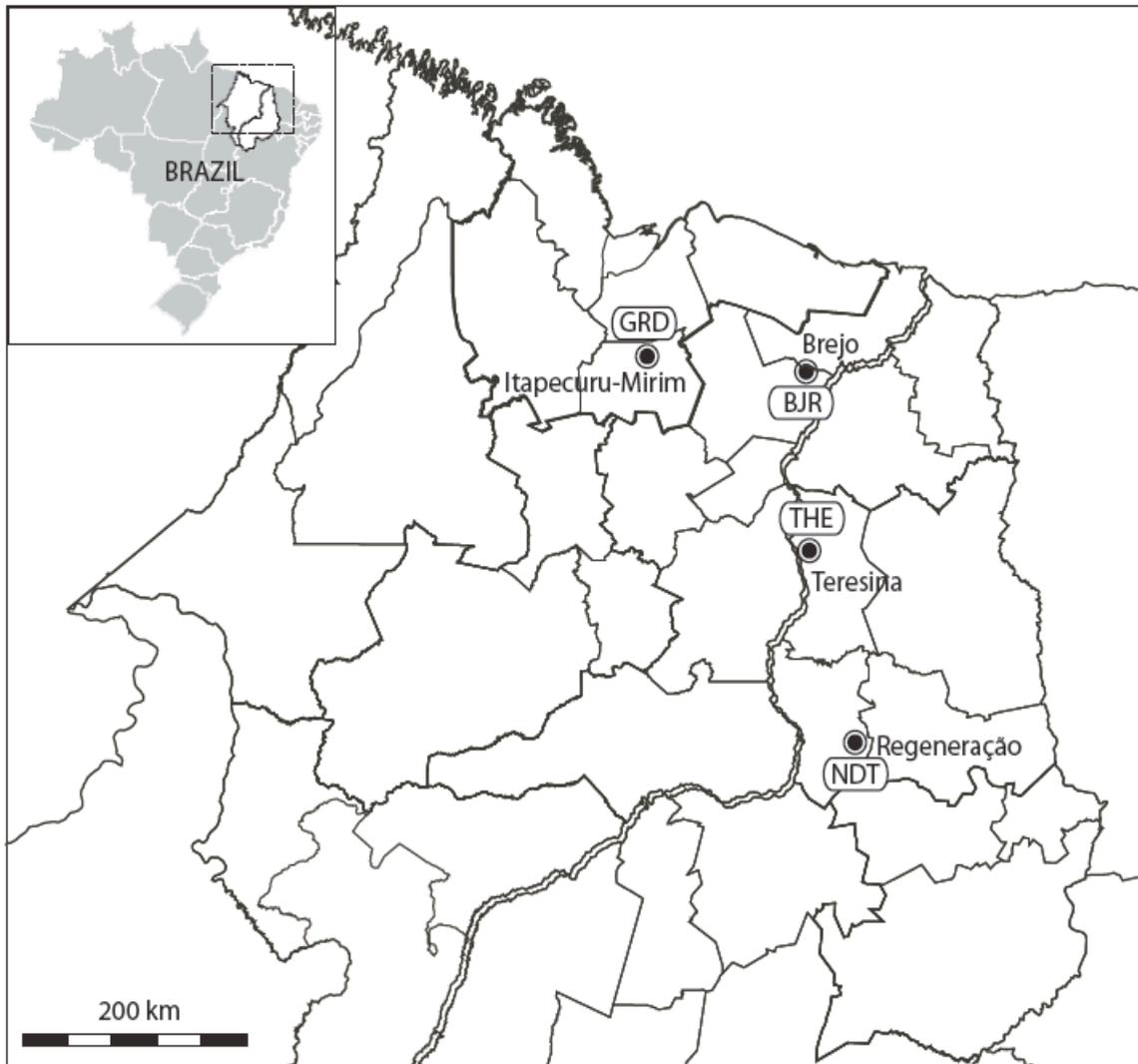
151 *Amostragem.* Um total de 92 aves provenientes de quatro diferentes municípios
152 (Itapecuru Mirim – MA, Brejo de Anapurus – MA, Teresina – PI e Regeneração – PI /
153 Figura 1) localizados no Meio-Norte do Brasil foi coletado (Figura 2). O critério de
154 escolha fundamentou-se na observação de populações fenotipicamente estruturadas, ou
155 seja, com plumagem, cristas e porte físico uniforme. Os animais foram então
156 organizados em quatro grupos de origem e de características externas distintas. Vinte e
157 três amostras de tecido cutâneo (parte inferior da asa) de cada grupo genético/população
158 foram coletadas perfazendo um total de 92, e imediatamente preservadas em etanol 95-
159 100%. Adicionalmente, amostras de penas jovens foram retiradas de cada indivíduo e
160 armazenadas em sacos plásticos. Todas as amostras foram levadas ao laboratório e
161 estocadas a -20°C até posterior análise.

162



Figura 1 - a) Grupo Teresina; b) Grupo Graúna Dourada; c) Grupo Nordestina; e d) Grupo Brejeira, Teresina – PI, 2009.

163
164
165
166
167



167
 168 *Figura 2 – Mapa de localização das amostras coletadas indicando o município onde*
 169 *cada amostra foi coletada, GRD (Graúna Dourada), BJR (Brejeira), THE*
 170 *(Teresina) e NDT (Nordestina), Teresina – PI, 2009.*

171
 172
 173
 174 ***Extração de DNA e amplificação de microssatélites.*** O DNA genômico foi extraído de
 175 ambas as amostras (tecido e pena), utilizando o protocolo padrão fenol-clorofórmio-
 176 álcool isoamílico (25:24:1, v:v:v), após digestão inicial com proteinase k (Sambrook et
 177 al., 1989). DNA de alto peso molecular foi isolado por precipitação em etanol e
 178 posteriormente, visualizado em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídio (10
 179 mg/mL), após eletroforese e fotodocumentado sob luz ultravioleta.

180 Dez *loci* de microssatélites foram selecionados para o estudo (ver capítulo
 181 anterior), sendo três de acordo com recomendações da FAO (2004), seis oriundos do

182 trabalho desenvolvido por McConnell et al. (1999) e um *locus* apresentado por
183 Crooijmans et al. (1997) (Tabela 1). Estes *loci* foram amplificados via reação de
184 polimerase em cadeia (PCR). Cada reação de PCR foi conduzida em um volume final
185 de 10 μ l, de acordo com as seguintes condições: 0,3 μ M de cada *primer*, 1- 1,5 mM de
186 $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 1 \times tampão de PCR (40 mM Tris-HCl; 100 mM KCl), 1
187 U da enzima *Taq DNA polimerase*, e 15-30 ng de DNA da amostra. A amplificação foi
188 realizada utilizando-se um termociclador *Veriti® 96-well thermalcycler* (Applied
189 Biosystems Inc.), nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 1 minuto,
190 seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a temperatura de anelamento
191 de cada par de *primer* (Tabela 1) e 50 segundos a 72°C. A extensão final foi feita a 72°C
192 por 2 minutos, seguido de armazenamento a -12°C. Os produtos das reações de PCR
193 foram visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante a 6% corado com nitrato de
194 prata.

195
196

Tabela 1 – Descrição dos primers e microsatélites utilizados no estudo da diversidade genética de galinhas naturalizadas, Teresina-PI, 2009.

Nome dos loci	Seqüência do primer forward	Seqüência do primer reverse	Tipo de repetição	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do alelo observado (bp)	Genbank (Número de acesso)	Localização no compton map	Posição (cM)	Referência
LEI0192	TGCCAGAGCTTCAGTCTGT	GTCATTACTGTATGTTTATTGC	(CTTT)12	60	250 – 418	Z83797	Cromossomo 6	31	FAO (2004)
LEI0166	CTCCTGCCCTTAGCTACGA	TATCCCCTGGCTGGGAGTTT	(CA)8(ACACA)2(CA)5 (AC)9	60	346 – 364	X85531	Cromossomo 3	300	FAO (2004)
LEI0221	CCTTTATCCACTCTTCATGCAC	TGCATAAATCCATGGGTAAGC	(CTTT)21	60	172 – 232	Z83791	Cromossomo 1	-	McConnell et al., 1999
MCW0213	CTGTTCACTTAAAGGACATGG	GACAAGTCAACAACCTGCCAG	(AC)25	55	265 – 321	G31990	Cromossomo 13	22	Crooijmans et al., 1997
LEI0258	CACGCAGCAGAACTGGTAAGG	AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC	(TTCTTTCTTCC)5	66	177 – 409	Z83781	Cromossomo 16	0	McConnell et al., 1999
LEI0246	TTGCACTGAGACCAAATGTC	CATAGATTTTCCTTAGTAGGTAAGTTC	(CTTT)28	60	190 – 310	Z83765	Cromossomo 1	454	McConnell et al., 1999
LEI0237	GTTAAGTGTCTCTGATGTAGC	CTTCAACTATAAAGCATAGCTG	(CTTT)17	60	240 – 388	Z94840	Cromossomo 2	320	McConnel et al., 1999
LEI0234	ATGCATCAGATTGGTATTCAA	CGTGGCTGTGAACAAATATG	(CTTT)3(TTCT)19	60	214 – 302	Z94837	Cromossomo 2	50	FAO (2004)
LEI0217	GATGACTGAGAGAAATAACTTG	AAATTACTGAGGCACAGGAG	(CTTT)31	56	178 – 286	Z83796	Cromossomo 1	229	McConnell et al., 1999
LEI0209	AATTTGGTGTACATACCTCTCC	GACTTCCAGTGTCTCGTTTAG	(CTTT)22	63	129 – 181	Z83783	Cromossomo 1	56	McConnell et al., 1999

197

198 *Análise estatística.* A análise genética populacional foi conduzida usando diferentes
199 programas. Frequência alélica, estimativas de heterozigosidade esperada (H_E) e
200 observada (H_O), Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em cada *locus* e em
201 cada grupo/população, além do teste de desequilíbrio genotípico por *locus*, foram
202 calculados usando o programa GENEPOP v.4.0.10 (Rousset, 2008). O conteúdo de
203 informação polimórfica foi calculado utilizando o pacote de análise do programa
204 CERVUS v.3.0.3 - © Copyright Tristan Marshall (1998–2007)
205 (www.fieldgenetics.com). Os testes de probabilidade foram baseados no Método da
206 Cadeia de Markov (Guo e Thompson, 1992) usando 1000 *steps* de dememorização, 100
207 *batches* e 1000 interações por *branches*. Uma correção sequencial de Bonferroni (Rice,
208 1989) foi aplicada para corrigir o efeito de múltiplas comparações evitando a
209 possibilidade de resultados erroneamente significantes (erro tipo I). Um nível global de
210 significância de 0,05 foi usado para as correlações. A extensão da subdivisão de
211 população genética entre os grupos fenotipicamente distintos foi investigada pelo
212 cálculo dos índices de fixação com base em um modelo de alelo infinito (IAM) (Kimura
213 & Crow, 1964) e um modelo de *stepwise-mutation* (SMM) (Kimura & Ohta, 1978),
214 utilizando produtores permutacional não-paramétricos no teste de significância.

215 A riqueza alélica A_R (uma medida do número de alelos por *locus* corrigido pelo
216 tamanho da amostra) foi calculada usando o pacote do programa FSTAT v.2.9.3
217 (Goudet, 2009).

218 Somado a estimativa da extensão de subdivisão populacional os dados genéticos
219 das galinhas locais foram divididos em grupos em função da localização das aves e
220 diferenciação fenotípica. Portanto, a variância genética global entre as populações foi
221 avaliada através de uma Análise de Variância Molecular - AMOVA (Excoffier, 1992).
222 Componentes de variância genética foram computados em três níveis hierárquicos

223 (entre grupos, entre populações e entre indivíduos dentro das populações) e testados
224 para desvios significativos de zero a 1000 permutações produtores de genótipos
225 *multiloci* usando ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier et al., 2006). A matriz de distância obtida
226 foi analisada pelo software MEGA v. 4.0 (Tamura et al., 2007). Com o uso do método
227 da distância, com algoritmo de agrupamento *Neighbour Joining* (Saitou & Nei, 1987),
228 foi construído o dendrograma das relações de similaridade.

229

230 **Resultados**

231

232 Todos os dez *loci* de microssatélites mostraram-se eficientes na amplificação e
233 genotipagem do DNA das galinhas naturalizadas. Estatísticas básicas descrevendo a
234 distribuição genotípica e diversidade (heterozigosidade observada e esperada) para cada
235 população e *locus* estão listadas na Tabela 2. Nesse estudo a média de heterozigosidade
236 esperada (H_E), heterozigosidade observada (H_O) e conteúdo de informação polimórfica
237 (PIC) dentro das quatro populações/grupos para os dez *loci* foram 0,84, 0,78 e 0,81,
238 respectivamente, e a média do número de alelos por população foi 112,7. Em todas as
239 populações foi possível observar polimorfismo e grande diversidade genética com
240 valores de H_E para todas as populações maiores que 0,8. A população menos
241 polimórfica foi a Graúna Dourada de plumagem preta, e proveniente do município de
242 Itapecuru Mirim - MA, tendo valores de H_E e PIC de 0,831 e 0,795 para todos os
243 marcadores, enquanto que a população mais polimórfica foi a Brejeira de plumagem
244 variada de crista noz, e pertencentes ao município de Brejo de Anapurus - MA, com H_E
245 e PIC como 0,866 e 0,831 respectivamente.

246 Elevado grau de polimorfismo foi observado para todos os marcadores utilizados,
247 como mostra a Tabela 3. Os alelos mostraram baixa frequência nas populações,

248 simultaneamente, contudo foi possível observar a existência de muitos alelos
249 específicos, um total de 78, cujos maiores números foram encontrados na população
250 Brejeira. Uma média de A_R (riqueza alélica), em torno de 14,32 foi observada para
251 todos os *locus* em geral. Os dez marcadores apresentaram-se polimórficos nas
252 populações, com uma média de 21 alelos por *locus*, com um máximo de 33 e mínimo de
253 9 alelos por microsatélite utilizado. A média de H_E , H_0 e PIC para todos os marcadores
254 foram 0,889, 0,779 e 0,874, respectivamente. Entre os dez microsatélites analisados, o
255 mais polimórfico foi o *locus* LEI0258 com 33 alelos totais, média de 13,75 alelos por
256 população e média de H_E , H_0 e PIC sendo 0,953, 0,891 e 0,946 respectivamente. Por
257 outro lado, o marcador LEI0166 foi o menos polimórfico com 9 alelos na população
258 geral, 5,75 alelos por população, com média de H_E , H_0 e PIC de 0,751, 0,522 e 0,711
259 respectivamente.

260 O índice de fixação dos indivíduos dentro da população total (F_{IT}) foi de -0,055
261 (LEI0221) a 0,345 (LEI0166) com média de 0,139. O índice de fixação individual
262 dentro de uma subpopulação, coeficiente de consangüinidade, (F_{IS}) variou de -0,078
263 (LEI0221) a 0,276 (MCW0213) tendo uma média de 0,076. O coeficiente de fixação de
264 subpopulações dentro da população total (F_{ST}) para os dez *loci* variou de 0,012
265 (LEI0192) a 0,233 (LEI0166), com média de 0,068.

266

267

268

269

270

271

272

273 Tabela 2 - Diversidade genética dos dez loci de microssatélite para quatro
 274 populações de galinhas caipiras locais. N , número de indivíduos; N_A ,
 275 número de alelos; H_O , heterozigosidade observada; H_E ,
 276 heterozigosidade esperada; N_{AT} número total de alelos; A_R , riqueza
 277 alélica; F_{IS} , índice de fixação de subpopulações, em Teresina – PI,
 278 2009.

(continua)

Loci de microssatélite		Populações			
		Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
LEI0192	N	23	23	23	23
	N_A	14	15	16	15
	H_O	0,87	0,74	0,913	0,956
	H_E	0,88	0,869	0,882	0,887
	A_R	13.736	14.694	15.734	14.777
	F_{IS}	0,012	0,149	-0,035	-0,098
LEI0166	N	23	23	23	23
	N_A	5	8	5	5
	H_O	0,391	0,652	0,48	0,565
	H_E	0,5	0,789	0,494	0,663
	A_R	4.957	7.956	4.956	4.998
	F_{IS}	0,217	0,173	0,032	0,148
LEI0221	N	23	23	23	23
	N_A	8	10	9	12
	H_O	0,956	1	0,826	1
	H_E	0,838	0,875	0,888	0,907
	A_R	7.955	9.954	8.999	11.910
	F_{IS}	-0,142	-0,144	0,070	-0,102
MCW0213	N	23	23	23	23
	N_A	13	12	9	10
	H_O	0,48	0,826	0,956	0,61
	H_E	0,907	0,861	0,849	0,788
	A_R	13.000	11.822	8.912	9.825
	F_{IS}	0,449	0,242	0,180	0,227
LEI0258	N	23	23	23	23
	N_A	14	16	11	14
	H_O	0,782	0,695	0,826	1
	H_E	0,906	0,939	0,859	0,867
	A_R	13.738	15.781	10.825	13.779
	F_{IS}	0,136	0,12	-0,114	-0,154
LEI0246	N	23	23	23	23
	N_A	10	11	14	13
	H_O	0,74	0,87	0,913	0,521
	H_E	0,884	0,846	0,9	0,916
	A_R	9.912	10.866	13.782	12.868

280

281

282

283

284 Tabela 2 - Diversidade genética dos dez loci de microssatélite para quatro
 285 populações de galinhas caipiras locais. N , número de indivíduos; N_A ,
 286 número de alelos; H_O , heterozigosidade observada; H_E ,
 287 heterozigosidade esperada; N_{AT} número total de alelos; A_R , riqueza
 288 alélica; F_{IS} , índice de fixação de subpopulações, em Teresina – PI,
 289 2009.

(continua)

Loci de microssatélite		Populações			
		Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
LEI0237	F_{IS}	0,164	0,178	0,082	0,43
	N	23	23	23	23
	N_A	15	18	10	14
	H_O	0,956	0,87	0,913	0,87
	H_E	0,922	0,908	0,823	0,891
	A_R	14.822	17.520	9.868	13.781
	F_{IS}	-0,038	0,042	-0,109	0,024
LEI0234	N	23	23	23	23
	N_A	9	9	10	9
	H_O	0,705	0,826	0,521	0,652
	H_E	0,748	0,881	0,761	0,889
	A_R	8.828	8.913	9.867	8.999
	F_{IS}	0,070	0,063	0,314	0,267
	N	23	23	23	23
LEI0217	N_A	14	13	9	13
	H_O	0,87	0,826	0,652	0,88
	H_E	0,908	0,909	0,826	0,896
	A_R	13.822	12.868	8.826	12.952
	F_{IS}	0,042	0,091	0,211	-0,067
	N	23	23	23	23
	N_A	8	9	9	13
LEI0209	H_O	0,96	0,74	0,956	0,74
	H_E	0,831	0,805	0,856	0,901
	A_R	7.913	8.955	8.955	12.950
	F_{IS}	-0,151	0,082	-0,118	0,18
	N_{AT}	110	121	102	118
	Média				
	N_A/pop	11,66	12,1	10,2	11,8
	Média A_R				
	/pop	10.86	11.93	10.07	11.68
	Média H_E	0,82	0,86	0,81	0,86
	Média H_O	0,77	0,80	0,79	0,77
	Média F_{IS}	0,076	0,100	0,051	0,086
	Média H_O				
	/ H_E	0,92	0,92	0,97	0,90

291

292

293

294 *Tabela 3 - Diversidade genética geral das populações de galinhas locais. N, número de*
 295 *indivíduos; N_A, número de alelos; H_O, heteroziosidade observada; H_E,*
 296 *heteroziosidade esperada; A_R, riqueza alélica; F_{IS}, índice de fixação de*
 297 *subpopulações; PIC, conteúdo de informação polimórfica; F_{IT}, índice de*
 298 *fixação da população total; F_{ST}, índice de fixação de subpopulações*
 299 *dentro da população total, Teresina – PI, 2009.*

<i>Locus</i>	<i>N</i>	<i>N_A</i>	<i>A_R</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>PIC</i>	<i>F_{IS}</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>F_{IT}</i>
LEI0192	92	32	17,716	0,87	0,884	0,872	0,007	0,011	0,018
LEI0166	92	9	7,329	0,522	0,751	0,711	0,146	0,233	0,345
LEI0221	92	15	11,768	0,946	0,892	0,876	-0,078	0,021	-0,055
MCW0213	92	20	13,564	0,615	0,889	0,874	0,276	0,059	0,319
LEI0258	92	33	21,444	0,891	0,953	0,946	0,001	0,082	0,083
LEI0246	92	20	14,383	0,696	0,916	0,904	0,215	0,043	0,249
LEI0237	92	29	17,356	0,902	0,926	0,915	-0,018	0,055	0,038
LEI0234	92	16	12,777	0,674	0,898	0,885	0,178	0,113	0,271
LEI0217	92	21	15,033	0,826	0,911	0,9	0,664	0,038	0,102
LEI0209	92	15	11,802	0,848	0,874	0,857	0,0005	0,039	0,039

300

301 Somente três loci (LEI0192, LEI0221 e LEI0237) estiveram de acordo com o
 302 Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Estes *loci* também tiveram os menores valores
 303 de F_{IT}, sendo que, somente o segundo deles apresentou heteroziosidade observada
 304 maior que a esperada. O desequilíbrio de ligação que foi testado para todos os pares de
 305 *locus*, não obteve nenhum resultado significativo após a correção com a correlação de
 306 Bonferroni. A análise de variância molecular (AMOVA) dos quatro grupos genéticos,
 307 realizada com os 10 loci amplificados, estimou a variabilidade genética entre e dentro
 308 de grupos das populações amostradas. A maior parte da variação genética total
 309 corresponde a diferenças entre indivíduos dentro das populações (maior que 90 %) e
 310 somente uma pequena parcela (menos de 10 %) é resultante de diferenças entre as
 311 populações (Tabela 4).

312

313

314

315

316

317 Tabela 4 – Estatísticas da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 10 loci
 318 de microssatélites em populações de galinhas naturalizadas (G – Graúna
 319 Dourada; B – Brejeira; N – Nordestina; T – Teresina), Teresina, 2009.

Nº. de Populações (Nº. de Grupos)	Nº. de (Grupos)	Variância (%)				F _{ST}	F _{SC}	F _{CT} *
		Dentro das Populações	Entre Populações	Entre Populações dentro dos Grupos	Entre Grupos			
4 (1)	(G, B, N, T)	93,03	6,97			0,069		
4 (2)	(G, T); (N, B)	92,65		6,11	1,24	0,073	0,061	0,012
4 (2)	(T, B, N); (G)	91,98		5,75	2,27	0,080	0,058	0,022
4 (2)	(B); (T, N, G)	93,87		7,93	-1,80	0,061	0,077	-
4 (3)	(T); (G, N); (B)	94,01		12,29	-6,30	0,059	0,115	-
2(1)	(T, N)	94,02	5,98			0,059		0,063

320 *Nota: Todos F_{CT} P-values foram > 0.05

321

322

323

No dendrograma obtido com a matriz de distância observa-se a separação das

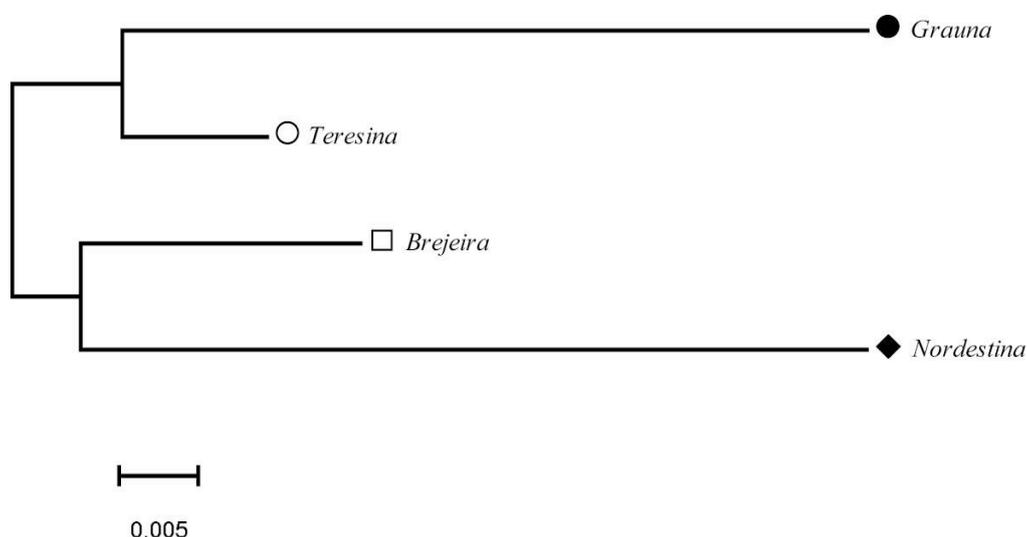
324

quatro populações em dois grupos menores, onde é possível observar que as populações

325

não se agruparam por Estado de origem (Piauí e Maranhão).

326



327

328

Figura 3 – Dendrograma mostrando o agrupamento das populações de galinhas
 329 naturalizadas na Região Meio-Norte, Teresina – PI, 2009.

330

331

332

333 O dendograma mostra uma similaridade maior entre Graúna (plumagem preta e
334 crista simples / Itapecuru Mirim – MA) e Teresina (plumagem vermelha e crista simples
335 / Teresina – PI), que são criações menos isoladas e próximas as respectivas capitais dos
336 seus estados. A Brejeira (plumagem variada em tons avermelhados e crista cereja) fica
337 mais isolada, tendendo para o norte do Maranhão e a Nordestina (plumagem variada em
338 tons mais claros e crista simples), por sua vez, tende para o sul do Piauí, e estão mais
339 próximas geneticamente.

340

341 **Discussão**

342

343 O freqüente uso de marcadores microssatélites no estudo genético de populações
344 selvagens e animais domésticos de interesse comercial para a pecuária, tem sido
345 vantajoso em diversos aspectos. Para caracterizar populações em risco de extinção
346 direcionando programas de conservação e preservação, mapear *loci* que controlam
347 características quantitativas de interesse econômico buscando empregar em programas
348 de melhoramento genético, descobrir *loci* ligados a genes de herança mendeliana e
349 assim entender o funcionamento gênico.

350 Para a caracterização das raças nativas, os microssatélites também têm sido úteis,
351 através de estudos de divergência e diversidade genética. Algumas populações de aves
352 nativas já foram caracterizadas e direcionadas a programas de conservação (Vij et al.,
353 2006). Wimmers et al. (2000) estudaram a diversidade genética de aves da África, Ásia
354 e América do Sul, em que relatou a influência de uma linhagem melhorada nas
355 populações da Nigéria e Tanzânia. Em trabalhos semelhantes, foram investigadas e
356 caracterizadas as populações de aves locais tradicionais japonesas, raças da Espanha,
357 África, Etiópia, China, Iran, Índia e de outros países (Marle-Köster & Nelr, 2000;

358 Pirany et al., 2007; Shahbazi et al., 2007; Berthouly et al., 2008a; Bao et al., 2009;
359 Bodzsar et al., 2009; Dávila et al., 2009; Hassen et al., 2009). Contudo, estudos nesse
360 sentido em populações de galinhas locais no Brasil são praticamente inexistentes. Os
361 resultados do presente estudo, entretanto, revelaram a situação em que se encontra a
362 variabilidade genética das populações de galinhas naturalizadas na Região Meio-Norte.

363 Os níveis de polimorfismo alcançados nesse trabalho revelaram que os
364 marcadores utilizados foram eficientes ao indicarem heterozigosidade média esperada
365 (diversidade genética de um *locus*) e heterozigosidade média observada para cada
366 população acima de 0,75. A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um
367 indivíduo ser heterozigoto no *locus* marcador e depende do número de alelos e de sua
368 frequência na população podendo ser considerada uma medida de diversidade genética.
369 Segundo Menezes et al. (2006), um marcador é considerado altamente polimórfico
370 quando apresenta heterozigosidade maior que 70%.

371 A eficiência dos marcadores em aferir a diversidade genética das populações de
372 galinhas naturalizadas quanto aos níveis de polimorfismo pode também ser confirmada
373 pelo conteúdo de informação polimórfica. Costa et al. (2009) afirmam que, marcadores
374 que apresentam valores de PIC acima de 0,5 são considerados muito informativos,
375 sendo observado nos *locus* estudados valores muito acima dessa média estando de
376 acordo com o dado mencionado.

377 Quando comparados os valores de H_E e H_O nas populações estudadas para todos
378 os *locus* em geral, foi verificado que houve pequenas diferenças, refletindo um déficit
379 no número de heterozigotos em relação ao esperado. Deriva genética e endogamia
380 podem ser responsáveis por esse fato quando os valores de F_{IS} e F_{ST} são
381 significativamente diferentes de zero, ou ainda, o déficit de heterozigosidade pode ser
382 devido a erros de genotipagem causados por dificuldades na visualização do gel, nesse

383 caso indivíduos heterozigotos são contados como homozigotos (Selkoe & Toonen,
384 2006). No presente trabalho o excesso de homozigotos foi devido a erros de
385 genotipagem, uma vez que os valores de F_{IS} foram positivos para as populações em
386 estudo. Quando feita a razão H_E/H_O foi observado que os valores não se igualam, mas se
387 aproximam de 1, indicando que podem ter ocorrido pequenos desvios em relação ao
388 equilíbrio genotípico das amostras (Tabela 4).

389 Os índices de F_{IS} , F_{IT} e F_{ST} calculados para todos os *loci* estão listados na Tabela
390 3. F_{IS} mede um relativo déficit de heterozigosidade e cruzamentos não aleatórios nas
391 amostras. Estes valores podem variar de -1 (todos os indivíduos heterozigotos), 0
392 (associação de alelos ao acaso) e 1 (todos os indivíduos homozigotos). Se não há
393 consanguinidade $F = 0$, valores negativos de F podem indicar seleção a favor de
394 heterozigotos, enquanto que, valores positivos indicam que a população considerada
395 tem um sistema de cruzamentos (Liu et al., 2008). Os valores de F_{IS} positivos
396 encontrados nesse estudo mostraram haver déficit de heterozigotos em oito loci
397 corroborando os dados acima referidos em relação a heterozigosidade. Resultados
398 semelhantes a esses foram encontrados por outros autores (Qu et al., 2006; Liu et al.,
399 2008). Os índices de F_{IT} , contudo, permitem estimar o quanto a população total
400 encontra-se subdivida. Os valores aqui obtidos mostraram que há em torno de 14% de
401 subdivisão populacional. Os quatro grupos genéticos exibiram ainda uma média de
402 apenas 7% de diferenciação entre si, medido pelo índice F_{ST} , o que implica dizer que há
403 similaridade nas freqüências dos alelos dentro de cada população analisada (Holsinger
404 & Weir, 2009).

405 Todas as populações apresentaram desvios significativos quanto ao Equilíbrio de
406 Hardy-Weinberg. A fração dos *loci* em relação a significância variou dentro das
407 populações, com um máximo de 4 *loci* com desvios significativos nos grupos, Graúna

408 Dourada e Teresina. Razões em geral podem explicar desvios do HWE, incluindo
409 cruzamentos direcionados, seleção, deriva genética e tamanho reduzido da população
410 (Qu et al., 2006). Os desvios encontrados nas populações acima referidas podem ter
411 sido consequência de seleção para uniformização dos grupos ou ainda devido ao
412 tamanho pequeno das populações estudadas. A ocorrência de desvios quanto ao
413 equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi verificada em diversos trabalhos (Vij et al.,
414 2006; Nassiri; Nasiri et al., 2007; Liu et al., 2008; Dávila et al., 2009).

415 A existência de alelos exclusivos foi avaliada em todos os grupos genéticos,
416 havendo maior ocorrência desses na população Brejeira. Este resultado pode ser
417 decorrente do número reduzido de indivíduos amostrados uma vez que, quanto menor a
418 população estudada maior a incidência de alelos exclusivos, ou pode ainda ser
419 consequência de um maior isolamento em relação às demais populações. Situada em um
420 município maranhense de difícil acesso é provável que o fluxo de genes tenha sido
421 menor. Ao contrário da população Graúna Dourada, que devido a maior proximidade
422 com a capital do Maranhão e facilidade de acesso ao município, a troca de material
423 genético com outras populações de aves deve ter sido facilitada. Hillel et al. (2003),
424 relataram que a presença de alelos específicos em algumas situações pode ser resultado
425 de deriva genética ou fluxo gênico. Contudo, a existência de muitos alelos exclusivos
426 por si só, não é um bom indicativo de diferenciação entre populações.

427 A distribuição geográfica da diversidade de populações de galinhas naturalizadas
428 da Região Meio-Norte do Brasil foi avaliada por componentes de variância, com valores
429 dos índices de fixação **F** em três níveis de agrupamento hierárquico. Os valores
430 moderados mostraram que a variação observada entre as populações não indicam uma
431 forte estruturação populacional baseada nas diferentes localidades de origem. Até
432 mesmo quando as estimativas foram calculadas usando somente as duas populações

433 mais distantes (Itapecuru Mirim e Regeneração – em torno de 500 km) a análise
434 mostrou um valor de F_{ST} similar aos outros grupos amostrados (0,073). Entretanto, a
435 diferença entre populações não depende somente da distância entre as populações
436 analisadas, variantes genéticas, ambientais e geográficas juntas contribuem na
437 arquitetura genética de uma espécie/raça. Muchadeyi et al. (2007), analisando
438 populações de aves de Zimbábue que distavam entre si em torno de 300 – 800 km, não
439 encontraram resultados significativos quanto a diferenciação genética, estando de
440 acordo com os resultados desse estudo. Mwacharo et al. (2007), ao contrário de
441 Muchadeyi et al. (2007), ao estudar relações genéticas entre populações de galinhas
442 indígenas do Kênia e Leste da África encontraram diferenças significativas, relatando a
443 existência de barreira ao fluxo gênico e subdivisões genéticas em populações que
444 distavam entre si 630 km.

445 Os componentes de variância mostraram, nesse estudo, maiores diferenças
446 distribuídas dentro das populações (mais de 90%) do que entre as populações (menos de
447 10% da variação).

448 De acordo com F_{CT} não houve diferenças entre os grupos sugeridos de
449 distribuição geográfica (sendo encontrados *p-values* não significativos). Contudo, os
450 valores de F_{ST} e F_{SC} , tiveram *p-values* significativos, ou seja, foi observada
451 variabilidade genética tanto nas populações de uma forma geral, como em cada
452 população individualmente.

453 No gráfico obtido a partir da matriz de distância, entretanto, é possível observar a
454 separação das populações em dois grupos, de forma que, os grupos provenientes dos
455 dois municípios mais próximos as capitais do Piauí e Maranhão agruparam-se
456 separadamente daqueles provenientes dos municípios de acesso mais difícil. Embora
457 nesses dois agrupamentos tenhamos populações dos dois estados em cada lado, eles

458 sugerem que os grupos diferem entre si de acordo com a variabilidade presentes neles.
459 As populações Brejeira e Nordestina mostraram concomitantemente maiores valores de
460 heterozigosidade esperada e conteúdo de informação polimórfica ao contrário dos
461 outros dois grupos, confirmando assim, a existência de menor variabilidade genética nos
462 grupos Graúna Dourada e Teresina. Este fato pode ter resultado da interferência do
463 homem nos processos de cruzamento entre os indivíduos, de forma a direcionar
464 cruzamentos consangüíneos objetivando maior produção, entretanto feito sem
465 orientações adequadas ocasionou diminuição da variabilidade genética nesses grupos
466 em relação aos outros dois.

467

468 **Conclusão**

469

470 As populações de galinhas naturalizadas na região Meio-Norte mostraram, através
471 da análise com microssatélites, grande variabilidade genética. A maior variabilidade
472 genética esteve presente nos grupos Nordestina e Brejeira. As populações estudadas
473 não se apresentam fortemente estruturadas e a maior variação genética foi encontrada
474 dentro das populações amostradas.

475

476 **Referências Bibliográficas**

477

- 478 ABEF. 2009. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. System,
479 http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=1337. ABEF, 2009.
- 480 Barbosa, F.J.V. Eram caipiras, agora são naturalizadas. Sapiência. 2006. FAPEPI. n.º. 9,
481 Ano III. Teresina: 2006 (Informativo Científico).

- 482 <<http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia9/artigos1.php>.
- 483 Bao, W.B., J.T. Shu & X.S. Wu, et al. 2009. Genetic diversity and relationship between
484 genetic distance and geographical distance in 14 Chinese indigenous chicken breeds and
485 red jungle fow. Czech Journal of Animal Science, 54, 2: 74–83.
- 486 Berthouly, C., B. Bed'Hom & M. Tixier-Booichard, et al. 2008a. Using molecular
487 markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and
488 Asian chicken breeds. Animal Genetics, 39: 121-129.
- 489 Berthouly, C., G. Leroy & T. Nhu Van, et al. 2008b. Genetic analysis of local
490 Vietnamese chickens provides evidence of gene flow wild to domestic populations.
491 BMC Genetics, 10: 1-8.
- 492 Bodzsar, N., H. Eding & T. Revay, et al. 2009. Genetic diversity of Hungarian
493 indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. Animal Geneitcs, 40: 516-
494 523.
- 495 Costa, M.R., J.R.F. Marques, C.S. Silva & J.L. Vega Pla. 2009. Distâncias genéticas em
496 equinos (*Equus caballus*) por meio de marcadores microssatélites. Revista Biociências,
497 UNITAU, 15, 1: 18-25.
- 498 Crooijmans, R.P.M.A., R.J.M. Dijkhof, J.J. Van Der Poel & M.A.M. Groenen. 1997.
499 New microsatellite marker in chicken optimized for automated fluorescent genotyping.
500 Animal Genetics, 28: 427-437.
- 501 Dávila, S.G., P. Resino-Talavan & J.L. Campo. 2009. Evaluation of diversity between
502 different Spanish chicken breeds, a tester line, and a White Leghorn population based on
503 microsatellite markers. Poultry Science, 88: 2518–2525.

- 504 Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. *Nature*, 5:
505 438-445.
- 506 Excoffier, L., P.E. Smouse & J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance
507 inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human
508 mitochondrial DNA data. *Genetics*, 131: 479-491.
- 509 Excoffier, L., G. Laval & S. Schneider. 2006. Arlequin v. 3.1: an integrated software
510 package for population genetics data analysis. Genetics and Biometrics Laboratory,
511 University of Geneva, Switzerland.
- 512 FAO. 2004. Guidelines for Development of National Management of Farm Animal
513 Genetic Resources Plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity
514 (MoDAD): Recommended Microsatellite Markers, Rome, Italy, 2004.
- 515 FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and
516 Agriculture, edited by B. Rischkowsky and D. Pilling. 2007. Systems, [http://](http://www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm)
517 www.fao.org/docrep/010/a1250e/a1250e00.htm>.
- 518 Gessulli, O. P. 1999. *Avicultura Alternativa – Caipira*, OPG Editores Ltda., Porto Feliz
519 SP.
- 520 Gholizadeh, M. & G.R. Mianju. 2007. Use microsatellite marker in poultry research.
521 *International Journal of Poultry Science*, 6: 145-153.
- 522 Goldet, J. 2009. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation
523 indices (version 2.9.3). Update de Goudet (2009). Systems
524 <http://www.unilch/izea/software/fstat.html>.
- 525 GUO, S.W. & E.A. Tompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg

- 526 proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- 527 Hassen, H., F.W.C. Nesor, A. de Kock & E. van Marle-Köster. 2009. Study on the
528 genetic diversity of native chickens in northwest Ethiopia using microsatellite markers.
529 *African Journal of Biotechnology*, 8, 7: 1347-1353.
- 530 Hillel, J., M.A.M. Groenen & M. Tixier-Boichard, et al. 2003. Biodiversity of 52
531 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection
532 Evolution*, 35: 533-557.
- 533 Holffmann. 2009. The global plan of action for animal genetic resources and the
534 conservation of poultry genetic resources. *World's Poultry Science Journal*, 65: 286-
535 297.
- 536 HOLSINGER, K.E. & B.S. WEIR. 2009. Genetics in geographically structured
537 population: defining, estimating and interpreting FST. *Nature*, 10: 639-650.
- 538 Liu, G.Q., X.P. Jiang & J.Y. Wang, et al. 2008. Analysis of genetic diversity of
539 Yangzhou chicken by microsatellite markers. *International Journal of Poultry Science*,
540 7, 12: 1237-1241.
- 541 KIMURA, M. & J.F. CROW. 1964. The number alleles that can be maintained in a
542 finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- 543 Kimura, M. & T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic
544 frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Science of
545 USA*, 75: 2868-2872.
- 546 Malavazzi, G. 1980. *Avicultura – manual práctico*. Ed. Nobel, São Paulo.

- 547 Marle-Köster, E. & L.H. Nel. 2000. Genetic characterization of native African chicken
548 populations: evaluation and selection of polymorphic microsatellite markers. South
549 African Journal of Animal Science, 30, 1: 1-6.
- 550 McConnell, S.K.J., D.A. Dawson, A. Wardle & T. Burke. 1999. The isolation and
551 mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. Animal Genetics,
552 30: 183-189.
- 553 Menezes, M.P.C., A.M. Martinez & M.N. Ribeiro, et al. 2006. Caracterização genética
554 de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites.
555 Revista Brasileira de Zootecnia, 35, 4: 1336-1341.
- 556 Mwacharro, J.M., K. Nomura & H. Hanada, et al.. 2007. Genetic relationships among
557 Kenya and other East African indigenous chickens. Animal Genetics, v. 38: p. 485-490,
558 2007.
- 559 Muchadeyi, F.C., H. Eding & C.B.A. Wollny, et al. 2007. Absence of population
560 substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellites analysis.
561 Animal Genetics, 38: 332-339.
- 562 Nasiri, B.M.T., F. Shokri, S.E. Khanian & S. Tavakoli. 2007. Study on polymorphism of
563 Island native chicken population using microsatellites markers. International Journal
564 Poultry Science, 6, 11: 835-837.
- 565 Nassiri, B.M.T., F. Shokri, Z. Hamidi & S. Tavakoli. 2007. The investigation of genetic
566 variation at microsatellite loci in Mazandaran native chickens. International Journal
567 Poultry Science, 6, 9: 675- 678.
- 568 Pirany, N., M.N. Romanov, S.P. Ganoule, G.. Devegowda & D.T. Prasad. 2007.

- 569 Microsatellite analysis of genetic diversity in Indian chicken populations. *Journal of*
570 *Poultry Science*, 44: 19-28.
- 571 Qu, L., X. Li & G. Xu. et al. 2006. Evaluation of genetic diversity in chinese
572 indigenousschicken breeds using microsatellite markers. *Science in China Series C: Life*
573 *Science*, 49, 4: 332-341.
- 574 Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- 575 Rodrigues, F.P., S.A. Quriroz & J.M.B. Duarte. 2006. Genetics relatedness among wild,
576 domestic and brazilian fighting roosters. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 8, 2: 83-
577 87.
- 578 Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software
579 for windows and linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- 580 Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniats. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.*
581 *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2nd Ed. New York.*
- 582 Saitou, N., M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for
583 reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 406-425.
- 584 Shahbazi, S., S.Z. Mirhosseini & M.N. Romanov. 2007. Genetic Diversity in Five
585 Iranian Native Chicken Populations Estimated by Microsatellite Markers. *Biochemical*
586 *Genetics*, 45: 63-75.
- 587 Tamura K., J. Dudley, M. Nei & S. Kuma . 2007. MEGA4: Molecular evolutionary
588 genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24:
589 1596-1599.

- 590 Wimmers, K., S. Ponsksili, A. Valle-Zarate, P.K. Mathur & P. Horst. 2000. Genetic
591 distinctness of African, Asian and South American local chickens. *Animal Genetics*, 31:
592 159-165.
- 593 Vij, P.K., M.S. Tandia & R.S. Vij. 2006. Characterization of Punjab Brown chicken.
594 *Animal Genetics Resources Information*, 39: 65-67.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo forneceu uma visão preliminar sobre a variabilidade genética das populações locais de galinhas caipiras da Região Meio-Norte, mostrando que os grupos genéticos definidos nesse trabalho apresentam variabilidade genética, embora poucas amostras tenham sido usadas em cada população, portanto, um maior número de indivíduos fornecerá resultados mais precisos sobre a estrutura genética dessas populações. Merece destaque que os marcadores microssatélites utilizados foram eficientes no estudo da variabilidade genética dos grupos de galinhas locais, com contribuição importante da amplificação cruzada e otimização de *primers* para a sua utilização na caracterização da diversidade, porém não foi constatada forte estruturação genética nessas populações.

A avaliação do potencial produtivo desses animais contribuirá para ações de conservação desses animais e para o uso mais eficiente na agricultura familiar. Entretanto, ações para definição de raça facilitará a implantação de programas de conservação, como está fazendo a Embrapa Meio Norte com a implantação de núcleo de pesquisa com esses animais.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABEF. **Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango**. Disponível em: <http://www.abef.com.br/noticias_portal/exibenoticia.php?notcodigo=1337>. Acesso em: 20 abril 2009.

ALMEIDA, A.M.; CARDOSO, L.G.A. A avicultura africana – limitações e perspectivas de desenvolvimento. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96: p. 114-123, 2001.

ARENALES, M. C.; ROSSI, F. **Criação orgânica de frangos de corte e aves de postura**. Viçosa, MG, CPT, 2001.

BAO, W.B.; SHU, J.T.; WU, X.S. et al.. Genetic diversity and relationship between genetic distance and geographical distance in 14 Chinese indigenous chicken breeds and red jungle fow. **Czech Journal of Animal Science**, v. 54, n.2: p.74–83, 2009

BARBOSA, F.J.V.; ARAUJO NETO, R.B.; RIBEIRO, V.Q.; et al.. Características de carcaça e composição corporal de frangos naturalizados submetidos a sistema alternativo de criação. In: VI SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ, 2005, **Anais...** Teresina, PI. VI Simpósio de Produção Científica da UESPI. Teresina, PI: UESPI, 2005. p. 214-214.

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

BARBOSA, F.J.V.; NASCIMENTO, M.P.S.C.B.; DINIZ, F.M.; et al. **Sistema Alternativo de Criação de Galinhas Caipiras**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007 (Sistema de Produção).

BEJA-PEREIRA, A.; ALEXANDRINO, P.; BESSA, I. et al.. Genetic characterization of southwestern European bovine breeds: a historical and biogeographical reassessment with a set of 16 microsatellites. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 4: p. 243-250, 2003.

BERTHOULY, C.; BED'HOM, B.; TIXIER-BOOICHARD, M. et al. Using molecular markers and multivariate methods to study the genetic diversity of local European and Asian chicken breeds. **Animal Genetics**, 39: 121-129, 2008a.

BERTHOULY, C.; LEROY, G.; NHU VAN, T. et al. Genetic analysis of local Vietnamese chickens provides evidence of gene flow wild to domestic populations. **BMC Genetics**, v. 10: p. 1-8, 2008b.

BODZSAR, N.; EDING, H.; REVAY, T. et al. Genetic diversity of Hungarian indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 40: p. 516-523, 2009.

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

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

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de Zootecnia**, v. 51: p. 39-52, 2002.

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

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

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **World watch list for domestic animal diversity**. 3.ed. Rome, 2000. 744p. Editado por B. D. Scherf.

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

FREITAS, L.A.R.; BERTOGLIO, O.; NUNES, O.M. A tecnologia na avicultura industrial brasileira. In: XXII ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 2002, Curitiba, **Anais...** Curitiba, 2002

FULTON, J.N.; DELANY, M.E. Poultry genetic resources – operation rescue needed. **Science**, v. 300: p. 1667-1668, 2003.

FUMIHITO, A; MYIATE, T; SUMI, S.I.; TAKADA, M.; OHN, S. One subspecies of the red junglefowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91: p. 12505-12509, 1994.

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

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

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.

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

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

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

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

NASIRI, B.M.T.; SHOKRI, F.; KHANIAN, S.E.; TAVAKOLI, S. Study on polymorphism of Island native chicken population using microsatellites markers. **International Journal Poultry Science**, v. 6, n. 11: p. 835-837, 2007.

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

OLIVEIRA, A.A.P.; NOGUEIRA FILHO, A.; EVANGELISTA, F.R.; **A avicultura industrial no Nordeste: aspectos econômicos**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2008. 158 p. (Série Documentos do ETENE, n. 23).

PADUAN, R. 800 bilhões de dólares: De acordo com o Banco Mundial, essa é a estimativa de prejuízos que uma pandemia de gripe aviária pode causar à economia global. 2005. **Revista Exame**. Disponível em: <http://portalexame.abril.com.br/revista/exame/edicoes/0855/internacional/m0078574.html>>. Acesso em 04 fev. 2010.

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

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

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

PIRES, A.V.; CARNEIRO, P.L.S.; TORRES FILHO, R.A. et al. Estudo da divergência genética entre seis linhagens de frangos Legorn utilizando técnicas de análise

- multivariada. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 3: p. 314-319, 2002.
- RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFPA, 2008. 464p.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L.; **Biologia molecular aplicada à produção animal**. EMBRAPA-INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2001. 215 p.
- RODRIGUES, F.P.; QURIROZ, S.A.; DUARTE, J.M.B. Genetics relatedness among wild, domestic and brazilian fighting roosters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, n. 2: p. 83-87, 2006.
- SAGRILO, E.; RAMOS, G.M.; GIRÃO, E.S. et al. **Agricultura Familiar**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 74p. (Boletim técnico - Embrapa)
- SAHAI R.; VIJH, R. K. **Domestic animal diversity - conservation & sustainable development**. Karnal: SI Publications, 2000, 355 p.
- SARTÓRIO, S.D. **Aplicações de técnicas de análise multivariada em experimentos agropecuários utilizando o software R. 2008**. 131f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Estatística e Experimentação Agrônômica, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from chicken genetics to the chicken genome. **Poultry Science**, v. 85: p. 2050–2060, 2006.
- SCHERF, B.D. **World Watch List for Domestic Animal Diversity**. 2nd, 769 p., 1995. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)
- TODANO, R.; NISHIBORI, M.; TSUDZUKI, M. Genetic structure and differentiation of Japanese extremely long-tailed chicken breed (Onagadori), associated with plumage colour variation: suggestions for its management and conservation. **Animal Genetics**, v. 40: p. 989-992, 2009.
- VASCONCELLOS, L.P.M.K.; TAMBASCO-TALHARI, D.; PEREIRA, A.P. et al. Genetic characterization of Alberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26: p. 133-137, 2003.
- WIMMERS, K.; PONSILILI, S.; VALLE-ZARATE, A. et al. Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. **Animal Genetics**, v. 31: p. 159-165, 2000.

APÊNDICE

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

(continua)

Locus	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0192</i>				
246	0.022	0.000	0.000	0.000
254	0.261	0.326	0.304	0.304
258	0.000	0.087	0.000	0.000
266	0.152	0.000	0.109	0.000
270	0.109	0.109	0.087	0.109
274	0.000	0.065	0.022	0.152
278	0.022	0.000	0.043	0.000
282	0.000	0.022	0.022	0.000
286	0.000	0.109	0.043	0.065
290	0.043	0.022	0.043	0.043
294	0.043	0.022	0.000	0.000
298	0.000	0.000	0.043	0.000
302	0.000	0.022	0.000	0.000
306	0.000	0.000	0.000	0.043
310	0.000	0.043	0.000	0.000
318	0.000	0.000	0.043	0.000
330	0.000	0.022	0.000	0.000
338	0.043	0.000	0.065	0.000
342	0.152	0.000	0.000	0.022
346	0.000	0.065	0.087	0.043
350	0.000	0.000	0.000	0.043
354	0.000	0.000	0.000	0.022
366	0.000	0.000	0.022	0.000
370	0.065	0.043	0.022	0.000
378	0.022	0.022	0.000	0.022
382	0.000	0.000	0.022	0.043
390	0.000	0.000	0.022	0.000
394	0.022	0.000	0.000	0.022
398	0.000	0.022	0.000	0.022

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

(continua)

Locus	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0192</i>				
406	0.022	0.000	0.000	0.000
414	0.000	0.000	0.000	0.043
418	0.022	0.000	0.000	0.000
<i>Total de alelos = 32</i>				
<i>LEI0166</i>				
346	0.087	0.000	0.087	0.000
348	0.130	0.109	0.022	0.000
350	0.022	0.370	0.696	0.435
352	0.065	0.043	0.043	0.043
354	0.696	0.065	0.000	0.391
356	0.000	0.261	0.152	0.087
358	0.000	0.065	0.000	0.043
362	0.000	0.065	0.000	0.000
364	0.000	0.022	0.000	0.000
<i>Total de alelos = 9</i>				
<i>LEI0221</i>				
172	0.000	0.000	0.065	0.000
176	0.000	0.000	0.000	0.043
184	0.000	0.130	0.130	0.087
188	0.000	0.065	0.000	0.022
192	0.000	0.152	0.109	0.043
194	0.043	0.000	0.000	0.000
196	0.174	0.239	0.130	0.174
200	0.152	0.043	0.217	0.130
204	0.130	0.130	0.000	0.130
208	0.283	0.130	0.130	0.087
212	0.152	0.022	0.109	0.130
216	0.022	0.000	0.000	0.087
220	0.000	0.000	0.043	0.043

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

(continua)

<i>Locus</i>	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0221</i>				
224	0.043	0.043	0.065	0.022
228	0.000	0.043	0.000	0.000
<i>Total de alelos = 15</i>				
<i>MCW0213</i>				
265	0.000	0.043	0.000	0.000
275	0.023	0.087	0.000	0.000
279	0.000	0.000	0.043	0.000
281	0.000	0.000	0.000	0.043
285	0.000	0.022	0.000	0.022
289	0.023	0.043	0.065	0.000
291	0.000	0.022	0.022	0.022
293	0.000	0.022	0.000	0.000
295	0.045	0.174	0.130	0.065
297	0.091	0.043	0.000	0.087
299	0.136	0.217	0.283	0.000
301	0.227	0.261	0.000	0.174
303	0.159	0.022	0.196	0.413
305	0.045	0.000	0.152	0.000
307	0.045	0.043	0.000	0.000
309	0.045	0.000	0.000	0.130
311	0.068	0.000	0.087	0.022
313	0.023	0.000	0.000	0.000
321	0.068	0.000	0.022	0.000
379	0.000	0.000	0.000	0.022
<i>Total de alelos = 20</i>				
<i>LEI00258</i>				
177	0.000	0.065	0.000	0.000
185	0.000	0.087	0.000	0.000
189	0.000	0.130	0.000	0.000

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

(continua)

<i>Locus</i>	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0258</i>				
193	0.000	0.065	0.000	0.000
197	0.000	0.000	0.000	0.022
201	0.196	0.087	0.000	0.109
205	0.152	0.043	0.174	0.000
221	0.065	0.065	0.000	0.000
237	0.022	0.109	0.000	0.000
241	0.000	0.022	0.000	0.043
245	0.087	0.022	0.261	0.000
253	0.000	0.000	0.022	0.087
257	0.022	0.000	0.130	0.043
261	0.000	0.130	0.000	0.000
265	0.043	0.043	0.000	0.022
269	0.130	0.000	0.022	0.000
273	0.022	0.000	0.022	0.000
277	0.022	0.065	0.000	0.000
283	0.022	0.000	0.000	0.000
289	0.000	0.022	0.000	0.000
293	0.130	0.000	0.022	0.000
297	0.000	0.022	0.000	0.304
301	0.000	0.000	0.174	0.022
305	0.022	0.000	0.000	0.000
309	0.065	0.022	0.000	0.000
321	0.000	0.000	0.000	0.043
329	0.000	0.000	0.065	0.000
345	0.000	0.000	0.000	0.152
353	0.000	0.000	0.065	0.000
365	0.000	0.000	0.000	0.065
375	0.000	0.000	0.000	0.022
387	0.000	0.000	0.000	0.022

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, em Teresina – PI, 2009.

<i>Locus</i>	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0258</i>				
409	0.000	0.000	0.043	0.043
<i>Total de alelos = 33</i>				
<i>LEI0246</i>				
190	0.000	0.000	0.000	0.065
194	0.000	0.000	0.109	0.065
198	0.000	0.000	0.043	0.022
202	0.000	0.043	0.022	0.000
206	0.087	0.217	0.065	0.130
210	0.022	0.043	0.239	0.196
214	0.000	0.000	0.065	0.152
218	0.000	0.022	0.065	0.043
222	0.000	0.000	0.022	0.022
226	0.087	0.261	0.152	0.065
230	0.174	0.217	0.022	0.000
234	0.000	0.000	0.022	0.043
238	0.196	0.065	0.087	0.000
242	0.174	0.043	0.022	0.109
246	0.130	0.000	0.065	0.065
250	0.000	0.000	0.000	0.022
254	0.022	0.022	0.000	0.000
258	0.065	0.000	0.000	0.000
262	0.043	0.043	0.000	0.000
266	0.000	0.022	0.000	0.000
<i>Total de alelos = 20</i>				
<i>LEI0237</i>				
240	0.000	0.022	0.000	0.000
244	0.000	0.022	0.000	0.000
248	0.000	0.022	0.000	0.000
268	0.000	0.000	0.000	0.022

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

<i>Locus</i>	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0237</i>				
272	0.043	0.065	0.000	0.000
276	0.000	0.000	0.000	0.022
280	0.000	0.000	0.043	0.022
288	0.043	0.000	0.000	0.000
292	0.087	0.000	0.000	0.000
296	0.000	0.152	0.348	0.130
300	0.130	0.043	0.000	0.065
304	0.065	0.022	0.000	0.043
308	0.174	0.022	0.000	0.000
312	0.130	0.000	0.043	0.130
316	0.000	0.022	0.000	0.065
320	0.065	0.174	0.174	0.087
324	0.087	0.087	0.000	0.000
328	0.043	0.043	0.130	0.261
332	0.000	0.196	0.000	0.065
336	0.000	0.022	0.000	0.000
344	0.022	0.000	0.022	0.022
348	0.022	0.022	0.000	0.022
350	0.000	0.022	0.000	0.000
352	0.022	0.022	0.000	0.000
356	0.000	0.022	0.109	0.043
360	0.000	0.000	0.022	0.000
370	0.043	0.000	0.000	0.000
384	0.022	0.000	0.087	0.000
388	0.000	0.000	0.022	0.000
<i>Total de alelos = 29</i>				
<i>LEI0234</i>				
212	0.022	0.000	0.000	0.000
216	0.457	0.196	0.022	0.196

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

(continua)

Locus	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0234</i>				
220	0.000	0.000	0.457	0.043
264	0.000	0.022	0.022	0.000
268	0.000	0.152	0.000	0.000
272	0.087	0.130	0.000	0.000
276	0.065	0.152	0.022	0.087
280	0.000	0.087	0.174	0.174
284	0.174	0.000	0.043	0.087
288	0.022	0.109	0.043	0.065
292	0.000	0.000	0.000	0.174
296	0.022	0.130	0.000	0.087
300	0.130	0.022	0.043	0.087
302	0.000	0.000	0.087	0.000
304	0.000	0.000	0.087	0.000
360	0.022	0.000	0.000	0.000
<i>Total de alelos = 16</i>				
<i>LEI0217</i>				
178	0.022	0.000	0.000	0.000
182	0.087	0.000	0.261	0.065
186	0.087	0.022	0.109	0.043
190	0.109	0.217	0.261	0.239
194	0.000	0.065	0.022	0.043
198	0.022	0.000	0.000	0.000
206	0.043	0.130	0.087	0.000
210	0.000	0.000	0.000	0.022
214	0.000	0.109	0.000	0.000
218	0.000	0.022	0.000	0.065
226	0.022	0.022	0.196	0.065
230	0.217	0.000	0.000	0.043
234	0.130	0.087	0.022	0.174

Tabela I. – Distribuição da frequência alélica em cada loci nas diferentes populações encontradas na Região Meio-Norte do Brasil. Alelos privados em negrito, Teresina – PI, 2009.

(conclusão)

Locus	Populações			
	Graúna	Brejeira	Nordestina	Teresina
<i>LEI0217</i>				
238	0.043	0.000	0.000	0.043
246	0.043	0.000	0.000	0.000
250	0.043	0.087	0.022	0.000
254	0.109	0.043	0.022	0.087
258	0.000	0.043	0.000	0.000
262	0.000	0.065	0.000	0.000
266	0.022	0.087	0.000	0.065
274	0.000	0.000	0.000	0.043
<i>Total de alelos = 21</i>				
<i>LEI0209</i>				
129	0.000	0.000	0.000	0.065
133	0.000	0.000	0.000	0.043
137	0.000	0.000	0.152	0.022
141	0.000	0.000	0.043	0.043
145	0.000	0.022	0.000	0.043
149	0.022	0.043	0.174	0.043
153	0.174	0.152	0.261	0.239
157	0.196	0.130	0.087	0.109
161	0.152	0.065	0.000	0.043
165	0.000	0.000	0.022	0.043
169	0.065	0.087	0.152	0.152
173	0.283	0.391	0.043	0.109
177	0.022	0.065	0.065	0.000
181	0.087	0.000	0.000	0.000
233	0.000	0.043	0.000	0.043
<i>Total de alelos = 15</i>				

ANEXOS

Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação na Revista Brasileira de Zootecnia

Instruções gerais

A RBZ publica artigos científicos originais nas áreas de Aquicultura; Forragicultura; Melhoramento, Genética e Reprodução; Monogástricos; Ruminantes; e Sistemas de Produção Animal e Agronegócio. A RBZ poderá publicar, a convite, artigos de revisão de assuntos de interesse e relevância para a comunidade científica.

O envio dos manuscritos é feito exclusivamente pelo site da SBZ (<http://www.sbz.org.br>), link Revista, juntamente com a carta de encaminhamento, conforme instruções no link "Envie seu manuscrito".

O texto deve ser elaborado segundo as normas da RBZ e orientações disponíveis no link "Instruções aos autores".

O pagamento da taxa de tramitação (pré-requisito para emissão do número de protocolo), no valor de R\$ 45,00 (quarenta e cinco reais), deve ser realizado por meio de boleto bancário, disponível no site da SBZ.

A taxa de publicação para **2010** é diferenciada para associados e não-associados da SBZ. Para associados, a taxa é de R\$ 140,00 (até 8 páginas no formato final) e R\$ 50,00 para cada página excedente. Uma vez aprovado o manuscrito, todos os autores devem estar em dia com a anuidade da SBZ do ano corrente, exceto coautor que não milita na área, desde que não seja o primeiro autor e que não publique mais de um artigo no ano corrente (reincidência). Para não-associados, serão cobrados R\$ 110,00 por página (até 8 páginas no formato final) e R\$ 220,00 para cada página excedente.

No processo de publicação, os artigos são avaliados por revisores *ad hoc* indicados pelo Conselho Científico, composto por profissionais qualificados na área e coordenados pelo Conselho Editorial da RBZ. A política editorial da RBZ consiste em manter o alto padrão científico das publicações, por intermédio de colaboradores de elevado nível técnico. O Editor-Chefe e o Conselho Científico, em casos especiais, têm autonomia para decidir sobre a publicação do artigo.

Idioma: português ou inglês

Formatação de texto

O texto deve ser digitado em fonte Times New Roman 12, espaço duplo (exceto Resumo, Abstract e Tabelas, que devem ser elaborados em espaço 1,5), margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5; 2,5; 3,5; e 2,5 cm, respectivamente.

O manuscrito pode conter até 25 páginas. As linhas devem ser numeradas da seguinte forma: Menu ARQUIVO/ CONFIGURAR PÁGINA/LAYOUT/NÚMEROS DE LINHA.../ NUMERAR LINHAS e a paginação deve ser contínua, em algarismos arábicos, centralizada no rodapé.

Estrutura do artigo

O artigo deve ser dividido em seções com título centralizado, em negrito, na seguinte ordem: Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos (opcional) e Referências.

Não são aceitos subtítulos. Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.

Título

Deve ser preciso, sucinto e informativo, com 20 palavras no máximo. Digitá-lo em negrito e centralizado, segundo o exemplo: **Valor nutritivo da cana-de-açúcar para bovinos em crescimento**. Deve apresentar a chamada "1" somente quando a pesquisa foi financiada. Não citar "parte da tese..."

Autores

A RBZ permite até **oito autores**. A primeira letra de cada nome/sobrenome deve ser maiúscula (Ex.: Anacleto José Benevenuto). Não listá-los apenas com as iniciais e o último sobrenome (Ex.: A.J. Benevenuto).

Digitar o nome dos autores separados por vírgula, centralizado e em negrito, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, indicando apenas a instituição à qual estavam vinculados à época de realização da pesquisa (instituição de origem), e não a atual. Não citar vínculo empregatício, profissão e titulação dos autores. Informar o endereço eletrônico somente do responsável pelo artigo.

Resumo

Deve conter no máximo 1.800 caracteres com espaços. As informações do resumo devem ser precisas e informativas. Resumos extensos serão devolvidos para adequação às normas.

Deve sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. Não deve conter introdução. Referências bibliográficas nunca devem ser citadas no resumo.

O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço 1,5, começando por RESUMO, iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

Abstract

Deve aparecer obrigatoriamente na segunda página e ser redigido em inglês científico, evitando-se traduções de aplicativos comerciais.

O texto deve ser justificado e digitado em espaço 1,5, começando por ABSTRACT, em parágrafo único, iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

Palavras-chave e Key Words

Apresentar até seis (6) palavras-chave e key words imediatamente após o resumo e abstract, respectivamente, em ordem alfabética. Devem ser elaboradas de modo que o trabalho seja rapidamente resgatado nas pesquisas bibliográficas. Não podem ser retiradas do título do artigo. Digitá-las em letras minúsculas, com alinhamento justificado e separadas por vírgulas. Não devem conter ponto-final.

Introdução

Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaços, resumindo a contextualização breve do assunto, as justificativas para a realização da pesquisa e os objetivos do trabalho. Evitar discussão da literatura na introdução. A comparação de hipóteses e resultados deve ser feita na discussão.

Trabalhos com introdução extensa serão devolvidos para adequação às normas.

Material e Métodos

Se for pertinente, descrever no início da seção que o trabalho foi conduzido de acordo com as normas éticas e aprovado pela Comissão de Ética e Biosegurança da instituição.

Descrição clara e com referência específica original para todos os procedimentos biológicos, analíticos e estatísticos. Todas as modificações de procedimentos devem ser explicadas.

Resultados e Discussão

Os resultados devem ser combinados com discussão. Dados suficientes, todos com algum índice de variação, devem ser apresentados para permitir ao leitor a interpretação dos resultados do experimento. A discussão deve interpretar clara e concisamente os resultados e integrar resultados de literatura com os da pesquisa para proporcionar ao leitor uma base ampla na qual possa aceitar ou rejeitar as hipóteses testadas.

Evitar parágrafos soltos e citações pouco relacionadas ao assunto.

Conclusões

Devem ser redigidas no presente do indicativo, em parágrafo único e conter no máximo 1.000 caracteres com espaço.

Não devem ser repetição de resultados. Devem ser dirigidas aos leitores que não são necessariamente profissionais ligados à ciência animal. Devem resumir claramente, sem abreviações ou citações, o que os resultados da pesquisa concluem para a ciência animal.

Agradecimentos

Esta seção é opcional. Deve iniciar logo após as Conclusões.

Abreviaturas, símbolos e unidades

Abreviaturas, símbolos e unidades devem ser listados conforme indicado na página da RBZ, link "Instruções aos autores", "Abreviaturas".

Deve-se evitar o uso de abreviações não-consagradas, como por exemplo: "o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6". Este tipo de redação é muito cômoda para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor.

Tabelas e Figuras

É imprescindível que todas as tabelas sejam digitadas segundo menu do Word "Inserir Tabela", em células distintas (não serão aceitas tabelas com valores separados pelo recurso ENTER ou coladas como figura). Tabelas e figuras enviadas fora de normas serão devolvidas para adequação.

Devem ser numeradas sequencialmente em algarismos arábicos e apresentadas logo após a chamada no texto.

O título das tabelas e figuras deve ser curto e informativo, evitando a descrição das variáveis constantes no corpo da tabela.

Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses.

Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas, que deve ser referenciada.

As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

As figuras devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição e possíveis correções.

Usar linhas com no mínimo 3/4 ponto de espessura.

As figuras deverão ser exclusivamente monocromáticas.

Não usar negrito nas figuras.

Os números decimais apresentados no interior das tabelas e figuras devem conter vírgula, e não ponto.

Citações no texto

As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar & (e comercial) e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al.

Comunicação pessoal (ABNT-NBR 10520).

Não fazem parte da lista de referências, por isso são colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão "comunicação pessoal", a data da comunicação, o nome, estado e país da instituição à qual o autor é vinculado.

Referências

Baseia-se na Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 6023).

As referências devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es).

Digitá-las em espaço simples, alinhamento justificado e recuo até a terceira letra a partir da segunda linha da referência. Para formatá-las, siga as seguintes instruções:

No menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO... RECUO ESPECIAL, opção DESLOCAMENTO... 0,6 cm.

Em obras com dois e três autores, mencionam-se os autores separados por ponto-e-vírgula e, naquelas com mais de três autores, os três primeiros vêm seguidos de et al. As iniciais dos autores não podem conter espaços. O termo et al. não deve ser italizado nem precedido de vírgula.

Indica(m)-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes.

O recurso tipográfico utilizado para destacar o elemento título é negrito e, para os nomes científicos, itálico.

No caso de homônimos de cidades, acrescenta-se o nome do estado (ex.: Viçosa, MG; Viçosa, AL; Viçosa, RJ).

Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva

A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente.

Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

Livros e capítulos de livro

Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação.

Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.].

Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.I.: s.n.].

LINDHAL, I.L. Nutrición y alimentación de las cabras. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **Fisiología digestiva y nutrición de los ruminantes**. 3.ed. Zaragoza: Acríbia, 1974. p.425-434.

NEWMANN, A.L.; SNAPP, R.R. **Beef cattle**. 7.ed. New York: John Wiley, 1997. 883p.

Teses e Dissertações

Recomenda-se não citar teses e dissertações, procurando referenciar sempre os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados. Excepcionalmente, se necessário, citar os seguintes elementos: autor, título, ano, página, nível e área do programa de pós-graduação, universidade e local.

CASTRO, F.B. **Avaliação do processo de digestão do bagaço de cana-de-açúcar auto-hidrolisado em bovinos**. 1989. 123f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SOUZA, X.R. **Características de carcaça, qualidade de carne e composição lipídica de frangos de corte criados em sistemas de produção caipira e convencional**. 2004. 334f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Boletins e relatórios

BOWMAN, V.A. **Palatability of animal, vegetable and blended fats by equine**. (S.L.): Virginia Polytechnic Institute and State University, 1979. p.133-141 (Research division report, 175).

Artigos

O nome do periódico deve ser escrito por extenso. Com vistas à padronização deste tipo de referência, não é

necessário citar o local; somente volume, número, intervalo de páginas e ano.

MENEZES, L.F.G.; RESTLE, J.; BRONDANI, I.L. et al. Distribuição de gorduras internas e de descarte e componentes externos do corpo de novilhos de gerações avançadas do cruzamento rotativo entre as raças Charolês e Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.2, p.338-345, 2009.

Congressos, reuniões, seminários etc

Citar o mínimo de trabalhos publicados em forma de resumo, procurando sempre referenciar os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados.

CASACCIA, J.L.; PIRES, C.C.; RESTLE, J. Confinamento de bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30., 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.468.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [1999]. (CD-ROM).

Artigo e/ou matéria em meios eletrônicos

Na citação de material bibliográfico obtido via internet, o autor deve procurar sempre usar artigos assinados, sendo também sua função decidir quais fontes têm realmente credibilidade e confiabilidade.

Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão "Disponível em:" e a data de acesso do documento, precedida da expressão "Acesso em:".

NGUYEN, T.H.N.; NGUYEN, V.H.; NGUYEN, T.N. et al. [2003]. Effect of drenching with cooking oil on performance of local yellow cattle fed rice straw and cassava foliage. **Livestock Research for Rural Development**, v.15, n.7, 2003. Disponível em: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd15/7/nhan157.htm>> Acesso em: 28/7/2005.

REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral en rumiantes**. Disponível em: <http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf> Acesso em: 12/10/2002.

SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPE, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21/1/1997.

Editorial Policies and Procedures

The mission of the Animal Genetic Resources Information Bulletin (AGRI) is the promotion of information on the better use of animal genetic resources of interest to food and agriculture production, under the Global Strategy for the Management of Farm Animal Genetic Resources. All aspects of the characterization, conservation and utilization of these resources are included, in accordance with the Convention on Biological Diversity. AGRI will highlight information on the genetic, phenotypic and economic surveying and comparative description, use, development and maintenance of animal genetic resources; and on the development of operational strategies and procedures which enable their more cost-effective management. In doing this AGRI will give special attention to contributions dealing with breeds and procedures capable of contributing to the sustainable intensification of the world's medium to low input production environments (agro-ecosystems), which account for the substantial majority of the land area involved in livestock production; the total production of food and agriculture from livestock; and of our remaining farm animal genetic resources.

Views expressed in the paper published in AGRI represent the opinions of the author(s) and do not necessarily reflect those of the institutions which the authors are affiliated, FAO or the Editors.

The suitability of manuscripts for publication in AGRI is judged by the Editors and reviewers.

Electronic Publication

AGRI is available in full electronically on the Internet, in addition to being published in hard copy, at: <<<http://www.fao.org/dad-is>>>

Types of Articles

The following types of articles are published in AGRI.

Research articles

Findings of work on characterization, conservation and utilization of farm animal genetic resources (AnGR) in well described production environments, will be considered for publication in AGRI. Quality photographs of these genetic resources viewed in the primary production environment to which they are adapted, accompanying the manuscripts are encouraged.

Review articles

Unsolicited articles reviewing agro-ecosystems, country-level, regional or global developments on one or more

aspects of the management of animal genetic resources, including state-of-the-art review articles on specific fields in AnGR, will be considered for publication in AGRI.

Position papers

Solicited papers on topical issues will also be published as deemed required.

Other published material

This includes book reviews, news and notes covering relevant meetings, training courses and major national, regional and international events and conclusions and recommendations associated with the outcomes of these major events. Readers are encouraged to send such items to the editors.

Guidelines for Authors

Manuscript submission

Manuscripts prepared in English, French or Spanish with an English summary and another summary in either French or Spanish, should be submitted to AGRI Editor, AGAP, FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italy. Additionally the manuscript must be sent as a WinWord Electronic Mail attachment to agri-bulletin@fao.org. Photographs, coloured or black and white, and figures must be always sent by mail.

Manuscripts should be typed double-spaced and with lines numbered in the left margin. All pages, including those of references, tables etc., must be consecutively numbered. The corresponding author is notified of the receipt of a manuscript.

For manuscripts that are accepted after revision, authors are encouraged to submit a last version (3½" disc format) in Word 6.0 for Windows of their revised manuscript along with the printed copy.

Preparation of the manuscript

The first page of the manuscript must include the running head (abbreviated title), title, names of authors, institutions, full addresses including postal codes and telephone number and other communication details (fax, e-mail, etc.) of the corresponding author. The running head not exceeding 45 characters plus spaces, should appear at the top of page 1 of the manuscript entirely in capital letters. The title of the manuscript is typed in upper and lower case letters. The title should be as brief as possible not exceeding 150 characters (including spaces) with species names when applicable. Authors, institutions and addresses are in upper and lower case italics. There is one blank line between the title and the authors.

Addresses are typed as footnotes to the authors after leaving one blank line. Footnotes are designated numerically. Two lines are left below the footnotes.

Headings

Headings of sections, for example Summary, Introduction, etc., are left-justified. Leave two blank lines between addresses footnotes and Summary and between the heading Summary and its text. Summary should not exceed 200 words. It should be an objective summary briefly describing the procedures and findings and not simply stating that the study was carried on such and such and results are presented, etc. Leave one line between the summary text and Keywords which is written in italics as well as the keywords themselves. All headings of sections (14 regular) and sub-sections (12 regular) are typed bold and preceded and succeeded by one blank line and their text begins with no indentation. The heading of a sub-subsection is written in italics, and ends with a dot after which the text follows on the same line. Keywords come immediately after the summaries. They should be no more than six, with no “and” or “&”.

Tables and figures

Tables and figures must be enclosed with the paper and attached at the end of the text according their citation in the document. Photos will not be returned

Tables

Tables, including footnotes, should be preceded and succeeded by 2 blank lines. Table number and caption are written, above the table, in italics (12) followed by a dot, then one blank line. For each column or line title or sub-title, only the 1st letter of the 1st word is capitalized. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals. Tables and captions should be left justified as is the text. Use horizontal or vertical lines only when necessary. Do not use tabs or space-bar to create a table but only the appropriate commands.

Figures

Figures including titles and legends should be preceded and succeeded by two blank lines. Figure number and

title are written, below the figure, in italics (12) and end with a dot. The term figures includes photos, line drawings, maps, diagrams etc.

All the submitted diagrams, must be accompanied with the original matrix of the data used to create them. It is strongly advised to submit diagrams in Word 6.0 or Excel 5.0. Figures should be numbered consecutively in Arabic numerals.

References

Every reference cited in the text should be included in the reference list and every reference in the reference list should have been mentioned in the text at least once. References should be ordered firstly alphabetically by the first author’s surname and secondly by year.

- Example for reference in a periodical is: Köhler-Rollefson, I. 1992. The camel breeds of India in social and historical perspective. *Animal Genetic Resources Information* 10, 53–64.
- When there are more than one author: Matos, C.A.P., D.L. Thomas, D. Gianola, R.J. Tempelman & L.D. Young. 1997. Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: 1. Estimation of genetic parameters 75, 76–87.
- For a book or an ad hoc publication, e.g., reports, theses, etc.: Cockrill, W.R. (Ed.). 1994. *The Husbandry and Health of the Domestic Buffalo*. FAO, Rome, Italy, pp 993.
- For an article in the proceedings of a meeting: Hammond, K. 1996. FAO’s programme for the management of farm animal genetic resources. In C. Devendra (Ed.), *Proceedings of IGA/FAO Round Table on the Global Management of Small Ruminant Genetic Resources*, Beijing, May 1996, FAO, Bangkok, Thailand, 4-13.
- Where information included in the article has been obtained or derived from a World Wide Web site, then quote in the text, e.g. “derived from FAO. 1996” and in the References quote the URL standard form: FAO. 1996. *Domestic Animal Diversity Information System*, <http://www.fao.org/dad-is/>, FAO, Rome, Italy.

For all future manuscript dispatch and correspondence regarding AGRI, please use the following mailbox:

agri-bulletin@fao.org

Thanks for the collaboration

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)