

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Débora Araújo de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE GALINHAS
NATIVAS CANELAS-PRETA**

**DIAMANTINA - MG
2016**

Débora Araújo de Carvalho

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE GALINHAS
NATIVAS CANELAS-PRETA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Pro.^a Dr.^a Cristina Moreira Bonafé

Coorientadora: Pesq.^a Dr.^a Maria Del Pilar Rodriguez-Rodriguez

Coorientador: Pesq. Dr. Marcos Jacob de Oliveira Almeida

**DIAMANTINA – MG
2016**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

C331c	<p>Carvalho, Débora Araújo de Caracterização fenotípica e genotípica de galinhas nativas Canelas-Preta / Débora Araújo de Carvalho. – Diamantina, 2016. 71 p. : il.</p> <p>Orientador: Cristina Moreira Bonafé Coorientadores: Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez, Marcos Jacob de Oliveira Almeida</p> <p>Dissertação (Mestrado – Curso de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Diversidade fenotípica. 2. Estrutura de populações. 3. Gallus gallus. 4. Microsatélites. 5. Recursos genéticos. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 636.5</p>
-------	--

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Débora Araújo de Carvalho

**VARIABILIDADE GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE GALINHAS
CAIPIRAS DA RAÇA NATIVA CANELAS-PRETA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Moreira Bonafé

Data de aprovação 01/03/2016.

Prof^a. Dra. Cristina Moreira Bonafé
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

Prof^a. Dra. Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM

Dr. Marcos Jacob de Oliveira Almeida
Embrapa Meio-Norte

Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Prof. Dr. Martinho Almeida Silva
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Diamantina

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo propósito debaixo do céu:

Há tempo de nascer e tempo de morrer; tempo de plantar e tempo de arrancar o que se plantou.

Tempo de matar e tempo de curar; tempo de derribar e tempo de edificar;

Tempo de chorar e tempo de rir; tempo de prantear e tempo de saltar de alegria.

Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar e tempo de perder; tempo de guardar e tempo de jogar fora.

Tempo de rasgar e tempo de coser; tempo de estar calada e tempo de falar.

Tempo de amar e tempo de aborrecer; tempo de guerra e tempo de PAZ.

Eclesiastes 3: 1 a 8

A Ti Senhor Deus Jeová, que determinaste esse tempo de conquistas para mim...

Ofereço.

Aos meus pais, meus irmãos e ao eterno amigo, orientador e exemplo de profissional Professor Aldrin Vieira Pires (*im memoriam*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade que me concedeu de realizar essa pesquisa de dissertação, graças a isso nova etapa na minha vida se inicia agora.

À minha família pela colaboração, confiança e incentivo.

Aos meus pais Josimar Carvalho e Euraide Carvalho, pelo apoio dispensado a mim, pelas muitas orações intercedendo a Deus pela minha pessoa, com isso conseguir concluir com êxito mais uma etapa importante da minha vida.

Às minhas queridas e amadas irmãs Sara Carvalho, Raquel Carvalho, Miriam Carvalho, Abigail Carvalho, ao maninho Isaac Carvalho e os meus cunhados Diógenes Ribeiro e Deusilano Rolim pelo carinho, compreensão e estímulo. Pela contribuição financeira, espiritual e afetiva durante todo o tempo que precisei.

Aos professores Cristina Moreira Bonafé, Aldrin Vieira Pires (*In memoriam*), Marcos Jacob de Oliveira Almeida e Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez, sinto-me privilegiada por sido acompanhada por vários orientadores. Vocês são exemplo de profissionais, agradeço pela confiança, pelos ensinamentos, pela preocupação com o meu bem-estar e desenvolvimento da pesquisa. A todos vocês minha sincera gratidão.

Ao professor Martinho Almeida Silva pela demonstração de amor pelo que faz, percebível principalmente quando ministra suas aulas, sabe, aprendi a admirar mais ainda e a amar o melhoramento animal a partir do momento que comecei a assistir suas aulas. Gostaria muito de ser uma profissional semelhante a você. Me esforçarei para conseguir tal proeza.

Ao professor José Lindenberg Sarmiento por ter me recebido na UFPI com todo carinho e atenção, mobilizando sua equipe, através dos professores Max Brandão e Fabio Britto, para me auxiliar nas análises estatísticas do trabalho, estes últimos também foram bem prestativos e me ajudaram muito, além do que pensei. A vocês o meu muito obrigado.

A querida família GMA da UFVJM, a cada integrante minha gratidão por tê-los conhecidos, orgulho de ter feito parte dessa família que só admiro pela união, comprometimento com a pesquisa, que não mede esforços no trabalho, o meu muito obrigado pelos momentos juntos de muito trabalho e também de muitas risadas.

Ao querido amigo Elvis Miranda que sempre esteve disponível para me auxiliar nas revisões do português dos vários trabalhos feitos durante esses dois anos, sempre prestativo e rápido nas correções. A você meu amigo, muito obrigado.

À família Presbiteriana do Brasil em Diamantina – MG, por ter me recebido como membro em sua congregação. Ao Pastor Eliomar Ferreira e sua linda esposa Luciana Ferreira por ter cuidado de mim como filha durante esses anos, pelas muitas orações que fizeram por mim. A cada membro dessa bela igreja que está no meu coração, a minha gratidão a Deus por ter convivido com vocês, Jesus continue os abençoando a cada dia.

Aos integrantes do projeto “Produtores do Futuro” Pacelli Rodrigues, Darllan, Carmem Lúcia, Abigail Carvalho, Francisco Flavio Costa e mais uma vez Marcos Jacob de Oliveira Almeida pela colaboração na coleta das amostras a campo, pelo comprometimento e respeito, pela troca de experiências, pelo esforço e dedicação durante todas as viagens que foram necessárias para coleta de dados a campo. Vocês são demais.

Aos produtores de galinhas Canelas-Preta dos municípios de Teresina, Oeiras e Queimada – Nova / PI, que gentilmente nos receberam em seus lares para coletarmos os dados das galinhas. Pelos lanches e almoços deliciosos, sempre feitos com muito amor e carinho. A vocês, guerreiros, minha admiração e gratidão.

À EMBRAPA Meio-Norte pelo apoio logístico durante as coletas de dados a campo. A empresa de assistência técnica EMPLANTA no Piauí pelo suporte a campo. Essa pesquisa só foi possível em razão do trabalho em parceria da UFVJM, EMPLANTA e EMBRAPA via Projeto Produtores do Futuro, demonstrando que a parceria faz a força e toda a diferença.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM pela oportunidade maravilhosa de fazer parte do quadro de alunos desta instituição de excelente ensino e referência!

À Elizângela Aparecida Saraiva, secretária da pós-graduação em Zootecnia pelo carinho, sempre atenciosa e disposta a ajudar.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À toda a minha família e amigos que torceram por mim, seja em pensamento, palavra ou oração, 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)

RESUMO

Canelas-preta são galinhas nativas brasileiras, encontradas no estado do Piauí e provavelmente em outros estados do Nordeste. Caracteriza-se por possuir carne de coloração escura. Sua plumagem é predominantemente preta, com variações de cores na região do pescoço (branco, dourado e preto) e a cor do dorso é preta. São criadas em sistema tradicionais, a campo. São aves que apresentam pouca exigência em manejo, aparentemente são rústicas e resistentes às doenças e parasitas. Objetivou-se caracterizar geneticamente com uso de doze *loci* de microssatélites as galinhas nativas Canelas-Preta do estado do Piauí e, também, caracterizar e analisar a diversidade fenotípica dessas aves com base em descritores fenotípicos. Para caracterização genética e fenotípica foram utilizadas, respectivamente, 118 e 116 aves de três municípios do estado. Para as análises genéticas foram utilizados 12 *loci* de microssatélites e para as análises fenotípicas foram usados 32 descritores morfológicos, sendo 21 quantitativos e 11 qualitativos. Para o estudo genético foram estimadas frequências alélicas em cada loco, heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o), ocorrência do equilíbrio de Hardy-Weinberg, número efetivo de populações e valores de PIC. Também foram realizadas as análises da estatística F pela análise do FIS (coeficiente de endogamia), AMOVA e componentes principais. Foi gerada uma matriz de dissimilaridade, gráfico de dispersão. A análise de estrutura populacional foi realizada usando o software STRUCTURE. Na caracterização fenotípica, os caracteres quantitativos foram submetidos a uma análise de variância. A análise estatística foi feita utilizando o método dos quadrados mínimos tendo sido realizadas análise da média, mínimo, máximo e coeficiente de variação de cada variável e para cada núcleo. A diversidade genética foi obtida por meio da análise de agrupamento. As galinhas nativas Canelas-Preta, apresentaram elevada variabilidade genética para os *loci* analisados, o que mostra a conservação desse material genético. Foi possível verificar a existência de alta variabilidade genética intrapopulacional, o que indica que os núcleos foram formados com suficiente variabilidade genética (efeito fundador). Essa elevada diferenciação genética dentro das populações somada a baixa diferenciação entre as populações, permite afirmar que os indivíduos analisados pertencem a único grupo genético. As galinhas Canelas-Preta apresentam características de aves nativas, uma vez que mostraram semelhança nas distribuições dos descritores qualitativos entre os núcleos amostrados e variação na frequência desses descritores dentro de cada núcleo, isso a caracteriza como raça e fenotipicamente estruturada, com padrões uniformes. Possuem características fenotípicas quantitativas de elevado, médio e pequeno coeficiente de variação, que revela a riqueza genética da raça e as qualifica para programas de conservação, utilização e melhoramento dos recursos genéticos.

PALAVRAS CHAVES: Diversidade fenotípica, Estrutura de populações, *Gallus gallus*, Microssatélites, Recursos genéticos.

ABSTRACT

Canelas-preta are Brazilian native chickens, found in the state of Piauí and probably in other states of the Northeast, characterized by having dark colored meat. The plumage is predominantly black with color variations in the hackle (white, gold and black) and the back color is black. These birds are raised in extensive system, allowing little demand in management, being apparently rustics and resistant to diseases and parasites. This study aimed to characterize genetically Canelas-Preta native chickens of the Piauí state by using twelve microsatellite *loci* and also to characterize and analyze the phenotypic diversity of these birds based on phenotypic descriptors. For genetic and phenotypic characterization were used, respectively, 118 and 116 birds from three towns of the state. For the genetic analyzes were used 12 microsatellite *loci* and for phenotypic analyzes were used 32 morphological descriptors: 21 quantitative and 11 qualitative. For the genetic study, allele frequencies at each locus, expected heterozygosity (H_e) and observed (H_o), the occurrence of Hardy-Weinberg equilibrium, effective number of populations and PIC values were estimated. Furthermore, also it have been carried out F statistical analyzes by the analysis of FIS (inbreeding coefficient), AMOVA and main components. One dissimilarity matrix and a scatter plot were generated. The population structure analysis was performed using the STRUCTURE software. In the phenotypic characterization, quantitative characters were subjected to an analysis of variance. The statistical analysis was done by using the method of least squares, the analysis of average, minimum, maximum and coefficient of variation of each variable and for each core was performed. Genetic diversity was obtained by cluster analysis. The Canelas-Preta native chickens presented a high genetic variability for the *loci* analyzed, which shows the conservation of this genetic material. It was possible to verify the existence of high intrapopulation genetic variability, indicating that the nuclei were formed with sufficient genetic variability (founder effect). This high genetic differentiation within populations coupled with lower differentiation among populations, allows affirming that individuals analyzed belong to single genetic group. The Canelas-Preta native chicken have characteristics of native birds, once there was demonstration of similarity in the distributions of qualitative descriptors between sampled cores and variation in the frequency of those descriptors within each core, so this characterize the Canelas-Preta as a phenotypically structured breed with uniform patterns. This breed has quantitative phenotypic characteristics of high, medium and low coefficient of variation, which reveals its genetic wealth and qualify them for conservation programs, use and improvement of genetic resources.

KEYWORDS: Phenotypic diversity, Structure of populations, *Gallus gallus*, Microsatellite, Genetic resources.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Reprodutor e matriz Canelas-Preta do núcleo de Queimada-Nova/PI.....19

ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA

Figura 1 - Mapa de localização das amostras indicando o município onde cada amostra foi coletada dentro do estado do Piauí. Núcleos de galinhas Canelas-Preta em Teresina, Oeiras e Queimada –Nova.....31

Figura 1 - Dendograma obtido a partir da distancia Euclidiana Média pelo método de agrupamento *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA) para os três grupos genéticos de galinhas.....36

ARTIGO 2 - ANALISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE DOZE *LOCI* DE MICROSSATÉLITES EM GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA

Figura 2 - Mapa de localização das amostras indicando o município onde cada amostra foi coletada dentro do estado do Piauí. Núcleos de galinhas Canelas-Preta em Teresina, Oeiras e Queimada –Nova.....45

Figura 2 - Perfil eletroforetico em gel de poliacrilamida mostrando os doze marcadores microssatélites otimizados para galinhas Canelas-Preta; (50pb = Marcador de50pb).....48

ARTIGO 3 - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA

Figura 3 - Mapa de localização das amostras indicando o município onde cada amostra foi coletada dentro do estado do Piauí. Núcleos de galinhas Canelas-Preta em Teresina, Oeiras e Queimada –Nova.....60

Figura 2 - Dispersão gráfica das distancias intra populacional dos três núcleos de galinhas Canelas-Preta (Teresina, Oeiras e Queimada Nova) em relação aos eixos cartesianos estabelecidos pelos componentes principais (PC₁ e PC₂) baseada na matriz de dissimilaridade.....66

Figura 3 - (A) Representação gráfica do valor de K para a formação de grupos de galinhas Canelas-Preta. Os resultados indicam partição de ideal de grupos K= 4. (B) 1- Queimada-Nova; 2- Oeiras; 3- Teresina. Análise de estrutura populacional de 118 indivíduos representando quatro grupos de galinhas Canelas-Preta com base em doze marcadores de microssatélites.....67

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA

Tabela 1 - Medidas corporais consideradas para caracterização das galinhas nativas Canelas-Preta.....39

Tabela 2 - Características fenotípicas qualitativas das galinhas nativas (quantitativo e percentual).....40

Tabela 3 - Características biométricas analisadas dos 116 indivíduos.....40

Tabela 4 - Resultado do teste de significância da variação das características quantitativas em relação à população e sexo.....41

ARTIGO 2 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE DOZE *LOCI* DE MICROSSATÉLITES EM GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA

Tabela 1 - Descrição dos *Loci* de Microssatélites utilizado no estudo da caracterização genética de galinhas Canelas-preta.....54

Tabela 1 - Polimorfismo de 12 *loci* de microssatélites em 118 amostras de DNA de galinhas Canelas-Preta.....55

ARTIGO 3 - CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA

Tabela 1 - Média e erro padrão para diversas estimativas ao longo de cada *locus* em cada População. (N = número de indivíduos; Ho = Heterozigosidade observada; He = Heterozigosidade esperada; uHe = Heterozigosidade esperada com fator de correção para tamanho amostral $[2N / (2N-1)]$; F = índice de fixação de Wright $[1 - (Ho/He)]$).....70

Tabela 2 - Estatística da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 12 *Lúcio* de microssatélites em populações de galinhas nativas Canelas-Preta dos municípios Queimada Nova, Oeiras e Teresina /PI.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMOVA	Análise de Variância Molecular
ANOVA	Análise de Variância
CCC	Coefficiente de Correlação Cofenética
cm	Centímetro
CP	Componentes Principais
CV	Coefficiente de Variação
dATP	Desoxiadenosina Tri-fosfato
dCTP	Desoxicitosina Tri-fosfato
dGTP	Desoxiguanina Tri-fosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
dTTP	Desoxitimina Tri-fosfato
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Fis	Coefficiente de Endogamia
Fit	Endogamia da População Total
Fst	Grau de Divergência entre Populações
HCL	Ácido Clorídrico
He	Heterozigosidade Esperada.
Ho	Heterozigosidade Observada.
ISAG	International Society of Animal Genetics
KCL	Cloreto de Potássio
µl	Microlitro
µM	Micromolar
MCMC	Cadeias de Markov -Monte Carlo
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MoDAD	Measurement of Domestic Animal Diversity
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
pb	Pares de Base

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogenionico
PIC	Conteúdo de Informação Polimórfica
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAS	Statistical Analysis System
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo único
SSR	Simple Sequence Repeats.
UPGMA	Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean
UV	Ultra Violeta
V	Voltagem

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Conceitos de Raça	16
2.2 Galinhas Caipiras Nativas	17
2.3 A Raça Canelas-Preta: Breve Histórico	18
2.4 Uso de Descritores Morfológicos na Caracterização de Aves Nativas	19
2.5 Análise Multivariada	20
2.6 Variabilidade e Diversidade Genética	21
2.7 Marcadores Moleculares	21
2.8 Microssatélites	22
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos	24
4 REFERÊNCIAS	24
ARTIGO 1- Caracterização Fenotípica de Galinhas Caipiras da Raça Canelas-Preta	
Resumo	28
Abstract	28
Introdução	29
Material e métodos	30
Resultados e Discussão	32
Conclusões	36

Referências	37
Anexos	39
ARTIGO 2- Análise da Variabilidade Genética de Doze <i>Loci</i> de Microssatélites em Galinhas Caipiras Nativas Canelas-Preta	
Resumo	43
Abstract	43
Introdução	44
Material e métodos	44
Resultados e Discussão	47
Conclusões	51
Referências	52
Anexos	54
ARTIGO 3 - Caracterização genética de galinhas caipiras nativas Canelas-Preta	
Resumo	57
Abstract	57
Introdução	58
Material e métodos	59
Resultados e Discussão	63
Conclusões	67
Referências	68
Anexos	70
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os permanentes avanços em genética, sanidade, nutrição, manejo e ambiência na produção de aves, utilizando tecnologias nacionais e mundiais, tem colocado o Brasil em posição de destaque no setor avícola mundial. No início do século XX, no Brasil, observou-se um grande quantitativo de importação de linhagens melhoradas com o intuito de aumentarem a produtividade de aves, atender à crescente demanda do mercado consumidor e a forte competição internacional. Nos dias atuais, as linhagens comerciais utilizadas no Brasil são oriundas da genética de aves melhoradas (FONTEQUE et al., 2014).

Essas linhagens são frutos de programas de melhoramento genético. Porém, os processos seletivos utilizados, que visam parâmetros produtivos, geralmente tornam essas linhagens muito uniformes, reduzindo assim a variabilidade genética populacional, o que pode provocar a diminuição de características relacionadas à resistência a doenças, que, de forma geral, não são consideradas em programas de melhoramento genético animal. Essa redução da variabilidade predispõe a população a se tornar mais susceptível à doenças (FONTEQUE, 2011).

Esse gargalo tem sido fonte de preocupação de pesquisadores e produtores, que buscam alternativas para manter a variabilidade genética das populações locais. Quando se têm aves sensíveis ou pouco resistentes a patógenos, essas podem estar susceptíveis a eventuais pandemias. Como exemplo, em 2005, ocorreu o caso da gripe aviária, e em consequência das aves infectadas e o risco do contágio humano, optou-se pelo abate de aproximadamente 800 milhões de aves (PADUAN, 2005). Outro fator relevante em relação às linhagens comerciais, é que, por serem selecionadas em ambientes com controle de temperatura e umidade, elas são pouco adaptadas às condições de climas quentes.

Por outro lado, as raças nativas mostram-se adaptadas a diversos ambientes. Estudos estão sendo feitos para comprovarem que essas aves são resistentes ao estresse térmico e às doenças e parasitas, pela forma que são criadas, “tipo caipira” e com pouca exigência de manejo se comparado com as linhagens comerciais, observa-se animais aparentemente mais rústicos e resistentes. Essas aves nativas foram introduzidas pelos portugueses na época da colonização do Brasil. Aqui passaram por um processo de adaptação e seleção natural por décadas, resultando em mudanças morfológicas e fisiológicas como mecanismo de adaptação a diferentes condições edafoclimáticas (FONTEQUE et al., 2014).

As raças de galinhas nativas desempenham um importante papel na cultura dos brasileiros, pois os acompanham desde a época da colonização. São criadas em regime extensivo por pequenos agricultores de todo o Brasil. Essas aves têm sido importante fonte de alimento e renda para esses pequenos agricultores. Por não exigirem grande tecnologia para sua produção, pois no campo mostram-se resistentes às condições climáticas, elas se revelam como excelente alternativa ao desenvolvimento da agropecuária no Brasil. Ressalta-se a necessidade de estudos científicos que comprovem tal hipótese (ALMEIDA et al., 2013).

Pouco se conhece sobre a variabilidade genética e fenotípica das aves nativas brasileiras. Especificamente sobre a raça Canelas-Preta ainda não se tem nenhum estudo científico. Assim, faz-se necessário pesquisas que divulguem essas aves; que auxiliem os programas de preservação, conservação e utilização dos recursos genéticos e melhoramento animal; e que subsidiem a valorização e reconhecimento dessa raça brasileira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conceitos de Raça

Pesquisadores de várias instituições e países têm buscando elucidar uma definição para o termo *raça*. Apesar de controverso, é possível conceituá-la. Há muitos anos tem-se tentado definir um conceito de raça. Segundo González Pizarrop (1903), raça seria um conjunto de indivíduos que dispõem de vários parâmetros característicos e transmissíveis a gerações. Desde então vários outros conceitos têm sido propostos.

Foi mencionado no volume do FAO World Watch List por Scherf (SCHERF, 2000), onde o autor conceitua raça como subespecífico grupo de animais com características externas definidas e identificáveis, o que permite que ela seja diferenciada visualmente em comparação com outros grupos da mesma espécie. Essa definição, segundo Sierra Alfranca (2001), é razoável, porém estaria incompleta, faltando dados como transmissão a descendentes e dinâmica genética, dentre outros.

Seguindo o mesmo raciocínio, aquele conceito é curto e vago, deixando brechas para outras variantes, a exemplo de grupos de animais separados pela cultura e geografia. Outros fenotipicamente semelhantes permitem que sejam aceitos para dar-lhes uma identidade distinta.

Finalmente, Sierra Alfranca (2001) define o termo raça de forma mais abrangente e absorvente ao dizer que raça é um conceito técnico-científico, identificador e diferenciador de um grupo de animais, através de um certo número de características (morfológica, produtivo, psicológico, adaptação, etc) que são transmissíveis à prole, mantendo, além disso, alguma variabilidade e dinâmica evolutiva. Esse seria o conceito mais completo e passível de aceitação, e menos livre de erros.

Outro tópico relevante sobre raças seria a diferenciação entre nativas e naturalizadas. Muitos ainda se confundem quanto a tais definições. Almeida (2007) as define com precisão ao concluir que raças nativas são aquelas que se formaram em um determinado país, mas tiveram suas bases genéticas oriundas em outros países. Já as raças naturalizadas são aquelas originadas em outros países ou região e que, introduzidas em novos países, adaptaram-se bem.

2.2 Galinhas Caipiras Nativas

Alguns pesquisadores defendem que as galinhas caipiras do Brasil possivelmente foram introduzidas antes mesmo da colonização, quando corsários franceses abasteciam seus navios com pau-brasil e os trocavam com os índios por espelho, pentes, ferramentas e galinhas que sobravam de suas dispensas. Porém, grande parte dos pesquisadores defendem que as galinhas foram introduzidas por volta de 1500 pelos navegadores europeus que desembarcaram aqui no Brasil. Essas aves foram mantidas em quintais, sítios e fazendas, cruzando-se aleatoriamente, dando origem às galinhas nativas brasileiras (MESQUITA, 1970; FONTEQUE, et. al., 2014).

A criação das galinhas caipiras crioulas, também conhecidas como galinhas de terreiro, ainda é feita em pequena escala, em maior parte pelos agricultores familiares. Esse fator pode estar relacionado à cultura, pois as galinhas acompanharam a migração humana durante toda a colonização, o que também ocasionou o surgimento de várias novas raças. O foco da criação dessas galinhas varia de acordo com cada região ou país. No Japão, existem raças que fazem parte do Tesouro Nacional Japonês. São denominadas de raças ornamentais japonesas tradicionais (TODANO et al., 2009). Na Europa, as aves foram criadas inicialmente com o objetivo de lazer. Posteriormente, produzidas para alimentação (RODRIGUES et al., 2006).

No Brasil, as galinhas domésticas foram introduzidas durante a colonização e criadas em pequena escala. As galinhas caipiras crioulas do Brasil são conhecidas pela sua alta variabilidade genética, rusticidade, resistências a doenças, e por suas variadas colorações de penas, pernas e carnes. Tem sido fonte de alimento e renda para os agricultores familiares. As

galinhas domésticas brasileiras são da espécie naturalizada, pois aqui não as existia até provavelmente a colonização (ALBINO et al. 2001).

Nos anos de 1930 a avicultura industrial teve um importante avanço. Nesse contexto, as galinhas nativas foram sendo esquecidas (MORENG e AVENS, 1990). Porém, em 1980, houve uma valorização dos produtos naturais. Com isso, elas se tornaram potencialmente lucrativas, pois são criadas de forma mais semelhante ao sistema orgânico. Considerada uma iguaria, a galinha caipira é muito apreciada em todo o Brasil, obtendo preços diferenciados e uma demanda crescente por seus produtos (carnes e ovos), principalmente por consumidores que buscam alimentos produzidos em sistemas naturais (CARVALHO, et. al., 2015).

2.3 A raça Canelas-Preta: Breve histórico

As primeiras galinhas Canelas-Preta, também conhecidas como galinhas “Jacu”, foram detectadas no ano de 2008, na cidade de Curral Novo, estado do Piauí, município localizado no Semiárido, próximo à região do Araripe Pernambucano. Essas aves estão presentes em comunidades quilombolas, indígenas e em pequenas propriedades rurais em todo estado do Piauí. Neste mesmo ano foram adquiridas no município de Queimada Nova e entorno, aves para a formação dos primeiros núcleos de conservação e multiplicação.

Figura 1 - Reprodutor e matriz Canelas-Preta do núcleo de Queimada-Nova/PI.



(FONTE: MARCOS JACOB)

Essa raça se caracteriza por possuir uma carne de coloração diferenciada (escura) e de sabor mais acentuado, muito apreciado pela população local. Sua plumagem é

predominantemente preta, com variações de cores na região do pescoço (branco, dourado, preto e vermelho), e a cor do dorso é preta.

Em 2015, existiam 16 (dezesesseis) municípios do Piauí com núcleos de galinhas Canelas-Preta em áreas de produtores de referência. As aves dos núcleos dos municípios de Queimada Nova, Oeiras e Teresina têm sido objeto de pesquisa, pois se acredita que galinhas caipiras brasileiras são rústicas e apresentam elevada variabilidade genética. Assim, torna-se importante que se desenvolvam trabalhos científicos que certifiquem tal hipótese para validar a manutenção e conservação dessas aves.

2.4 Uso de descritores morfológicos na caracterização de aves nativas

A obtenção de medidas morfométricas de uma determinada raça auxilia na sua definição fenotípica, inclusive no que tange à elucidação do seu porte e aptidão, parâmetros esses relevantes para programas de seleção. Nos dias atuais, o estudo da diversidade por meio de descritores fenotípicos ainda é relevante, principalmente pela sua importância econômica (CRUZ et. al., 2011).

A caracterização fenotípica baseada em descritores morfológicos é uma das principais etapas de programas de conservação de raças (MARIANTE & CAVALCANTE, 2006). Porém, outros parâmetros devem ser considerados na caracterização de uma raça, como informações genéticas, distribuição geográficas, aptidões produtivas e características comportamentais.

Na caracterização fenotípica de aves nativas, os parâmetros usualmente mais utilizados são: comprimento do corpo, envergadura, comprimento e largura da crista; comprimento e largura do bico; comprimento e largura da barbela; comprimento do peito; comprimento da asa; comprimento da coxa; comprimento do dedo do pé e comprimento e diâmetro do tarso. Há ainda as características qualitativas como plumagem do corpo, tipo de crista, cor da canela, cor dos olhos, cor da crista e cor da barbela (ALMEIDA, 2013).

O uso de descritores morfológicos quantitativos e qualitativos tem sido utilizado com frequência em estudos de caracterização e diversidade em espécies animais. Méndez et al., (2011) utilizou 26 medidas morfométricas em estudos de diversidade genética de galinhas nativas da Espanha. Almeida (2013) utilizou 33 descritores fenotípicos, sendo 24 quantitativos e nove qualitativos para caracterizar a raça de galinha nativa Peloco do estado da Bahia-Brasil.

2.5 Análise Multivariada

Análise multivariada é uma metodologia estatística que utiliza simultaneamente os dados de todas as variáveis resposta na interpretação de um conjunto de dados, considerando a correlação entre elas. Os dados podem ser qualitativos ou quantitativos. Os métodos estatísticos são selecionados de acordo com objetivo da pesquisa, pois cada método tem sua fundamentação teórica e aplicabilidade peculiares. Um ponto relevante da análise multivariada é o aproveitamento da informação conjunta das variáveis envolvidas (ALMEIDA, 2013).

No estudo de diversidade genética, os métodos mais utilizados são: análise por variáveis canônicas, análise por componentes principais e os métodos de agrupamento (OLIVEIRA et al., 2003). Dados qualitativos utilizam técnicas estatísticas diferentes dos dados quantitativos, qualitativos são parâmetros categóricos que identificam o indivíduo, enquanto os dados quantitativos descrevem numericamente o indivíduo. As técnicas de análise multivariadas têm sido usadas em estudos de diversidade genética em aves, analisando parâmetros de desempenho e reprodução. Isso em aves comerciais.

Porém, em aves crioulas, essas pesquisas ainda são poucas (BEZERRA NETO et al., 2010; PIRES et al., 2002).

2.6 Variabilidade e Diversidade Genética

O estudo da variabilidade e diversidade genética é de suma importância para os grupos de conservação de recursos genéticos e também para os programas de melhoramento. Variabilidade genética mede a variação de diferentes alelos do mesmo gene, em uma determinada população. Diversidade genética mede a quantidade total das variações genéticas intra ou entre populações da mesma espécie. Um dos fatores que mais influenciam a variabilidade genética é a mutação (SNUSTTAD et al., 2001).

É relevante mensurar a variabilidade genética por se encontrar diretamente relacionada com a manutenção da variabilidade inter-racial, o que se evita a extinção de raças e a erosão genética. As galinhas naturalizadas brasileiras são fonte de variabilidade importante para os programas de melhoramento, pois podem guardar características fenotípicas e genotípicas das aves que foram introduzidas no Brasil no período da colonização (MENEZES, 2005).

As aves crioulas adquiriram ao longo do tempo características fenotípicas diferentes. Possuem grande adaptabilidade às condições de baixa tecnologia relacionadas à instalação e

alimentação. Podem ingerir alimentos fibrosos que as possibilitam resistir a fatores ambientais adversos (CLEMENTINO,2010).

A introdução de aves melhoradas no sistema tradicional de criação, no regime extensivo tende a fazer com que esse material desapareça, uma vez que há um cruzamento desordenado entre elas, sem nenhum critério de preservação. Por sua vez, as raças nativas possuem importância regional, pois, se submetidas às corretas práticas de manejo, fornecem um produto agroecológico e fortalecem a segurança alimentar (SAGRILO, 2002).

2.7 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados. Os primeiros marcadores utilizados em estudos genéticos foram as isoenzimas, baseados no polimorfismo de proteínas, útil por algum tempo para mensurar a distância genética e diferenciação entre raças nativas. Porém, esses marcadores revelavam polimorfismo resultante da expressão de genes funcionais, o que poderia desqualificar a variabilidade genética dessas populações, haja vista a constatação de que o material mostrava um baixo conteúdo de informações polimórficas (MARIANTE e CAVALCANTE, 2006).

Com a descoberta das enzimas de restrições, tornou-se possível obter os dados genéticos diretamente do DNA, através da técnica intitulada 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. A perda ou surgimento desses sítios é o que caracteriza o polimorfismo (REGITANO & COUTINHO, 2001). O conhecimento genético a partir de marcadores moleculares foi alavancado pelo desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*), que se baseia na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase, descoberto em 1983 por Mullis (MULLIS, 1990).

A utilização de marcadores moleculares varia de acordo com o objetivo da pesquisa. Para estudo de variabilidade e diversidade genética, os mais utilizados têm sido os Microssatélites e SNPs. O uso de marcadores moleculares tem dado uma forte contribuição no desenvolvimento das pesquisas populacionais, dado que as informações geradas a partir deles poderão, junto com informações fenotípicas, fornecer diretrizes para programas de conservação e melhoramento genético (CLEMENTINO, 2010).

2.8 Microssatélites

Microssatélites são marcadores moleculares que possuem alto nível polimórfico, estabilidade e herança codominante, tornando-se altamente eficientes em estudos populacionais. Microssatélites são sequências repetitivas de DNA, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR). Geralmente, são repetições de mono, tetra ou, principalmente, dinucleotídeos, e estão localizados entre os genes ou dentro de íntrons. O manuseio dessa técnica é de fácil execução. Para a realização das análises é necessário o uso de *primers* específicos que demarcam as regiões de microssatélites (ENGEL et al. 1996). O que justifica o uso desses marcadores, além do alto polimorfismo, é que, uma vez utilizados no mapeamento genético, fornecem informações na identificação de similaridades entre raças, e também pode atuar como marcadores de gene de interesse, uma vez que podem estar associados diretamente a esses genes. Quando amplificados via PCR, essas sequências apresentam alta 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).

Várias instituições e pesquisadores no mundo têm feito uso de microssatélite em suas pesquisas. Em 1995, a *Food Agriculture Organization* (FAO), juntamente com a *International Society of Animal Genetics* (ISAG), reuniram-se e formaram equipes para elaborarem diretrizes e recomendações técnicas para a avaliação da diversidade genética em raças de animais domésticos. Idealizado através do projeto *Measurement of Domestic Animal Diversity* (MoDAD) (http://www.fao.org/dad_is) selecionaram uma lista de *loci* de microssatélites para estudos de diversidade genética. Posteriormente, em 2004, a lista foi ampliada com inclusão de novos marcadores (FAO, 2004).

Raças nativas brasileiras, como a bovina Curraleiro Pé Duro, a ovina Morada Nova e a caprina Moxotó, já foram caracterizadas através do uso de microssatélites. Essas raças fazem parte do núcleo de conservação de populações locais em risco de extinção da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essas raças de interesses econômicos foram introduzidas no Brasil na época da colonização (FONTEQUE et al., 2014). Ainda existem muitas populações a serem caracterizadas geneticamente, a exemplo das raças nativas de galinhas caipiras como a Canelas-preta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente com uso de doze *loci* de microssatélites as galinhas caipiras da raça Canelas-Preta.

Analisar a diversidade fenotípica das galinhas caipiras da raça Canelas-Preta com base em descritores fenotípicos.

3.1.2 Objetivos específicos

- Genotípicos
 - Análise da Heterozigosidade Esperada (He);
 - Análise da Heterozigosidade Observada (Ho);
 - Analisar se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg;
 - Verificar presença de alelos nulos;
 - Calcular o coeficiente de endogamia;
 - Calcular as frequências alélicas;
 - Calcular a distância genética dentro da população;
 - Calcular a distância genética entre populações;
 - Verificar a estrutura genética das populações
- Fenotípicos
 - Estimar a variação fenotípica existente dentro da população de galinhas da raça Canelas-Preta por meio de descritores fenotípicos quantitativos e qualitativos;
 - Identificar as características de maior importância para a variabilidade na população de galinhas nativas da raça Canelas-Preta;
 - Estimar e descrever índices zootécnicos das galinhas nativas da raça Canelas-Preta;
 - Identificar os métodos estatísticos mais eficientes na estimação da diversidade genética das galinhas nativas da raça Canelas-Preta

4. REFERENCIAS

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

ALMEIDA. E. C. DE J. **Diversidade fenotípica de frangos nativos da raça Peloco com base em descritores fenotípicos sob análise multivariada**. 61p. Dissertação (Mestrado Genética, biodiversidade e conservação) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. 2013.

ALMEIDA, M. J. DE O. **Caracterização de caprinos da raça Marota no Brasil**. 150f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal da Paraíba. Areia. 2007.

BEZERRA NETO, F. V.; LEAL, N. R.; GONÇALVES, L.S.A.; RÊGO-FILHO, L.M.; AMARAL JÚNIOR, A.T. 2010. Descritores quantitativos na estimativa da divergência genética entre genótipos de mamoneira utilizando análises multivariadas. **Revista Ciência Agrônômica**. vol. 41, no. 02, p. 294-299, 2010.

CARVALHO, D. A., et. al. Caracterização Fenotípica de galinhas caipiras comercializadas como nativas no Ceasa de Teresina-PI. I Simpósio Internacional de Raças Nativas: Sustentabilidade e Propriedade Intelectual. **Anais**. Teresina, 2015.

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

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. **Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética**, 1ª ed. Viçosa: UFV. 620 p. 2011.

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

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

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

FONTEQUE, G.V. **Investigação da variabilidade genética de quinze loci de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis**, 51p, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)-Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages-SC. 2011.

FONTEQUE, G.V.; BATTILANA, J.; PALUDO, E.; LIMA-ROSA, C.A.V. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(1): 98-102. 2014.

GONZÁLEZ PIZARRO, J. de D. **Elementos de Zootecnia General. I. Tomo. Tip**. Herederos Angel González. León - 1903.

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

MÉNDEZ, Y.; PONS, A.; FRANCESCH, A. Comparación de medidas zoométricas en las

gallinas baleares. **Arch. Zootec.** 60 (231): 445-448. 2011.

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

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

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

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

OLIVEIRA, F.J.; ANUNCIACÃO-FILHO, C.J.; BASTOS, G.Q.; REIS, O.V. Divergência genética entre cultivares de caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** vol. 38, no. 05, p. 605-611. 2003.

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. **Revista Exame.** 2005. Disponível em: <http://portalexame.abril.com.br/revista/exame/edicoes/0855/internacional/m0078574.html>. Acesso em 08 de agosto 2015.

PIRES, A.V.; CARNEIRO, P.L.S.; TORRES FILHO, R.A.; FONSECA, R.; TORRES, R.A.; EUCLYDES, R.F.; LOPES, P.S.; BARBOSA, L. Estudo da divergência genética entre seis linhas de aves Legorne utilizando técnicas de análise multivariada. **Arquivo Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia.** vol. 54, no.3. 2002.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal.** Embrapa informação tecnológica. 215 p. 2001.

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).

SCHERF, B.D. **World Watch List for domestic animal diversity.** 3rd edition. FAO UNEP. Roma. 732 pp. 2000.

SIERRA ALFRANCA, I. El Concepto de Raza: Evolución y Realidad. **Archivos de Zootecnia.** 50: 547-564. 2001.

SNUSTAD, D. PETER; SIMMONS, MICHAEL J. **Fundamentos de Genética.** 2ª. Ed. Tradução de Paulo Armando Motta. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 756p. 2001.

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.

ARTIGO 1

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS
CANELAS-PRETA**

ARTIGO 1

Caracterização Fenotípica de Galinhas Caipiras Nativas Canelas-Preta

RESUMO - Objetivou-se com esta pesquisa avaliar os descritores fenotípicos qualitativos e quantitativos para estabelecer um padrão racial para a galinha Canelas-Preta do estado do Piauí. Foram utilizadas 116 aves, entre machos e fêmeas, de três municípios do Piauí. Os caracteres mensurados incluíram 32 descritores fenotípicos morfológicos, sendo 21 quantitativos e 11 qualitativos. Para as características qualitativas a técnica empregada para obtenção dos dados foi à observação visual. De acordo com os resultados, as frequências das características foram calculadas para os indivíduos. Quanto aos dados quantitativos foi feita a análise estatística descritiva de cada variável e para cada população. Para análise multivariada, a medida de dissimilaridade usada foi distância Euclidiana média. Em seguida, foi realizado o agrupamento dos indivíduos pelo método UPGMA. As Canelas-Pretas tem o seguinte padrão fenotípico qualitativo: tipo de crista: serra ou noz e suas variações; cor da crista: vermelha ou escura; cor dos olhos: vermelho-alaranjado, amarelo, pardo, marrom ou preto; cor do bico: amarelo ou escuro; cor da barbeta: vermelha ou escuro; ausência de topete; tipo de penas: lisas; ausência de patas plumadas; cor das canelas predominantemente pretas; coloração da plumagem: preta; coloração do pescoço: varia entre branco, preto, dourado. Possuem características fenotípicas quantitativas de elevado, médio e pequeno coeficiente de variação, que revela a riqueza genica da raça e as qualifica para programas de conservação, utilização e melhoramento dos recursos genéticos.

PALAVRAS CHAVES: Agrupamento, *Gallus gallus*, Descritores Fenotípicos, Padrão Racial, Raça Nativa, Recursos Genéticos

Phenotypic characterization of native chickens of the Breed Canelas-Preta

ABSTRACT - The aim of this research was to evaluate the quantitative and qualitative phenotypic descriptors to establish a racial standard for the Canelas-Preta chicken from Piauí state. A total of 116 birds, between males and females, from three cities of Piauí were used. The characters measured included 32 morphological phenotypic descriptors, 21 quantitative and 11 qualitative. For the qualitative characteristics, the technique used to obtain the data was the visual observation. According to the results, the characteristic's frequency was calculated for the individual. As regards the quantitative data was made a statistical descriptive analysis of each variable and each population. For multivariate analysis, the dissimilarity measure used was Euclidean distance average. Then it was carried out the grouping of individuals by UPGMA method. The Canelas-Preta has the following qualitative phenotypic pattern: type of comb: saw or walnut and its variations; color of comb: red or dark; eye's color: red-orange, yellow, dun, brown or black; beak's color: yellow or dark; wattles' color: red or dark; lack of top knot; type of feathers: smooth; absence of feathered legs; color of the shanks predominantly black; plumage's color: black; coloration of the hackle: it ranges from white, black and gold. They have quantitative phenotypic characteristics of high, medium and low coefficient of variation, which reveals the genetic wealth of the race and qualify them for conservation programs, utilization and improvement of genetic resources.

KEYWORDS: Grouping, *Gallus gallus*, Phenotypic Descriptors, Racial Standard, Native Race, Genetic Resources

INTRODUÇÃO

As galinhas caipiras domésticas (*Gallus gallus*) foram introduzidas no Brasil pelos colonizadores portugueses. Estas se multiplicaram através de cruzamentos aleatórios, dando origem às raças de galinhas nativas brasileiras, distribuídas em todas as regiões do Brasil. Acredita-se que essas aves são bem adaptadas ao clima, doenças e parasitas, sendo consideradas de elevada rusticidade (Fonteque et. al. 2014). As galinhas nativas caracterizam-se por serem boas forrageadoras, mães eficientes (incubação natural) e pela baixa exigência de manejo e controle sanitário, adequando-se às condições de criação das famílias rurais (Kaya & Yildiz, 2008).

Porém, apesar das inúmeras qualidades, um grande percentual das raças nativas de galinhas caipiras está em risco de extinção e pouco se conhece sobre essas raças. Pesquisas que busquem ferramentas para conservar e utilizar essas raças são necessárias. Segundo a FAO (1998), elementos importantes nos programas nacionais de conservação incluem o inventário, a caracterização e a documentação dos dados obtidos. A obtenção de medidas morfométricas de uma determinada raça auxilia na sua definição fenotípica, inclusive no que tange à elucidação do seu porte e aptidão, parâmetros esses relevantes para programas de seleção (Méndez, et al.,2011; Mariante & Cavalvante, 2006) .

Na caracterização fenotípica de aves nativas, os parâmetros usualmente mais utilizados são: comprimento do corpo, envergadura, comprimento e largura da crista; comprimento e largura do bico; comprimento e largura da barbela; comprimento do peito; comprimento da asa; comprimento da coxa; comprimento do dedo do pé e comprimento e diâmetro do tarso. Há ainda as características qualitativas como plumagem do corpo, tipo de crista, cor da canela, cor dos olhos, cor da crista e cor da barbela (Almeida, 2013).

Encontradas no estado do Piauí e possivelmente em outros estados do Nordeste, as galinhas Canelas-Preta são criadas no sistema caipira por pequenos agricultores. Essas aves caracterizam-se por possuir carne de coloração escura, muito apreciado pela população local. Estas aves mostram-se adaptadas, visto que são criadas em condições de clima quente, e de forma predominantemente extensiva com pouco ou nenhum investimento tecnológico e

controle zootécnico. Pouco se sabe sobre informações populacionais, fenotípicas e genéticas dessas aves.

A morfometria, como instrumento de caracterização fenotípica, admite caracterizar ou classificar indivíduos e raças de uma população. Esses parâmetros podem ser estabelecidos como uma particularidade individual em evidência, que, em maior ou menor grau de variação, determina o tipo de raça (ou tipo étnico) à qual pertence (Todano et al. 2009; Carvalho et. al. 2010). A identificação e monitoramento das características fenotípicas dessas galinhas nativas podem ajudar programas de conservação e utilização de recursos genéticos e no reconhecimento dessas aves. Nesse contexto, o objetivo dessa pesquisa foi estabelecer o padrão racial para as galinhas nativas Canelas-Preta do estado do Piauí por meio de descritores fenotípicos, como contribuição para o início do processo de valorização e reconhecimento como raça por parte do Ministério de Agricultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do estudo foram utilizadas galinhas nativas Canelas-Preta de criatórios de agricultores credenciados no Projeto Produtores do Futuro no Piauí/Brasil. O projeto de pesquisa foi cadastrado no comitê de ética da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e, posteriormente, os objetivos da pesquisa foram esclarecidos aos criadores, que aceitaram participar do projeto, autorizando a coleta dos dados fenotípicos das aves em suas propriedades. A caracterização fenotípica foi conduzida em cinco populações de galinhas de três municípios do Piauí, sendo quatro destas localizadas na região do Semiárido / Oeiras e Queimada-Nova e o último na região do Entre Rios / Teresina (Figura 1).

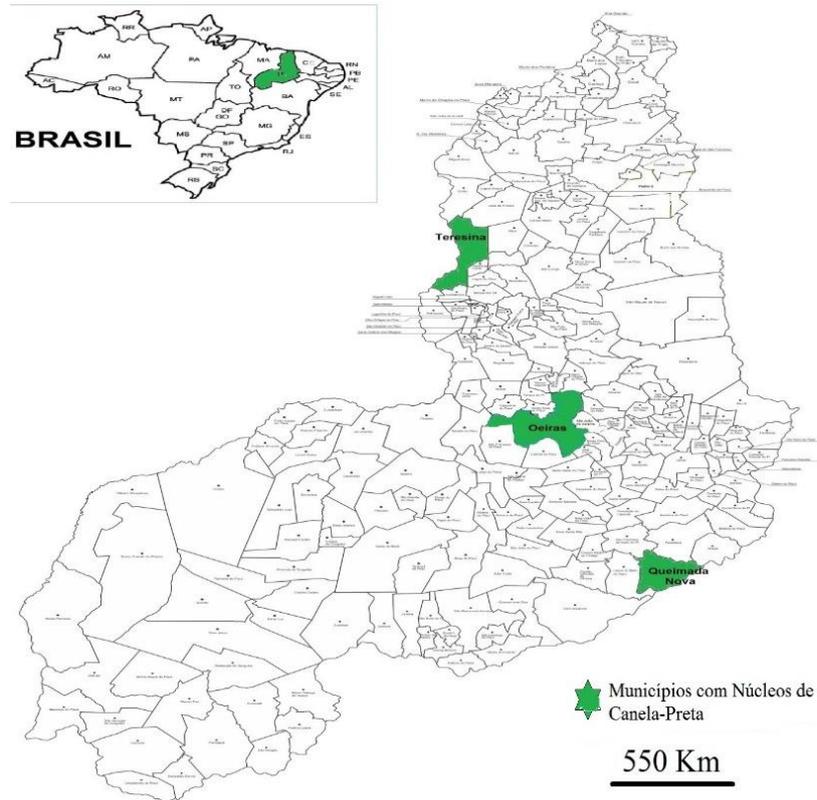


Figura 1- Mapa da localização dos municípios onde as informações fenotípicas das aves foram coletadas dentro do estado do Piauí/Brasil.

Caracterização fenotípica

A coleta dos dados ocorreu no mês de fevereiro de 2015, amostrando-se apenas aves adultas. A decisão por coletar informações em aves adultas pautou-se nos achados de Bueno et al. (2001), pois para os autores não há mais variação considerável no comprimento corporal quando o animal atinge a maturação esquelética, por isso os animais avaliados com fins de caracterização devem ser adultos. Foram coletadas informações em 116 aves, sendo 43 do município de Teresina no núcleo Genesis, 37 em dois núcleos de Oeiras e 36 também em dois núcleos de Queimada-Nova-PI, tendo um total de 97 fêmeas e 19 machos. Foram utilizados 21 descritores morfológicos quantitativos e 11 qualitativos para caracterizar as galinhas.

Os descritores fenotípicos qualitativos observados foram: tipo de crista, cor da crista, cor dos olhos, cor do bico, cor da barbela, topete, tipo de penas, patas plumadas, cor da canela, coloração da plumagem e cor do pescoço. Os dados foram coletados conforme a metodologia sugerida pela FAO (1981) para caracterização fenotípica de aves nativas. A técnica empregada para obtenção dos dados qualitativo foi à observação visual. Os 21 descritores quantitativos foram estabelecidos segundo Fransesch et al. (2011), com modificações na retirada do comprimento e largura da orelha e inserção da altura (Tabela 1). As mensurações

foram tomadas por um mesmo observador, com o auxílio de balança, paquímetro digital e fita métrica. Foram tomadas medidas morfométricas gerais, da cabeça, do pescoço, do corpo e das extremidades das aves.

Análise estatística

O modelo estatístico foi:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + (SP)_{ij} + e_{ijk},$$

em que: Y_{ijk} = característica estudada, na população j , do sexo i ; μ = média geral da característica; S_i = efeito do sexo i ; P_j = efeito da população j ; $(SP)_{ij}$ = efeito da interação do sexo i e da população j ; e e_{ijk} = erro aleatório atribuído à observação Y_{ijk} . Foi empregada a estatística descritiva para determinar a frequência dos dados qualitativos. As frequências das características qualitativas foram calculadas por população/município.

Os dados quantitativos foram submetidos a análise de variância, utilizou-se o software SAS (2003). Após foi realizada análise de agrupamento (Cruz et al., 2011) como medida de variabilidade genética. A medida de dissimilaridade utilizada foi à distância Euclidiana média, utilizada para dados quantitativos sem repetição. Utilizou-se o método hierárquico UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*), estabelecendo-se o dendrograma com os grupos de maior similaridade. Para testar a consistência dos agrupamentos pelo método UPGMA após obtenção dos dendrogramas foram geradas as estimativas de correlação cofenética (Sokal & Rohlf, 1962).

A confiança para formar a ramificação dos dendrogramas construído através do método hierárquico, foi realizada através da técnica de *bootstrap*, ou seja, foram feitas 1000 reamostragens do dendrograma, a partir das quais se obteve a porcentagem de replicações similares aos dados originais. As análises de agrupamento e *bootstrap* foram realizados no programa R versão 3.2.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das observações das características fenotípicas qualitativas referentes à cabeça e o corpo das aves são apresentados na Tabela 2. As galinhas Canelas-Pretas amostradas apresentaram dois tipos de crista, sendo o tipo Serra que predominou nos municípios estudados. Contudo, a crista Noz também conhecida como crista Enrugada apresentou relevante frequência dentro dos núcleos amostrados. Essa variação de tipos de crista é importante na caracterização dessas aves. A cor da crista, embora a predominância seja da cor vermelha, mostra variação nas frequências entre os municípios, sendo que em

Oeiras e Queimada-Nova a frequência foi semelhante e menor em relação a Teresina, houve também frequência de crista escura nesses núcleos, tendo as galinhas Canelas-Preta relevante percentual de crista escura nos núcleos de Oeiras e Queimada-Nova (Tabela 2).

Quanto a cor dos olhos a predominância nos núcleos de Teresina e Oeiras foi de cores marrom e amarelo e em Queimada-Nova de pardo e amarelo. Quanto a cor do bico o que predominou nos três municípios foi a cor escura, o que mostra uniformidade das Canelas-Pretas quanto a esse descritor. A cor da barbela predominante foi a vermelha nos três municípios, porém, a cor escura ocorreu com baixa frequência. Observa-se a campo que as aves que apresentam cor da barbela escura, também tem a crista escura e carne escura, porém, são necessários mais estudos que certifiquem essa hipótese.

A particularidade da cor escura nos caracteres cor da barbela, cor do bico, cor da crista e cor da carne estão relacionados a conservação do material genético e sua origem primitiva, pois no mercado ainda não se tem linhagens de aves com essa coloração para comercialização. Com isso, seria possível inferir que na natureza essa característica em galinhas, esta relacionada ao tronco formador dessa aves, partindo do pressuposto que essa característica seria de aves primitivas (*Gallus gallus Bankiva*).

Para os descritores topete e patas plumadas em todos os municípios, apresentaram ausência desses descritores, o que mostra que na formação dessas aves possivelmente não houve influência das raças asiáticas. Para as características tipo de penas, em todos os municípios ocorreu o tipo lisa. Esses resultados, sugerem que neste grupo genético não existe mistura de material exótico no tangente aos descritores topete, patas plumadas e penas frizadas, haja visto, que esses parâmetros são inerente de raças exóticas.

Quanto aos descritores cor da canela e coloração da plumagem a cor preta em ambos descritores e nos três municípios, o que mostra que para essas características existe homogeneidade dentro dos núcleos. Quanto ao descritor cor do pescoço houve variação entre os municípios nas frequências dos caracteres manifestos (branco, preto e dourado) Figura 2. As variações de cores do pescoço é indicativo de variabilidade genética devido a presença de genes com diferentes interações entre eles.

Os dados apresentados na Tabela 2 referentes aos núcleos de Canelas-Preta e descritos acima, mostram que, para algumas características (tipo de penas, cor da canela, cor da plumagem, ausência de topete e cor do bico) existem homogeneidade entre os municípios, ou seja, normalização do grupo genético. Para as demais características estudadas, as análises sugerem que há similaridade de caracteres entre os núcleos, a variação encontrada está na

frequência desses caracteres, ou seja, a variação está dentro e não entre os núcleos, o que reforça a proposta de que esses núcleos representam um único grupo genético e qualitativamente uniforme.

A média do peso das galinhas nativas Canelas-Pretas é de 1,890kg, que está dentro do padrão comercial, o que qualifica essas aves como alternativas de produção comercial, uma vez que, galinha caipira é muito apreciado pela população local. Analisando as médias das características corporais e da extremidade: peso, altura, medida ornitológica, envergadura, circunferência torácica, comprimento da asa, comprimento coxa, comprimento do tarso, diâmetro do tarso e comprimento do dedo central (Tabela 3), observou-se que as galinhas Canelas-Preta dos núcleos amostrados possuem porte físico relativamente médio, uma vez que são maiores que as galinhas intituladas de pequeno porte (Galizé) e menores que as de grande porte (Gigante Negro), o que pode apresentar vantagens biológicas importantes quanto aos aspectos relacionados à adaptação, resistência e tipo de exploração.

Os dez parâmetros relacionados à cabeça são essenciais na padronização de aves nativa, esses, propiciarão as informações relevantes no que tange a diferenciação da raça exótica. A análise dos dados sugere que entre os indivíduos existe maior variação nas características: tamanho e largura da barbela e tamanho e largura da crista, isto é esperado para galinhas nativas, pois releva a variação que é comum nessas aves, esse resultado também está relacionada à base do tronco formador dessas aves (formadas a partir de vários grupos genéticos trazidos da Península Ibérica).

Quanto menor o coeficiente de variação, mais homogenia é a amostra. Para os indivíduos avaliados em relação às características quantitativas (Tabela 3), os dados evidenciam que há tendência a heterogeneidade das características entre os indivíduos, tendo também, variáveis com elevados coeficiente de variação. Isto revela que a variabilidade fenotípica do grupo, essencial para implantação de programas de melhoramento específico para as galinhas Canelas-Preta.

Conforme apresentado na Tabela 4, a maioria dos descritores (dezessete) mostra-se significativo para variação entre núcleos ($P < 0,05$), o que sugere manejos e/ ou potenciais genéticos diferentes. Os núcleos de Queimada-Nova e Oeiras apresentaram-se com médias semelhantes, já o de Teresina divergiu na maioria das medias em relação a Queimada-Nova e assemelhou-se ao de Oeiras. Esse resultado é explicável pelo fato das galinhas de Teresina serem de núcleo de conservação, onde é dado aos indivíduos a oportunidade de expressar e perpetuar toda possível variabilidade através de acasalamentos ao acaso. Já as populações de Queimada-Nova e Oeiras são de núcleos de multiplicação e comercialização, onde os

criadores selecionam os reprodutores pelo maior porte físico, tipo de crista, dentre outros, com isso, acabam por influenciar mesmo que indiretamente a frequência de alguns descritores. Induzindo a maior ou menor média.

Porém, apesar de haver variação entre os núcleos para a maioria dos descritores, a característica peso, que também é relevante para caracterização, não divergiu entre os núcleos. Ainda segundo resultados apresentados na Tabela 4 e em relação ao sexo, dos 21 descritores estudados, em 17 obteve-se $P < 0,05$, o que indica que esses parâmetros estão associados ao sexo, ou seja, o sexo influencia diretamente na variação destas características. Em todos os descritores divergentes os machos apresentaram maiores médias, e acentuado dimorfismo sexual. Envergadura, comprimento e largura do olho e largura do bico não está relacionada ao sexo, obteve ($P > 0,05$), ou seja, a expressão dessas características independem de efeito de sexo, assegurando um nível de significância de 0,05.

A diversidade fenotípica estimada a partir da análise de agrupamento realizada pelo método de UPGMA permitiu a formação de dois grupos, no grupo I foram alocados 4 indivíduos e no grupo II 112 indivíduos com *bootstrap* de 65% e 64% respectivamente (Figura 2). Valores de *bootstrap* acima de 50% indicam maior confiança na formação dos ramos do dendograma. Como critério utilizado para avaliar o ajuste do agrupamento, recomenda-se que o CCC (Coeficiente de correlação cofenética) seja maior que 0,70. Neste trabalho foi estimado valor de 0,75 de CCC. Assim, quanto mais alto for o CCC menor será a distorção provocada no agrupamento (Sokal & Rohlf, 1962). O resultado dessa análise sugere que, apesar de existir variação entre indivíduos, elas não são suficientes para colocá-los longe um dos outros. Os quatro indivíduos do grupo I podem ser animais despadronizados.

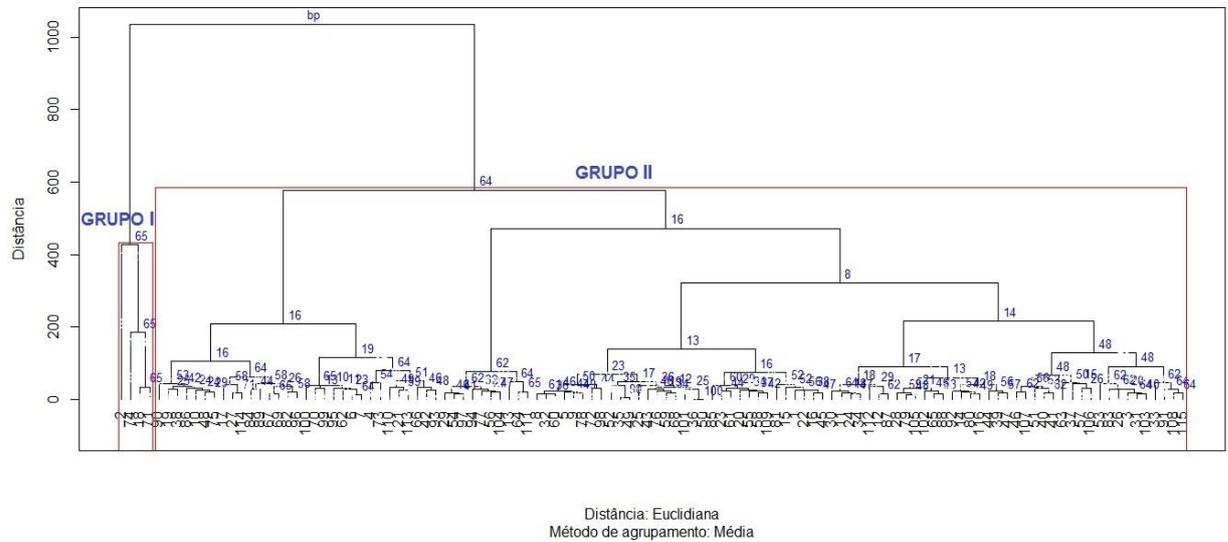


Figura 2. Dendrograma obtido a partir da distância Euclidiana Média pelo método de agrupamento *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean* (UPGMA) para os três grupos genéticos de galinhas.

A análise de agrupamento demonstra que existe padrão fenotípico uniforme para aves Canelas-Preta. Essas informações contribuirão para futuros programas de gestão genética e de melhoramento da raça. Porém, ainda há necessidade de se estabelecerem ferramentas que possam fortalecer, divulgar e incentivar sua criação e reintrodução no meio rural.

CONCLUSÃO

As galinhas Canelas-Preta apresentam características de aves nativas, uma vez que mostraram semelhança nas distribuições dos descritores qualitativos entre os núcleos amostrados e variação na frequência desses descritores dentro de cada núcleo, isso a caracteriza como raça e fenotipicamente estruturada, com padrões uniformes.

As Canelas-Preta tem o seguinte padrão fenotípico qualitativo: tipo de crista: serra ou noz e suas variações; cor da crista: vermelha ou escura; cor dos olhos: vermelho-alaranjado, amarelo, pardo, marrom ou preto; cor do bico: amarelo ou escuro; cor da barbela: vermelha ou escuro; ausência de topete; tipo de penas: lisas; ausência de patas plumadas; cor das canelas predominantemente pretas; coloração da plumagem: preta; coloração do pescoço: varia entre branco, preto, dourado.

Possuem características fenotípicas quantitativas de elevado, médio e pequeno coeficiente de variação, que revela a riqueza genica da raça e as qualifica para programas de conservação, utilização e melhoramento dos recursos genéticos.

REFERÊNCIAS

Almeida, E.C. DE J. 2013. **Diversidade fenotípica de frangos nativos da raça Peloco com base em descritores fenotípicos sob análise multivariada**. 61p. Dissertação (Mestrado Genética, biodiversidade e conservação) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Bueno, M.S.; Cunha, E.A. e Santos, L.E. 2001. Características de carcaça de ovinos Santa Inês abatidos com diferentes idades. **Archivos de Zootecnia**, 50: 33-38.

Carvalho, G.M.C.; Almeida, M.J.O.; Azevedo, D.M.M.; Araújo Neto, R.B.; Leal, T.M.; Monteiro, F.C.; Frota, M.N.L.; Lima Neto, A.F. 2010. Caracterização fenotípica do gado Pé-Duro do Nordeste do Brasil. - Teresina : **Embrapa Meio-Norte**. Teresina-Piauí.

CRUZ, C.D.; FERREIRA, F.M.; PESSONI, L.A. 2011. **Biometria Aplicada ao Estudo da Diversidade Genética**, 1ª ed. Viçosa: UFV. 620 p.

FAO. 1981. **Descritores de especies avícolas. En: Banco de datos de recursos genéticos animales**. Roma, Italia. pp. 13-15.

FAO. 1998. **Primary guidelines for development of national farm genetic resources management plans**. <https://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/primery.pdf>.

Fonteque, G.V.; Battilana, J.; Paludo, E.; Lima-Rosa, C.A.V. 2014. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg. Caipira) chickens, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(1): 98-102.

Francesch, A.; Villalba, I.; Cartañà, M. 2011. Methodology for morphological characterization of chicken and its application to compare Penedesenca and Empordanesa breeds. **Animal Genetic Resources**. vol.48, p.79-84.

Kaya, M.; Yildiz, M.A. 2008. Genetic diversity among Turkish native chickens, Denizli and Gerze, estimated by microsatellite markers. **Biochemical Genetics**. vol.46, p.480-491.

Mariante, A.S.; Cavalcante, N. 2006. **Recursos genéticos animais: Animais do descobrimento, raças domésticas da história do Brasil**. 2ª ed. Brasília: Ministério da Agricultura e Abastecimento. p. 274.

Méndez, Y.; Pons, A.; Francesch, A. 2011. Comparación de medidas zoométricas em las gallinas baleares. **Archivos de Zootecnia** 60 (231): 445-448.

Pettingill, O.S. JR. 1985. Ornithology in laboratory and field. Burgess, Minneapolis, Minnesota, USA, **Academic Press Inc**. pp. 378–380.

SAS Institute Inc. 2003. **Statistical Analysis System user's guide**. Version 9.1 ed. Cary: SAS Institute, USA.

Sokal, R.A., Rohlf, F.J. 1962. The comparison of dendograms by objective methods. **Taxonomy**, vol.11, p. 33-40.

Todano. R; Nishibori. M.; Tsudzuki. M. 2009. 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.

ANEXOS

Tabela 1. Medidas corporais consideradas para caracterização das galinhas nativas Canelas-Preta

Medidas morfométricas Gerais	
Peso corporal	As aves foram pesadas no mesmo dia e pelo mesmo mensurador.
Medida ornitológica	Medida da ponta do bico até o final da cauda quando a ave estiver virada para baixo.
Envergadura	Distância entre as rêmiges primárias com as asas esticadas.
Altura	É a medida da distância da ponta do bico a ponta do dedo central do pé.
Características da cabeça	
Comprimento do crânio	É medida da distância entre o osso occipital e a inserção do bico na cabeça (Onde começa a plumagem).
Largura do crânio	Medida no nível dos olhos.
Comprimento da crista	Distância entre a inserção da crista no bico e o final do lóbulo da crista.
Largura da crista	Distância entre a ponta espigão central até a inserção da crista na cabeça.
Comprimento ocular	Distância entre os cantos das pálpebras.
Largura ocular	Segunda dimensão ocular, perpendicular ao comprimento, incluindo as dobras das pálpebras.
Comprimento do bico	Comprimento da ponta do bico até a inserção do bico na cabeça
Largura do bico	Medida da inserção do bico na cabeça e perpendicularmente até o final da mandíbula inferior.
Comprimento da barbela	Comprimento da inserção da barbela direita no bico, segurando a barbela com uma mão e traçando uma linha reta até o final da barbela.
Largura da barbela	Medida da segunda maior dimensão da barbela perpendicular ao comprimento.
Características do pescoço	
Comprimento do pescoço	Distância entre a nuca e a inserção do pescoço no corpo.
Características do corpo	
Circunferência torácica	Com fita métrica mede-se o perímetro na altura do tórax.
Características das extremidades	
Comprimento da coxa	Comprimento da articulação tíbia-fêmur até a articulação tíbia-tarso.
Comprimento da asa dobrada	O comprimento foi obtido de acordo o método de Pettingill (1985) ao longo da asa.
Comprimento do tarso	Comprimento da ligação tíbia-tarso até o final da outra articulação, tendo os pés para frente 90° em relação ao tarso.
Diâmetro do tarso	Diâmetro de traz para frente no meio do osso metatarso, sem pressionar a pele.
Comprimento do dedo do pé	Com os pés estendidos mediu-se o comprimento do dedo do pé central, articulação do metatarso até a inserção do dedo.

Tabela 2. Características fenotípicas qualitativas das galinhas nativas (quantitativo e percentual)

CARACTERÍSTICA		Teresina		Oeiras		Queimada-Nova	
		N	%	N	%	N	%
Tipo de crista	Serra	28	65	29	78	32	89
	Noz	15	35	8	22	4	11
Cor da crista	Vermelha	42	98	23	62	24	67
	Escura	1	2	14	38	12	33
Cor dos olhos	*Vr. Alaranjado	0	0	0	0	3	8
	Amarelo	20	46	28	76	9	25
	Pardo	0	0	6	16	17	47
	Marrom	21	49	3	8	6	17
	Preto	2	5	0	0	1	3
Cor do bico	Amarelo	0	0	1	3	0	0
	Escuro	43	100	36	97	36	100
Cor da barbela	Vermelho	42	98	31	84	29	81
	Escuro	1	2	6	16	7	19
Topete	Ausente	43	100	37	100	36	100
	Presente	0	0	0	0	0	0
Patas plumadas	Presente	0	0	0	0	0	0
	Ausente	43	100	37	100	36	100
Cor da canela	Preta	43	100	37	100	36	100
	Cinza	0	0	0	0	0	0
	Amarela	0	0	0	0	0	0
Tipo de penas	Lisa	43	100	37	100	36	100
	Frisadas	0	0	0	0	0	0
Cor da plumagem	Preta	43	100	37	100	36	100
Cor do Pescoço	Branca	5	12	15	41	14	37
	Preto	18	42	10	27	15	39
	Dourado	20	46	12	32	9	24

*Vermelho alaranjado

Tabela 3. Características biométricas analisadas dos 116 indivíduos

Variáveis	N	Média	Mínimo	Máximo	CV(%)
Peso (Kg)	116	1,890	1,200	3,210	19,30
Altura (cm)	116	43,65	30,80	55,20	9,23
Medida Ornitológica (cm)	116	34,49	28,00	41,90	6,80
Envergadura	116	40,25	31,80	59,20	10,73
Circunferência Torácica (cm)	116	32,28	26,70	38,80	6,96
Comprimento Crânio (mm)	116	65,10	55,54	92,37	6,85
Largura Crânio (mm)	116	29,62	21,77	39,75	16,26
Largura Crista (mm)	116	20,74	2,82	61,86	56,26
Comprimento Crista (mm)	116	33,61	18,17	61,69	23,99
Comprimento Bico (mm)	116	21,63	16,58	30,16	11,86
Largura Bico (mm)	116	21,76	14,80	32,20	11,72
Comprimento Barbela (mm)	116	25,69	5,02	61,26	38,55
Largura Barbela (mm)	116	21,55	8,18	49,62	29,22
Comprimento Olho (mm)	116	16,07	10,82	20,50	10,51
Largura Olho (mm)	116	12,45	7,27	18,66	14,65
Comprimento pescoço (mm)	116	17,32	10,00	21,70	8,26
Comprimento Asa (cm)	116	12,40	4,40	18,20	10,96
Comprimento Coxa (cm)	116	16,37	13,20	20,40	7,47
Comprimento Tarso (cm)	116	10,02	7,90	13,09	8,59
Diâmetro Tarso (mm)	116	10,02	4,08	15,74	11,78
Comprimento Dedo (cm)	116	6,14	4,90	7,50	7,76

N= número de animais; CV= coeficiente de variação

Tabela 4. Resultado do teste de significância da variação das características quantitativas em relação à população e sexo

Variáveis	População / Médias			Sexo / Médias		DP da Média
	THE ¹	Oeiras	Q. Nova ²	Fêmea	Macho	
Peso (Kg)	1,858a	1,877a	1,949a	1,892b	2,206a	0,3656
Altura (cm)	41,51b	44,90ac	44,93a	43,65b	47,17a	4,0304
Medida Ornitológica (cm)	33,50b	35,16a	34,89ac	34,46b	37,34a	2,3483
Envergadura	39,17a	40,62a	40,98a	40,19a	41,89a	4,3200
Circunferência Torácica (cm)	31,73b	33,05a	32,07ab	32,26b	33,93a	2,2486
Comprimento Crânio (mm)	64,36a	64,77a	66,28a	65,08b	68,8a	4,4613
Largura Crânio (mm)	29,10b	29,80a	29,78ac	29,53b	30,47a	11,6737
Largura Crista (mm)	31,57b	34,52ac	35,26a	33,66b	39,20a	8,0677
Comprimento Crista (mm)	17,03c	20,34b	25,63a	20,75b	27,43a	11,6733
Comprimento Bico (mm)	22,07a	21,40a	21,33a	21,63a	21,91a	2,5675
Largura Bico (mm)	18,81c	22,93ac	23,97a	21,73b	22,86a	2,5519
Comprimento Barbela (mm)	23,96b	23,69b	29,68a	25,65b	33,28a	9,9066
Largura Barbela (mm)	20,12b	20,59b	24,31a	21,57b	28,59a	6,3001
Comprimento Olho (mm)	15,62b	16,13ab	16,54a	16,07a	16,46a	1,6892
Largura Olho (mm)	12,80a	11,77b	12,72ac	12,44a	12,56a	1,8250
Comprimento pescoço (mm)	16,79b	17,67a	17,54ab	17,31b	18,75a	1,4316
Comprimento Asa (cm)	10,76b	13,38a	13,30ac	12,39b	14,08a	1,3602
Comprimento Coxa (cm)	15,50b	16,88ac	16,83a	16,35b	17,92a	1,2229
Comprimento Tarso (cm)	9,58b	10,09ac	10,44a	10,01b	11,13a	0,8612
Diâmetro Tarso (mm)	9,60b	9,99ab	10,56a	10,02b	11,50a	1,1817
Comprimento Dedo (cm)	5,91b	6,22ac	6,32a	6,16b	6,53a	0,4773

Kg = kilograma; cm = centímetros; mm = milímetros; DP= desvio padrão; ¹ Teresina; ² Queimada-Nova; Médias com letras diferentes na linha diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% probabilidade.

ARTIGO 2

**ANALISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE DOZE *LOCI* DE
MICROSSATÉLITES EM GALINHAS CAPIRAS NATIVAS CANELAS-PRETA**

ARTIGO 2

Análise da Variabilidade Genética de Doze Loci de Microssatélites em Galinhas Caipiras Nativas Canelas-Preta

RESUMO: O objetivo desta pesquisa foi analisar a variabilidade genética de doze *loci* de microssatélites em galinhas nativas Canelas-Preta. Foram coletadas amostras de sangue de 118 galinhas Canelas-Preta, provenientes de cinco propriedades em três municípios (Oeiras, Queimada-Nova e Teresina) do estado do Piauí. Após extração do DNA foram utilizados marcadores para doze *loci* de microssatélites: LEI0192, LEI0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0234, LEI0237, LEI0248, LEI0258, MCW0081, MCW0183 e MCW0213 que foram amplificados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados demonstraram um total de 408 alelos (somando os alelos dos 12 *loci*), com os fragmentos variando entre 50 e 460 pares de base, o número de alelos variou de 15 (MCW0081) a 52 (LEI0212), com média de 31,5 alelos por *locus*. A média de heterozigosidade esperada e PIC foram, respectivamente, 0,887 e 0,909. Foram observados desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores positivos do índice de fixação com excesso de homozigotos. Conclui-se que os microssatélites utilizados são polimórficos e que podem, portanto, serem utilizados para investigações genéticas em galinhas Canelas-Preta. As aves dos núcleos analisados apresentam grande variabilidade gênica, o que as qualifica como importante fonte de recursos genéticos, e que poderão, assim, serem utilizadas em futuros programas de melhoramento genético animal.

PALAVRAS CHAVES: Alelos, *Gallus gallus*, Nativa, Polimorfismo, SSR

Variability Analysis of Genetic Loci Twelve Microsatellite in Chickens Grits Native Canelas -Preta

ABSTRACT- The aim of this study was to analyze the genetic variability of twelve microsatellite loci in native Canelas-Preta chickens. Blood samples were collected from 118 chickens of the breed from five properties in three cities (Oeiras, Queimada Nova and Teresina) of Piauí state. After the DNA extraction were used markers for twelve microsatellite loci: LEI0192, LEI0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0234, LEI0237, LEI0248, LEI0258, MCW0081, MCW0183 and MCW0213 that were amplified by polymerase chain reaction technique (PCR). The results showed a total of 408 alleles (adding alleles from the 12 loci) with the fragments ranging between 50 and 460 base pairs, the number of alleles ranged from 15 (MCW0081) to 52 (LEI0212) with an average of 31,5 alleles per locus. The average expected heterozygosity and PIC were, respectively, 0.887 and 0.909. Deviations were observed in the Hardy-Weinberg equilibrium and positive values of the fixation index with excess of homozygotes. It is concluded that the used microsatellites are polymorphic and can, therefore, be used for genetic research in Canelas-Preta chickens. The birds of the analyzed cores present great genetic variability, which qualifies them as an important source of genetic resources, which could be used for future animal breeding programs.

KEYWORDS: Allele, *Gallus gallus*, Native, Polymorphism, SSR

INTRODUÇÃO

As galinhas domésticas do Brasil foram introduzidas pelos portugueses no período da colonização por volta do ano de 1500. Essas aves passaram por um processo de adaptação e seleção natural durante décadas. As aves foram criadas soltas, propiciando cruzamentos aleatórios e, dessa maneira, surgiram às raças de galinhas nativas brasileiras. Acredita-se que essas aves são bem adaptadas ao clima, resistente a parasitas e doenças, sendo consideradas de elevada rusticidade e detentora de alta variabilidade genética. Apesar de todas essas qualidades, muitas dessas populações de galinhas nativas encontram-se em risco de extinção (Fonteque et al., 2014).

Pouco se conhece sobre a variabilidade genética das aves nativas, porém estudos científicos recentes apontam alta variabilidade genética em galinhas caipiras brasileiras (Possamai, 2011). O conhecimento da variabilidade genética das galinhas nativas é fundamental para programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento animal, o que viabiliza estabelecer programas de seleção dessas aves. A investigação da variabilidade genética das galinhas caipiras nativas Canelas-Preta é uma das maneiras de se comprovar a importância da conservação destes animais para preservação da diversidade da espécie.

Canelas-Preta são galinhas nativas criadas por pequenos agricultores do estado do Piauí. Ainda não se conhece sobre a variabilidade genética dessas aves nativas brasileira. Assim, faz-se necessário pesquisas que divulguem essas aves; que auxiliem os programas de preservação, conservação e utilização dos recursos genéticos e melhoramento animal; e que subsidiem a valorização e reconhecimento desse material genético brasileiro. Nesse contexto o objetivo desta pesquisa foi analisar a variabilidade genética de doze *loci* de microssatélites em galinhas caipiras nativas Canelas-Preta.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Amostragem e áreas de coleta**

Para a realização da pesquisa foram utilizadas galinhas nativas Canelas-Preta de criatórios de agricultores credenciados no “Projeto Produtores do Futuro” no Piauí. O projeto de pesquisa foi cadastrado no comitê de ética Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e, posteriormente, os objetivos da pesquisa foram esclarecidos aos criadores, que aceitaram participar do projeto, autorizando a coleta dos

dados em sua propriedade, em seguida, foi realizada a coleta do material biológico (sangue) nos núcleos.

Para as análises experimentais foram utilizadas 118 galinhas caipiras nativas Canelas-Preta, provenientes de cinco núcleos situados em três municípios do estado do Piauí, amostradas em janeiro de 2015. Sendo 38 amostras do núcleo Genesis, localizado no município de Teresina; 21 amostras do núcleo do povoado Caldeirões e 16 amostras do núcleo de São Francisco, ambos localizados na região do município de Oeiras; 19 amostras do núcleo da comunidade Tapuio e 24 amostras na comunidade indígena Serra Grande, ambas localizadas no município de Queimada-Nova, PI.

As amostras de sangue foram retiradas da veia ulnar das aves e posta sobre papel filtro, após a secagem do sangue sobre o papel em ambiente natural, este foi colocado dentro de envelope e identificado com as informações de cada ave. Os municípios selecionados para realização da pesquisa encontram-se descritos na Figura 1.

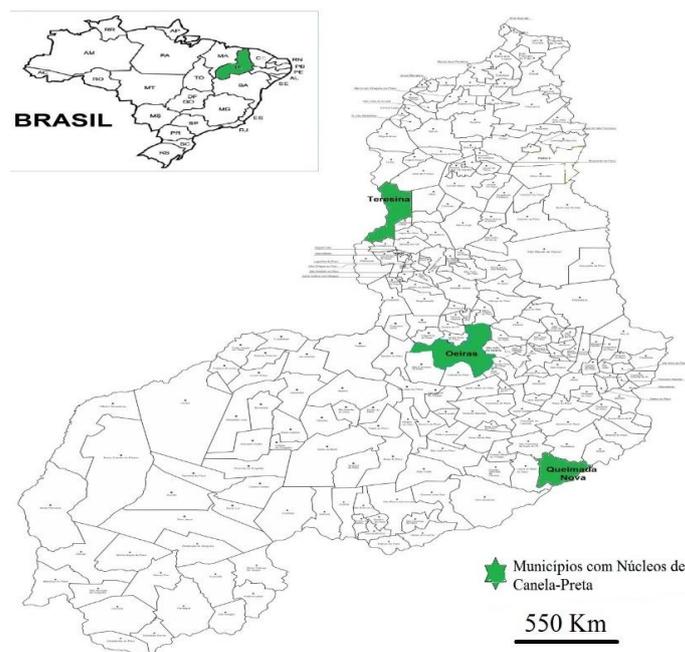


Figura 1- Mapa da localização dos municípios onde cada amostra foi coletada dentro do estado do Piauí. Núcleos de galinhas Canelas-Preta em Teresina, Oeiras e Queimada –Nova.

- **Análises laboratoriais**

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Genética Molecular Aplicada do Departamento de Zootecnia da UFVJM, localizado no município de Diamantina - MG. Utilizou-se fragmento de cada amostra, de 0,5cm do papel filtro para o procedimento da extração do DNA genômico, que por sua vez, foi realizado através do protocolo de extração salina estabelecido por Lopera-Barrero et al.

(2008). A quantificação do DNA foi feita no espectrofotômetro com amplitude de onda de 260 nm e as amostras diluídas para uma concentração de 10 ng/ μ l. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese horizontal usando um gel de agarose 1%, a 70 V por 70 minutos e, posteriormente, capturou-se a imagem no sistema fotográfico UV-312.

A amplificação dos fragmentos de DNA desejados foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), conforme descrita por McConnell et al. (1999), a partir do DNA total. Foram utilizados 14 *loci* de microssatélites desenhados para espécie *Gallus gallus*: LEI0192, LEI0234, LEI0248, MCW0081, MCW0183 (FAO, 2004), LEIO0209, LEI0212, LEI0214, LEI0217, LEI0221, LEI0237, LEI0258 (McConnell et al., 1999), MCW0213, MCW0305 (Crooijmans et al., 1997), seguindo as condições iniciais de padronização da PCR sugerida por cada autor.

Os *primers* foram testados com o DNA de 10 aves diferentes para verificação da amplificação e padronização das reações PCR. As misturas para as reações da PCR e respectivas concentrações dos reagentes foram as seguintes: 50 ng de DNA, 2,5 μ L de tampão 10X (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl), 1-2,5 μ L (20-50 mM) de MgCl₂, 2 μ L da mistura de dNTP (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,8 μ M de cada iniciador, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e H₂O para completar o volume final de 16 μ L.

A mistura total da reação PCR foi submetida ao termociclador nas seguintes etapas: 1 minuto de desnaturação inicial a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 49-64°C (dependendo do par de iniciadores – ver Tabela 1) e 50 segundos de extensão a 72°C; bem como 5 minutos de extensão final a 72°C. Os produtos das reações de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Para visualização dos fragmentos no gel, este último foi submetido a uma solução de fixação (10% etanol, 0,5% ácido acético) por 20 min, depois outra solução contendo 6 mM de nitrato de prata por 30 min e posteriormente com uma prévia lavagem com água destilada, foi submersa numa solução reveladora com 0,75 M NaOH, 0,22% e formol 40%. Cada gel foi fotografado com uma câmera digital.

Foi utilizado marcador de DNA com bandas de comprimento conhecido, variando em 50 pares de bases (pb) (Invitrogen), para auxiliar na determinação do tamanho dos fragmentos. Após a determinação das condições ideais de PCR para cada *primer*, foram realizadas as genotipagens dos marcadores.

Análises estatística

De posse dos dados de genotipagem, procedeu-se com as análises genéticas, que foram conduzidas em diferentes programas. O programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi usado para calcular as frequências alélicas em cada *locus*, estimativas de heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado utilizando o pacote de análise do programa CERVUS v.3.0.3 - © Copyright Tristan Marshall (1998) (www.fieldgenetics.com). Os testes de probabilidade foram baseados no Método da Cadeia de Markov usando 1000 *steps* de memorização, 100 *batches* e 1000 interações por *branches*. Uma correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989) foi aplicada para corrigir o efeito de múltiplas comparações evitando a possibilidade de resultados erroneamente significantes (erro tipo I). Um nível global de significância de 0,05 foi usado para as correlações.

Para verificar a condição do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) em cada *locus*, foi utilizado o programa GENEPOP v.4.0.10 (Rousset, 2008). Para evidenciar a presença de alelos nulos, foi utilizado o programa Micro-checker (Van Oosterhout et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições das PCRs (reação em cadeia da polimerase), feitas com os protocolos sugeridos pelos autores dos *primers* utilizados, não foram concordantes. Isso possivelmente é justificado pela variação de aparelhos utilizados (termocicladores) e os *primers* não serem específicos dessa raça. Com isso, houve a necessidade de ajustes nas condições de amplificação dos *primers* SSR para raça Canelas-Preta, a partir de alterações na temperatura de anelamento e na quantidade de magnésio utilizado para as reações conforme especificado na Tabela 1. Dos quatorze *primers* testados, apenas 12 *primers* tiveram amplificações positivas e polimórficas (Figura 2). Apesar dos diversos testes de temperatura, os *primers* MCW0305 e LEI0214, não foi encontrada a temperatura exata de anelamento para visualização das barras de DNA com o uso desses *primers*.

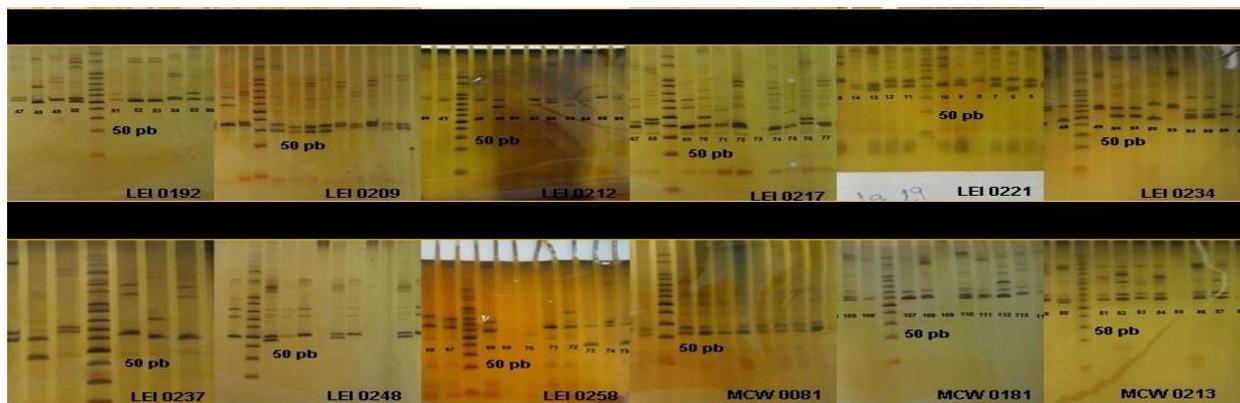


Figura 2 - Perfil eletroforetico em gel de poliacrilamida mostrando os doze marcadores microssatélites otimizados para galinhas Canelas-Preta; (50pb = Marcador de 50 pb)

Os doze *loci* microssatélites utilizados neste estudo mostraram-se eficientes na genotipagem do DNA das 118 aves estudadas. O número de alelos por *locus* de microssatélite por população de galinhas pode variar muito, podendo ir de um (monomórfico) até vários (polimórfico) (Fonteque, et al. 2014). Nesta pesquisa o número de alelos em cada *locus* variou de 15 (MCW0081) a 52 (LEI0258). A amplificação das amostras gerou um total de 408 alelos (somando os alelos de cada *locus*), com alelos variando entre 50 e 460 pares de bases (Tabela 1).

Este elevado polimorfismo das amostras em todos os *loci* analisados pode ser evidenciado se comparar estes dados com o encontrado para os mesmos *loci* na literatura. Fonteque et al., (2014), ao analisar 100 amostras de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis com uso de microssatélites, encontraram 19 alelos para o *locus* LEI0192, 28 alelos para o LEI0212, 19 alelos para o LEI0217, 12 alelos para o LEI0248, 05 alelos para o MCW0081 e 07 alelos para o MCW0183. Clementino (2010), encontrou 15 alelos para o *locus* LEI0209, 15 alelos para o LEI0221, 16 alelos para o LEI0234, 29 alelos para o LEI0237, 33 alelos para o LEI0258 e 20 alelos para o MCW0213. Nas galinhas nativas Canelas-Preta encontrou-se 19 alelos para os *loci* LEI0248 e MCW0213, 37 alelos para o LEI0192, 20 alelos para o LEI0209, 45 alelos para o LEI0212, 44 alelos para o LEI0217, 21 alelos para o LEI0221, 40 alelos para o LEI0234, 36 alelos para o LEI0237, 52 alelos para o LEI0258, 15 alelos para MCW0081 E 29 alelos para MCW0183.

Um número máximo de 52 alelos foi detectado para o marcador LEI0258. Uma variação deste nível pode sugerir que este *locus* encontra-se em uma região de elevada taxa de mutação ou de seleção positiva a mutação, o mesmo pode está acontecendo com

os demais marcadores pois todos os *loci* apresentaram elevado número de alelos. Em relação ao número médio de alelos para os *loci* analisados, percebe-se o alto polimorfismo das amostras estudadas. Observou-se média de 31,5 alelos, notoriamente superior à maioria dos trabalhos que tem relatado variabilidade de microssatélites em galinhas. Para linhagens de galinhas comerciais (corte ou postura) o número médio de alelos variou de 1,3 e 8,1 nas análises de Croojimans et al. (1997), Liu et al. (2008) e Dávila et al. (2009). Para aves nativas, têm-se observado valores médios entre 3,4 a 19 alelos para os *loci* estudados (Kaya et al., 2008; Fonteque et al. 2014, Kuman et al., 2015).

Todos os *locus* estudados apresentaram alto polimorfismo. Alguns trabalhos com galinhas revelaram comparativamente baixos números de alelos por *locus*. Clemetino (2010) encontrou variação de 9 a 33 alelos por *locus* e Fonteque et al. (2014) encontraram variação de 2 a 28 alelos por *locus*. No entanto, corroborando com os resultados desta pesquisa, Qu et al. (2006) e Kuman et al. (2015) encontraram variação de, respectivamente, 6 a 51 e 5 a 43 alelos por *locus*.

O número de alelos por *loci* em aves nativas em geral são mais elevados do que em aves comerciais devido à forte pressão de seleção que estas últimas são impostas (Blackburn, 2006). Nas populações aqui analisada, os valores foram ainda superiores aos relatados na literatura para galinhas nativas, demonstrando a elevada variabilidade genética das galinhas caipira brasileiras da raça nativa Canelas-Preta, o que as qualificam como fonte de variabilidade genética que, para tanto, devem ser conservadas. Essa informação é relevante no estabelecimento de programas de conservação e melhoramento genético dessa raça.

O valor médio de PIC foi de 0,909, variando de 0,745 (MCWOO81) a 0,967 (LEI0258), o que indica elevada variabilidade e polimorfismo nas populações estudadas, além de inferir que mais informações genéticas podem ser fornecidas por esses *loci* de SSR. Costa et al. (2009) afirmaram que marcadores que apresentam valores de PIC acima de 0,5 são considerados muito informativos, sendo observados em todos os *locus* estudados valores superiores dessa média (Tabela 2).

No presente estudo, os valores de médios de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) foram respectivamente 0,887 e 0,674, o que reflete na adequação desses marcadores para medir a variação genética (Tabela 2). Pela análise dos parâmetros de variabilidade genética pode-se observar que embora a média da heterozigosidade

observada, esteja abaixo que da esperada, este valor é elevado indicando uma alta diversidade nos núcleos estudados. Para aves comerciais (linhagens), têm sido observados valores médios de H_e entre 0,00 (para linhagens altamente endogâmicas) a 0,74, e H_o entre 0,00 a 0,67 (Dávila et al., 2009; Tadano et al., 2009). Para galinhas nativas, os valores ficam em torno de 0,56 a 0,86 para H_e , e entre 0,38 a 0,63 para H_o (Kaya et al., 2008; Fonteque et al., 2014). Os dados dessa pesquisa são compatíveis com os valores encontrados em aves nativas.

Marcador molecular é considerado polimorficamente informativo, sendo, portanto, eficiente para medir a variação genética quando apresenta heterozigosidade maior a 70%. Para Menezes et al. (2006), a heterozigosidade média observada é considerada elevada quando apresenta valores superiores a 0,7, e reduzida, com valores inferiores a 0,5. Já para heterozigosidade média esperada, valores superiores a 0,5 indicam elevada diversidade genética dos marcadores. Heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *locus* marcador e depende do número de alelos e de sua frequência na população podendo ser considerada uma medida de diversidade genética.

Os valores de H_e encontrados por *loci* variaram de 0,721 a 0,941, e os valores de H_o de 0,243 a 0,939. O maior valor de H_e encontrado foi para o *locus* LEI0258, o maior valor de H_o encontrado para o *locus* MCW0081, e os menores valores de H_e e H_o encontrados para os *loci* MCW0081e LEI0248. A H_o foi menor do que a H_e em todos os *loci* estudados. Os marcadores LEI0237, LEI0258, MCW0081, MCW0181 e MCW0213 apresentaram elevado grau de heterozigosidade observada, com valores superiores a 0,7. Apresentando valores intermediários entre 0,7 e 0,5 os marcadores LEI0192, LEI0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0234. Apenas o marcador LEI0248, apresentou nível reduzido de heterozigosidade observada, com valor inferior a 0,5.

Noventa e dois por cento dos marcadores apresentou H_o superior a 0,5. Para heterozigosidade esperada, todos *loci* apresentou valor superior a 0,5. Estes dados indicam uma elevada diversidade genética dos marcadores analisados.

Dos doze *loci* estudados, dez apresentaram desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para as populações em estudo, com exceção dos *loci* MCW0081 e MCW0213. Segundo Fonteque et al. (2014), os desvios de EHW podem ser devidos a diversos fatores, como acasalamentos direcionados, subdivisões dentro das populações,

antepassados comuns, seleção natural ou artificial, migração ou fluxo de genes a partir de população externa, além da presença de alelos nulos. Uma característica em comum das galinhas caipiras é o tipo de sistema de criação. Criação extensiva se dá onde pequenas populações são criadas livres a campo.

Essas populações pequenas geralmente apresentam número reduzido de indivíduos com alto grau de parentesco e pouca utilização de reprodutores (que geralmente são selecionados pela beleza ou porte físico), o que predispõe muito às altas taxas de endogamia. As galinhas brasileiras Canelas-Preta apresentam esse sistema de criação comum das aves caipiras, logo são populações pequenas. Elas são submetidas tanto a seleção natural sobre as fêmeas, como artificial sobre os machos (que correspondem a 50% da genética do rebanho). Observou-se a presença de alelos nulos nas populações estudadas. Estes fatores citados anteriormente (pequena população, alelos nulos) podem justificar o desvio do EHW. A ocorrência de desvios quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi verificada em diversos trabalhos com aves (Dávila et al., 2009; Fonteque, et al., 2014; Kuman et al., 2015).

Os valores de número médio de alelos e heterozigosidades médias encontrados neste estudo sugerem que existe elevada variabilidade genética em galinhas nativas Canelas-Preta. Esta elevada variabilidade genética demonstra a importância à conservação destes animais como fonte de recursos genéticos. Estes recursos poderão, no futuro, serem utilizados em programas de melhoramento genético animal de galinhas.

CONCLUSÃO

As galinhas nativas Canelas-Preta, apresentaram elevada variabilidade genética para os *loci* analisados, o que mostra a conservação desse material genético, que deve ser mais estudado.

Todos os microssatélites utilizados nas análises foram significativamente polimórficos, demonstrando alta variação na amostra, capacitam-se para serem utilizados em análises de variabilidade genética populacional, caracterização de raças e determinação de perfil individual, auxiliando em programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento animal.

REFERÊNCIAS

BLACKBURN, H.D. The National Animal Germplasm Program: Challenges and opportunities for poultry genetic resources. **Poultry Science**, v.85, n.2, p.210–215, 2006.

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

COSTA, J; LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines-Chagas disease vectors. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 46-51, 2009.

CROOIJMANS, R.P.M.A., R.J.M. DIJKIHOFF, J.J. VAN DER POEL & M.A.M. Groenen. New microsatellite marker in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. **Animal Genetics**, 28: 427-437, 1997.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - 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, 58 p, 2004.

FONTEQUE, G. V.; BATTILANA, J.; PALUDO, E.; LIMA-ROSA, C. A. V. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(1): 98-102, janeiro 2014.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Cien. Inv. Agr.**, v.35, p.15-24, 2008c.

LIU, G. Q., JIANG, X. P., WANG, J. Y., WANG, Z. Y., LIU, G. Y., & MAO, Y. J. Analysis of genetic diversity of Yangzhou chicken by microsatellite markers. **Int. J. Poultry Science**, 7, 1237-1241, 2008.

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

KUMAR, V., SHUKLA, S. K., MATHEW, J., & SHARMA, D. Genetic Diversity and Population Structure Analysis Between Indian Red Jungle Fowl and Domestic Chicken Using Microsatellite Markers. **Animal biotechnology**, 26(3), 201-210, 2015.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUK, L.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, 7, 639–655, 1998.

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

MENEZES, M.P.C.; MARTÍNEZ, A.M.; RIBEIRO, M. N.; PIMENTA FILHO, E. C.; BERMEJO, J.V.D. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**, v. 35, p. 1336-1341, 2006.

PEAKALL, R. AND SMOUSE, P.E. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, 28, 2537-2539, 2012.

POSSAMAI, M.H.P. **Análise da variabilidade genética de linhagens de galinhas caipiras brasileiras**, 63 p, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina – Lages-SC, 2011.

QU, L.; LI, X.; XU, G.; CHEN, K.; YANG, H.; ZHANG, L.; WU, G.; HOU, Z.; XU, G.; YANG, N. Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. **Science in China Series C: Life Sciences**, 49(4), 332-341, 2006.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for windows and linux. **Molecular Ecology Resources**, v.8 p.103-106, 2008.

RICE, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, 43: 223-225.

TODANO, R.; NISHIBORI, M.; TSUDZUKI, M. Genetic structure and differentiation of Japanese extremely long-tailed chicken breed (Onagadori). associated with plumage color variation: suggestions for its management and conservation. **Animal Genetics**. v. 40: p. 989-992. 2009.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P.; & SHIPLEY, P.
MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in
microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, 4(3), 535-538, 2004.

ANEXOS

Tabela 1 – Descrição dos Loci de Microssatélites utilizado no estudo da caracterização genética de galinhas Canelas-preta

Nome dos Loci	Nº alelos*	Tamanho Alelos Observado(pb)	sequencia primer Forward	sequencia primer reverse	Ta (°C)	MgCl ² (Mm) (µL)	Localização no mapa	Referência
LEI0192	37	160 - 355	TGCCAGAGCTTCAGTCTGT	GTCATTACTGTTATGTTTATTGC	55	1	Cromossomo 6	FAO (2004)
LEI0209	20	80 - 164	AATTTGGTGTGCATACCTCTCC	GACTTTCAGTGTCTCGTTTAG	49	1,5	Cromossomo 1	McConnell et al., 1999
LEI0212	45	280 - 460	TTTGCCAATCCCTATTGAGC	TTTCATATTTGTGGCGTGC	58	2,5	X	McConnell et al., 1999
LEI0217	44	104 - 376	GATGACTGAGAGAAATAACTTG	AAATTACTGAGGCACAGGAG	55	1,5	Cromossomo 1	McConnell et al., 1999
LEI0221	21	136 - 376	CCTTTATCCACTTTCATGCAC	TGCATAAATTCATGGGTAAGC	58	1,5	Cromossomo 1	McConnell et al., 1999
LEI0234	40	148 - 420	ATGCATCAGATTGGTATTCAA	CGTGGCTGTGAACAAATATG	57	1,5	Cromossomo 2	FAO (2004)
LEI0237	36	176 - 448	GTAAAGTGTCTCTGATGTAGC	CTTCAACTATAAAGCATAGCTG	57	1,5	Cromossomo 2	McConnell et al., 1999
LEI0248	19	156 - 264	TTTGAAAAGTGACCATGATTCTG	AAGCAGTTTCCAAGCTAAGAAC	61	1,5	Cromossomo 2	FAO (2004)
LEI0258	52	125 - 450	CACGCAGCAGAACTTGGTAAGG	AGCTGTGCTCAGTCCTCAGTGC	58	1,5	Cromossomo 16	McConnell et al., 1999
MCW0081	15	50 - 112	GTTGCTGAGAGCCTGGTGACG	CCTGTATGTGGAATTACTTCTC	60	2	Cromossomo 5	FAO (2004)
MCW0183	29	220 - 420	ATCCCAGTGTGAGTATCCGA	TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	64	1	Cromossomo 7	FAO (2004)
MCW0213	19	150 - 352	CTGTTCACTTTAAGGACATGG	GACAAGTCAACAACCTTGCCAG	55	1,5	Cromossomo 13	Crooijmans et al., 1997

X- Cromossomo não informado; *Numero de alelos encontrados na pesquisa

Tabela 2 - Polimorfismo de 12 *loci* de microssatélites em 118 amostras de DNA de galinhas

Canelas-Preta

LOCUS	N_A¹	H_O²	H_E³	⁴T(PB)	PIC⁴
LEI0192	21,333	0,650	0,916	160-355	0,941
LEI0209	14,000	0,695	0,889	80-164	0,902
LEI0212	27,66	0,550	0,936	280-460	0,957
LEI0217	23,333	0,692	0,918	104-376	0,936
LEI0221	14,333	0,550	0,880	136-296	0,892
LEI0234	23,667	0,567	0,925	148-420	0,952
LEI0237	24,333	0,720	0,925	176-448	0,942
LEI0248	12,000	0,243	0,807	156-264	0,854
LEI0258	30,000	0,721	0,941	125-450	0,967
MCW0081	7,667	0,939	0,721	50-112	0,745
MCW0183	20,667	0,829	0,928	220-420	0,940
MCW0213	12,333	0,926	0,860	150-352	0,886
MÉDIA	19,278	0,674	0,887	-	0,909

¹Frequencia de alelos por *locus*; ²Heterozigosidade observada; ³Heterozigosidade esperada; ⁴Tamanho de alelos em pares de base; ⁵Conteúdo de Informação Polimórfica;

ARTIGO 3

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE GALINHAS CAIPIRAS NATIVAS
CANELAS-PRETA**

ARTIGO 3

Caracterização genética de galinhas caipiras nativas Canelas-Preta

RESUMO: Foram utilizados doze marcadores microssatélites para caracterizar geneticamente galinhas caipiras nativas Canelas-Preta no estado do Piauí. Foram coletadas amostras de DNA de 118 galinhas em três municípios do estado. Após extração do DNA foram utilizados marcadores para doze *loci* de microssatélites que foram amplificados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram feitas análises estatísticas da estimativa de heterozigosidades observada e esperada, análise de variância molecular, componentes principais, estatística F de Wright e análise de estrutura populacional com base em análise bayesiana. As análises de diferenciação genética (AMOVA) indicam baixa diferenciação entre os núcleos avaliados, indicando se tratar geneticamente de único grupo. Os resultados da estatística F indica tendência dos indivíduos dos núcleos estudados a endogamia. Gráfico de dispersão e análise bayesiana usados para mostrar a estrutura das aves Canelas-Pretas sugeriram a existência de quatro grupos genéticos e revelaram que há fluxo gênico entre os planteis analisados. Os microssatélites analisados apresentaram alta variabilidade, o que demonstra alta variação nas amostras e revela sua eficiência no estudo de caracterização. Os resultados apontam que as galinhas Canelas-Preta estão geneticamente estruturadas.

PALAVRAS CHAVES: Estrutura populacional, *Gallus gallus*, Microssatélites, Nativa, Polimorfismo, Variabilidade genética

Genetic characterization of Canelas-Preta native hens

ABSTRACT- Twelve microsatellite markers were used to characterize genetically Canelas-Preta native hens in the state of Piauí. DNA samples were collected from 118 hens in three cities in the state. After the DNA extraction, markers were used for twelve microsatellite loci that were amplified by polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis were performed for heterozygosity estimate observed and expected, analysis of molecular variance, principal components, Wright's F-statistics and analysis of population structure based on Bayesian analysis. The analysis of genetic differentiation (AMOVA) indicate low differentiation between the studied cores, indicating it is genetically unique group. The results of the F-statistics indicates tendency of individuals cores studied to inbreeding. Scatterplot and Bayesian analysis used to show the structure of Canelas-Preta birds suggested the existence of four genetic groups and revealed that there is gene flow between the flocks analyzed. The microsatellites showed high variability, which shows high variation in the samples and reveals its effectiveness in the study of characterization. The outcomes show that the Canelas-Preta hens are genetically structured.

KEYWORDS: Population structure, *Gallus gallus*, Microsatellite, Native, Polymorphism, Genetic Variability

INTRODUÇÃO

Nos anos de 1930, a avicultura industrial teve um importante avanço no Brasil, nesse contexto as raças nativas foram sendo substituídas, conseqüentemente, algumas dessas raças entraram em risco de extinção. Porém, em 1980, houve uma crescente demanda por parte dos pequenos criadores por aves caipiras mais rústicas, devido à valorização de produtos naturais e pela rusticidade das mesmas, próprias para criação em sistemas tradicionais. Contudo, para atender essa demanda se fez necessária a busca de aves caipiras adaptadas a cada região. Nesse contexto, as raças nativas tornaram-se potencialmente lucrativas (Fonteque et al., 2014).

Em algumas regiões, as galinhas nativas Canelas-Preta também são conhecidas como “Jacu” e se caracterizam principalmente por possuírem tarso e falanges de colorações pretas, e corpo predominantemente preto com pigmentações nas penas do pescoço nas cores brancas, douradas ou vermelhas e sendo possuidoras de carne de coloração mais escura comparada as demais galinhas caipiras. Pouco se conhece sobre a genética dessas aves nativas.

A caracterização genética de galinhas nativas vem sendo feita por alguns países com intuito de evitar a perda desse importante material genético, porém, apenas 25% das raças de galinhas nativas estão em algum tipo de programa de conservação, fator esse que precisa urgentemente ser revertido (Clementino, 2010).

Marcadores moleculares têm sido utilizados para estudos de caracterização genética de populações de galinhas nativas. O mais utilizado é o microssatélite, sequências repetitivas de DNA, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR). Geralmente, são repetições de mono, tetra e principalmente dinucleotídeos, e estão localizados entre os genes ou dentro de íntrons (Dávila et al., 2009).

Na literatura consultada não foram encontradas respostas de pesquisas envolvendo as galinhas Canelas-Preta, o que sugere a necessidade de caracterizar geneticamente esse importante material genético. Nesse contexto, o objetivo com esta pesquisa foi caracterizar geneticamente e avaliar a estrutura populacional de galinhas caipiras da raça Canelas-Preta em três municípios do estado do Piauí.

MATERIAL E MÉTODOS

- **Amostragem e áreas de coleta**

Para a realização da pesquisa foram utilizadas galinhas nativas Canelas-Preta de criatórios de agricultores credenciados no Projeto Produtores do Futuro no Piauí. O projeto de pesquisa foi cadastrado no comitê de ética Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e, posteriormente, os objetivos da pesquisa foram esclarecidos aos criadores, que aceitaram participar do projeto, autorizando a coleta dos dados em sua propriedade, em seguida, foi realizada a coleta do material biológico (sangue) nos núcleos.

Para as análises experimentais foram utilizadas 118 galinhas caipiras nativas Canelas-Preta, provenientes de cinco núcleos situados em três municípios do estado do Piauí, amostradas em janeiro de 2015. Sendo 38 amostras do núcleo Genesis, localizado no município de Teresina; 21 amostras do núcleo do povoado Caldeirões e 16 amostras do núcleo de São Francisco, ambos localizados na região do município de Oeiras; 19 amostras do núcleo da comunidade Tapuio e 24 amostras na comunidade indígena Serra Grande, ambas localizadas no município de Queimada-Nova, PI.

As amostras de sangue foram retiradas da veia ulnar das aves e posta sobre papel filtro, após a secagem do sangue sobre o papel em ambiente natural, este foi colocado dentro de envelope e identificado com as informações de cada ave. Os municípios selecionados para realização da pesquisa encontram-se descritos na Figura 1.

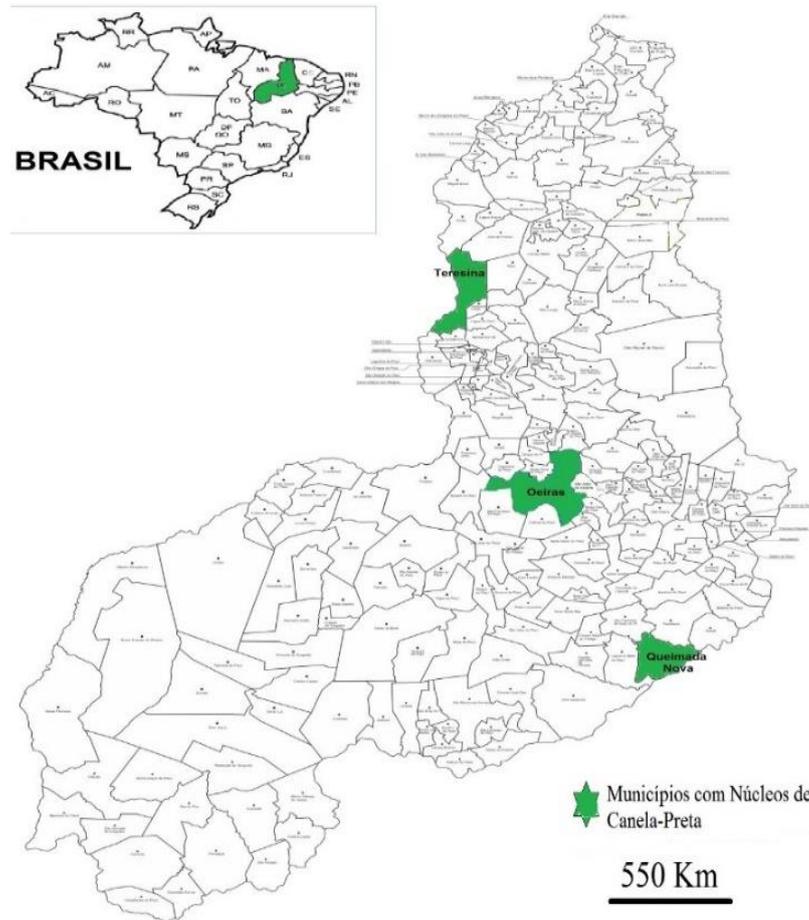


Figura 1- Mapa da localização dos municípios onde cada amostra foi coletada dentro do estado do Piauí. Núcleos de galinhas Canelas-Preta em Teresina, Oeiras e Queimada –Nova.

- **Análises laboratoriais**

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Genética Molecular Aplicada do Departamento de Zootecnia da UFVJM, localizado no município de Diamantina - MG. Utilizou-se fragmento de cada amostra, de 0,5cm do papel filtro para o procedimento da extração do DNA genômico, que por sua vez, foi realizado através do protocolo de extração salina estabelecido por Lopera-Barrero et al. (2008). A quantificação do DNA foi feita no espectrofotômetro com amplitude de onda de 260 nm e as amostras diluídas para uma concentração de 10 ng/μl. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese horizontal usando um gel de agarose 1%, a 70 V por 70 minutos e, posteriormente, capturou-se a imagem no sistema fotográfico UV-312.

A amplificação dos fragmentos de DNA desejados foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), conforme descrita por McConnell et al. (1999), a partir do DNA total. Foram utilizados 12 *loci* de microssatélites desenhados

para espécie *Gallus gallus*: LEI0192, LEI0234, LEI0248, MCW0081, MCW0183 (FAO, 2004), LEIO0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0237, LEI0258 (McConnell et al., 1999), MCW0213 (Crooijmans et al., 1997), seguindo as condições iniciais de padronização da PCR sugerida por cada autor.

Os *primers* foram testados com o DNA de 10 aves diferentes para verificação da amplificação e padronização das reações PCR. As misturas para as reações da PCR e respectivas concentrações dos reagentes foram as seguintes: 50 ng de DNA, 2,5 µL de tampão 10X (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl), 1-2,5 µL (20-50 mM) de MgCl₂, 2 µL da mistura de dNTP (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,8 µM de cada iniciador, 0,5 unidades de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec) e H₂O para completar o volume final de 16 µL.

A mistura total da reação PCR foi submetida ao termociclador nas seguintes etapas: 1 minuto de desnaturação inicial a 94°C; 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 49-64°C (dependendo do par de iniciadores – ver Tabela 1) e 50 segundos de extensão a 72°C; bem como 5 minutos de extensão final a 72°C. Os produtos das reações de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante a 10%. Para visualização dos fragmentos no gel, este último foi submetido a uma solução de fixação (10% etanol, 0,5% ácido acético) por 20 min, depois outra solução contendo 6 mM de nitrato de prata por 30 min e posteriormente com uma prévia lavagem com água destilada, foi submersa numa solução reveladora com 0,75 M NaOH, 0,22% e formol 40%. Cada gel foi fotografado com uma câmera digital.

Foi utilizado marcador de DNA com bandas de comprimento conhecido, variando em 50 pares de bases (pb) (Invitrogen), para auxiliar na determinação do tamanho dos fragmentos. Após a determinação das condições ideais de PCR para cada *primer*, foram realizadas as genotipagens dos marcadores.

- **Análises estatística**

O programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi usado para calcular as estimativas de heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o).

Foi calculado o número efetivo das populações totais estudadas pela seguinte fórmula:

$$N_e = \frac{(4N_m N_f)}{(N_m + N_f)}$$

Onde, N_e é o tamanho efetivo populacional, N_m é número de machos e N_f é o número de fêmeas. As estimativas F de Wright (Fis, Fct, Fit), bem como a variância genética global entre os núcleos estimadas por Análise de Variância Molecular – AMOVA (Excoffier, Smouse e Quattro, 1992), a matriz de dissimilaridade, os componentes principais (PCoA) e o gráfico de dispersão também foram calculados pelo programa *GenAlEx 6.5*.

As estimativas F utilizam coeficientes de endocruzamento para medir a variabilidade intra e interpopulacional. Fis é o coeficiente de endogamia ou índice de fixação dentro dos indivíduos relacionados à população, que mensura a redução da heterozigosidade de um indivíduo devido a acasalamentos aleatórios na subpopulação. O coeficiente de endogamia dos indivíduos com relação ao total (Fit) e considera além dos acasalamentos ao acaso, a diferenciação no âmbito genético entre as subpopulações. O coeficiente de endogamia dentro da subpopulação com relação ao total (Fst) fornece a percentagem total da diversidade genética que está distribuída entre as subpopulações (Wright, 1951).

A análise de variância molecular (AMOVA) entre e dentro das populações e indivíduos, analisada no mesmo programa, utilizando 10.000 permutações para os cálculos. Esta levou em consideração o agrupamento das amostras *a priori* onde as mesmas foram organizadas por municípios. O programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard; Stephens; Donnelly, 2000), foi utilizado para definir o número de grupos (K) mais provável nas amostras coletadas, por meio de métodos Bayesianos sem informações *a priori* sobre a origem das amostras. Foram utilizadas 150.000 simulações de Cadeias de Markov Monte Carlo com *burn in* de 50.000, modelo de ancestralidade *admixture*, e testados valores de K variando de 1 a 7, com cinco interações. A determinação do K mais provável em relação aos propostos foi realizada utilizando valores de ΔK (Evanno; Regnault; Goudet, 2005), como segue:

$$\Delta K = \frac{m \Delta L' (K + 1) - L' (K)}{s [L (K)]}, \quad \text{Onde } L: \frac{L' (K) = L (K) - L (K - 1)}{s [L (K)]}$$

Sendo m = média, s = desvio padrão, K = número de grupos propostos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados observados nos doze marcadores microssatélites selecionados indicaram valores médios de heterozigosidade observada (H_o) de 0,674 e de heterozigosidade esperada (H_e) de 0,887. A H_e e H_o variaram pouco entre os núcleos (Tabela 1). Os polimorfismos genéticos apresentam relevância em análises das relações genéticas entre subpopulações de uma espécie (Hartl; Clark, 2010). Estudos com galinhas mostram a importância dos microssatélites em análises de parentesco e diversidade genética, as informações oriundas desses marcadores microssatélites podem auxiliar no planejamento de cruzamentos tecnificados, reduzindo valores expressivos de taxas endogâmicas e perda de alelos no melhoramento dos animais (Qu et al., 2006; Fonteque, 2010).

Os valores médios de heterozigosidades observada e esperada para as populações de galinhas Canelas-Preta foram considerados altos, com médias similares entre os núcleos. Dados de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis também mostraram altos valores de heterozigosidade para a raça, também utilizando microssatélites ($H_o = 0,491$ e $H_e = 0,756$) (Fonteque et al., 2014). Sabe-se que as galinhas de raças nativas são consideradas altamente polimórficas, isso se dá, devido a base formadora desses animais, também é possível que essas aves sofram processos de introgressão recente com outros materiais genéticos (Clementino, 2010).

Com relação às estimativas de variação genética observou-se que, em cada local amostrado, houve valores positivos para índice de fixação F . O coeficiente de endogamia é baseado nas medidas de H_o e H_e . Valores positivos indicam quantidade de heterozigotos abaixo do que era esperado, o que pode sugerir a endogamia como fator influenciador das mudanças nas frequências genotípicas (McManus et al., 2011). Neste trabalho houve variação entre os índices de heterozigosidade, com H_o pouco menor que a H_e . As estatísticas F de Wright que também são considerados análises de estrutura populacional mostraram que, no geral, as aves estudadas formaram grupos genéticos com correspondência aos seus respectivos municípios.

Dos 118 indivíduos amostrados, ao fazer o cálculo do tamanho efetivo, esse número reduziu para 64,6, o que pressupõe que está havendo acasalamentos entre indivíduos aparentados. Esse tipo de acasalamento influencia no incremento da endogamia e no desvio de equilíbrio de desvio do EHW. Estes resultados mostram que as populações podem estar sendo influenciadas pelas mudanças nas frequências alélicas (Rengmark et al., 2006) e pelo efeito de gargalo de garrafa.

Pela Análise de Variância Molecular (AMOVA) pôde-se perceber que a maior parte da variabilidade genética se encontrou uniformemente distribuída dentro dos núcleos (97%). O alto valor obtido mostrou que as localidades não estão apresentando características genéticas marcadamente distintas. A variância entre núcleos/populações representou apenas 3% da variação total (Tabela 2), isso demonstra que os indivíduos estudados dos três núcleos podem ser considerados como grupo geneticamente estruturado numa única população. Esses dados corroboram com a maioria dos estudos de diversidade onde a variabilidade genética dentro das populações é geralmente maior que entre populações (Clementino, 2010; Muchadeyi et al. 2007).

As variações gênicas dentro da população são relevantes para qualquer espécie, não apenas por favorecer processo de especiação, mas também por ser um dos pilares para elaboração de programas de melhoramento genético e conservação. Mariante et al. (2008) confirmam que as raças nativas apresentam maior variabilidade gênica que as raças exóticas, ressaltando a importância de que estas sejam conservadas.

O gráfico de dispersão gerado a partir da matriz de dissimilaridade apresentou elevada variabilidade genética nas galinhas Canelas-Preta (Figura 2), com a formação de três grupos distintos que correspondem aos municípios nos quais foram coletadas as amostras. Observou-se também um quarto grupo disperso dos demais, provavelmente de animais com características próprias, que podem estar passando por um processo de microevolução ou pode ser um material mestiçado com genética externa, que não são necessariamente materiais exóticos. Observa-se, ainda, na Figura 2 que existe certa similaridade entre os indivíduos que forma, os grupos. Esse fato se justifica devido os núcleos de Canelas-Preta estudados pertencerem a um programa que pratica rodízio de reprodutores entre os núcleos, propiciando conexão genética entre as populações.

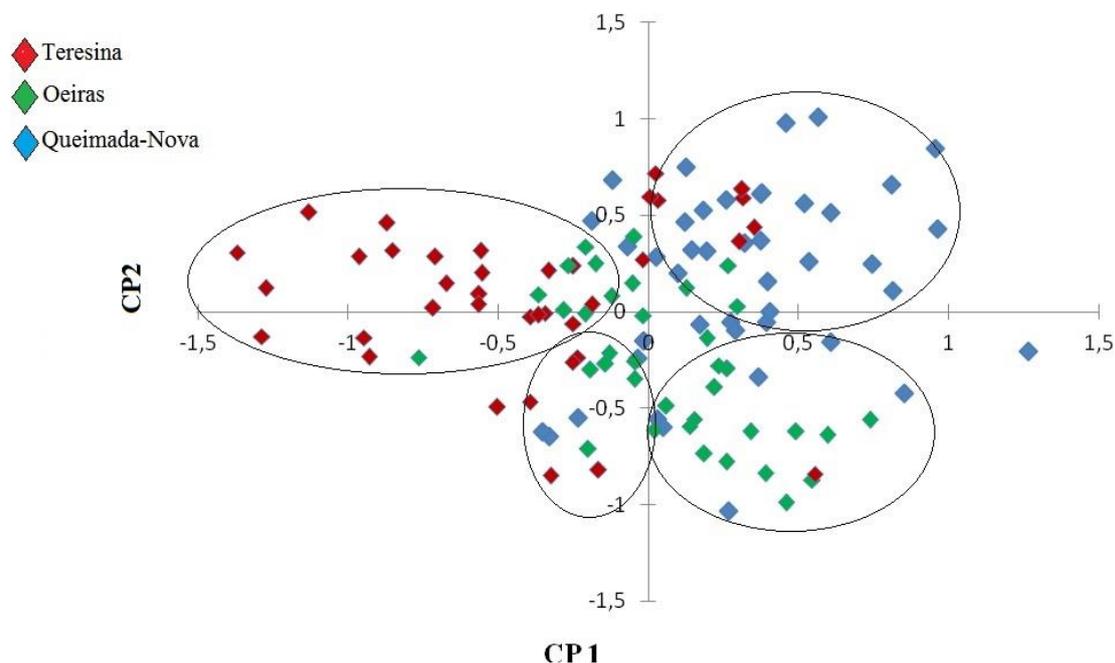


Figura 2 – Dispersão gráfica das distancias intra populacional dos três núcleos de galinhas Canelas-preta (Teresina, Oeiras e Queimada Nova) em relação aos eixos cartesianos estabelecidos pelos componentes principais (PC₁ e PC₂) baseada na matrix de dissimilaridade.

A abordagem bayesiana implementada no software STRUCTURE foi usado para encontrar a estrutura da população estudada, com base na associação das frequências alélicas e proposição de mistura entre os indivíduos dos núcleos avaliados sem informação a priori sobre ancestralidade. Outros pesquisadores em trabalhos recentes também utilizaram a abordagem bayesiana para encontrar a estrutura de populações de galinhas (Granevitze et. al., 2009; Kuman et. al., 2015).

Fazendo uma análise geral estrutura de populações sugeridas pelo método bayesiano, o maior valor para ΔK encontrado foi $K=4$ (Figura 3A). Esses resultados indicam que a análise de agrupamento do programa Structure pode proporcionar precisas representações das relações genéticas existentes entre os núcleos de galinhas Canelas-preta, o qual sugere que existem quatro grupos genéticos, corroborando com o gráfico de dispersão citado acima.

Analisando a Figura 3(B), e avaliando o resultado de cada população individualmente, a população 1 mostra predominância de dois materiais genéticos diferentes, que seriam referentes aos dois núcleos distintos coletados em amostras no município de Queimada-Nova. Na população 2 (Oeiras), também há dois grupos genéticos, porém um com genética semelhante a um dos grupos de Queimada-Nova,

fato que possivelmente possa ser explicado pela localização geográfica menos distante entre esses dois municípios, o que pode inferir em maior facilidade de migração de material genético entre esses núcleos.

Ressalte-se que em Oeiras também foi coletado amostras de dois núcleos. Na população 3 (Teresina), que mostra uma maior homogeneidade genética, foram coletadas amostras apenas de um núcleo, onde no manejo deste, há forte pressão de seleção, devido a escolha dos reprodutores e o descarte programado das matrizes.

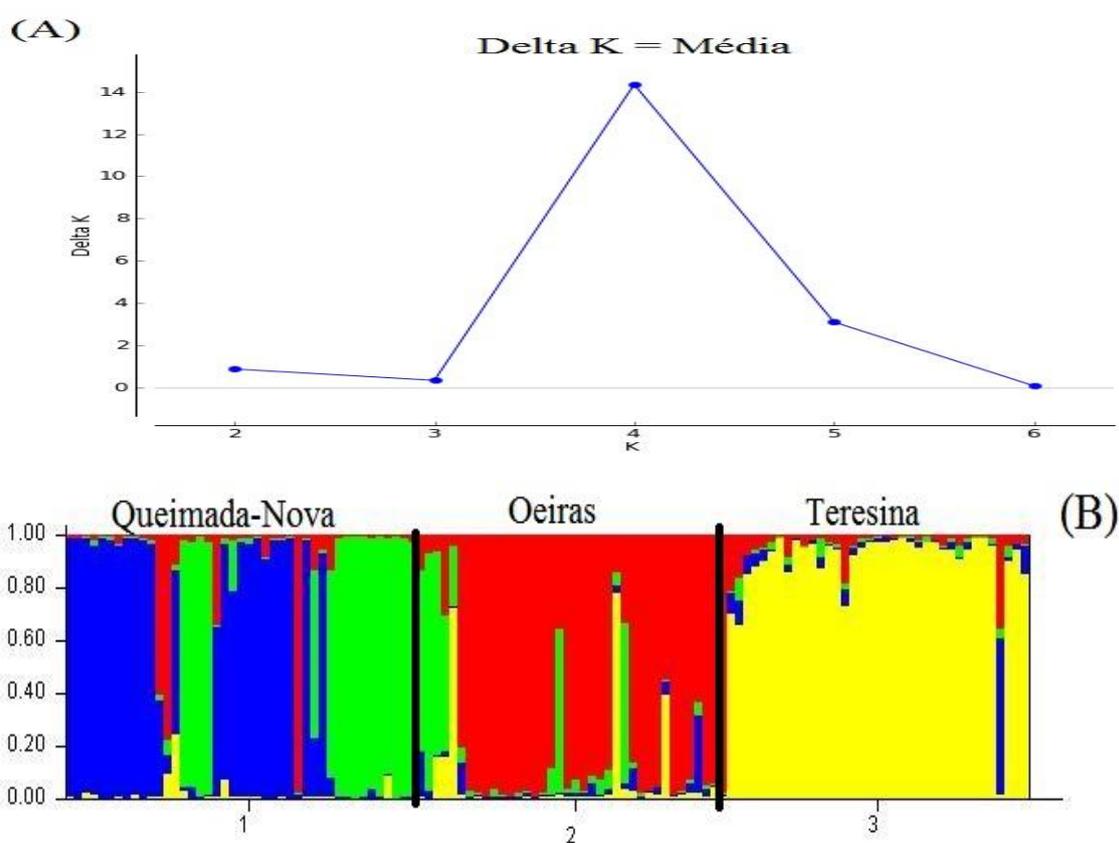


Figura 3– (A) Representação gráfica do valor de K para a formação de grupos de galinhas Canelas-preta. Os resultados indicam partição de ideal de grupos K= 4. (B). Análise de estrutura populacional de 118 indivíduos representando quatro grupos de galinhas Canelas-Preta com base em doze marcadores de microssatélites. Cada grupo está representado por uma cor específica. O eixo y exibe a estimada ascendência de cada indivíduo em um determinado grupo ou sub-população: usando o modelo de mistura.

A análise bayesiana revela que nas populações estudadas há presença de indivíduos similares de origem entre as localidades avaliadas. Ou seja, está ocorrendo fluxo gênico entre as populações. Este último, pode está sendo provocado pelo sistema de acasalamento praticado no manejo das Canelas-Preta (rodízio de reprodutores).

Nas últimas décadas, devido à elevada pressão de seleção surgiram várias raças de galinhas especializadas em carne e ovos. Muitas dessas raças comerciais foram e, continuam sendo, adquiridas por pequenos agricultores e introduzidas para cruzamentos desordenados ou substituição das raças nativas. Com essa introdução de raças comerciais tem ocorrido elevada erosão genética das raças nativas, o que as colocou atualmente em risco de extinção (Fonteque, 2011). Com isso, surge a necessidade de se estabelecer programas que promovam o uso racional das raças nativas, do contrário, perderemos esses valiosos recursos genéticos.

Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem subsídios para diversas investigações acerca das galinhas nativas Canelas-Preta nos municípios do Piauí, especialmente na área genética, onde os trabalhos com marcadores moleculares ainda são escassos. Os índices endogâmicos reportados e fluxo gênico entre os animais amostrados podem indicar uma possível preocupação em conservar a variabilidade das galinhas nativas Canelas-Preta, sugerindo realização de programas específicos de acasalamentos entre esses animais.

CONCLUSÃO

Ao analisar os indivíduos dos núcleos, foi possível verificar a existência de alta variabilidade genética intrapopulacional, o que indica que os núcleos foram formados com suficiente variabilidade genética (efeito fundador). Essa elevada diferenciação genética dentro das populações somada a baixa diferenciação entre as populações, permite afirmar que os indivíduos analisados pertencem a único grupo genéticos, ou seja, Canela-Preta é uma raça nativa geneticamente estruturada.

REFERÊNCIAS

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

CROOIJMANS, R.P.M.A., R.J.M. DIJKHOF, J.J. VAN DER POEL & M.A.M. Groenen. New microsatellite marker in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. **Animal Genetics**, 28: 427-437, 1997.

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

EVANNO, G.; REGNAULT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.P.E.; MOUSE, S.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA data. **Genetics**, 131: 479-491, 1992.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - 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, 58 p, 2004.

FONTEQUE, G.V. **Investigação da variabilidade genética de quinze loci de microssatélites em galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis**, 2011, 51p, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages - SC.

FONTEQUE, G. V.; BATTILANA, J.; PALUDO, E.; LIMA-ROSA, C. A. V. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg. Caipira) chickens, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 34(1): 98-102, janeiro 2014.

GRANEVITZE, Z.; HILLEL, J.; FELDMAN, M.; SIX, A.; EDING, H.; WEIGEND, S. Genetic structure of a wide-spectrum chicken gene pool. **Animal Genetics**, 40:686–693, 2009.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 3 editions. Sinauer Associates, Sunderland, 481pp, 2010.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Cien. Inv. Agr.**, v.35, p.15-24, 2008c.

KUMAR, V., SHUKLA, S. K., MATHEW, J., & SHARMA, D. Genetic Diversity and Population Structure Analysis Between Indian Red Jungle Fowl and Domestic Chicken Using Microsatellite Markers. **Animal biotechnology**, 26(3), 201-210, 2015.

MARIANTE, A.S.; EGITO, A.A.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; PAIVA, S.R.; RAMOS, A.F. Managing genetic diversity and society needs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 127-136, 2008.

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

MCMANUS, C.; PAIVA, S. **Estatísticas para descrever genética de populações**. Informação Genético-Sanitária da Pecuária Brasileira. Publicado on-line em www.animal.unb.br em 07.01.2011.

MUCHADEYI, F.C.; EDING, H.; WOLLNY, C.B.A.; GROENEVELD, E.; MAKUZA, S.M.; SHAMSELDIN, R.; SIMIANER, H.; WEIGEND, S. Absence of population substructuring in Zimbabwe chicken ecotypes inferred using microsatellite analysis. **Animal Genetics**, 38(4), 332-339, 2007.

PEAKALL, R. AND SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, 28, 2537-2539, 2012.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 15:945–959, 2000.

QU, L.; LI, X.; XU, G.; CHEN, K.; YANG, H.; ZHANG, L.; WU, G.; HOU, Z.; XU, G.; YANG, N. Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. **Science in China Series C: Life Sciences**, 49(4), 332-341, 2006.

RENGMARK, A.H.; SLETTAN, A.; SKAALA, O.; LIE, O.; LINGAAS, F. Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. **Aquaculture**, v.253, p.29-237, 2006.

WRIGHT, S. **Annals Eugenics**, 1-5, 323-354, 1951.

ANEXOS

Tabela 1 - Média e erro padrão para diversas estimativas ao longo de cada *locus* em cada População. (N = número de indivíduos; Ho = Heterozigosidade observada; He = Heterozigosidade esperada; uHe = Heterozigosidade esperada com fator de correção para tamanho amostral $[2N/(2N-1)]$; F = índice de fixação de Wright $[1-(Ho/He)]$).

Fontes de variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	Componentes de variação	%	F(Pvalor)
Entre populações	2	39,075	19,538	0,160	3%	¹ Fst=0,029 (0,001)
Entre Indivíduos	115	802,870	6,981	1,539	27%	² Fit=0,283 (0,001)
Dentro Indivíduos	118	460,500	3,903	3,903	70%	³ Fis=0,303 (0,001)
Total	235	1302,445		5,602	100%	

Tabela 2 – Estatística da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 12 loci de microssatélites em populações de galinhas nativas Canelas-Preta dos municípios Queimada Nova, Oeiras e Teresina /PI. ¹Índice de fixação entre núcleos; ²Índice de fixação entre indivíduos; ³Índice de fixação dentro de indivíduos.

POPULAÇÃO		N	HO	HE	UHE	F
TERESINA	Média	36,3	0,650	0,887	0,899	0,269
	Desvio		0,058	0,017	0,017	0,092
OEIRAS	Média	36,3	0,727	0,889	0,901	0,172
	Desvio		0,059	0,024	0,025	0,081
QUEIMADA-NOVA	Média	41,3	0,643	0,885	0,896	0,256
	Desvio		0,063	0,021	0,022	0,067
TOTAL	Média	38	0,674	0,887	0,899	0,233
	Desvio		0,034	0,012	0,012	0,046

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização genética com uso de Microsatélites forneceu uma visão sobre a estrutura populacional das galinhas Canelas-Preta do estado do Piauí, ressaltando que os marcadores microssatélites e os descritores quantitativos e qualitativos utilizados foram eficientes no estudo da caracterização genética e fenotípica dessas aves.

Esta pesquisa gerou demanda de novos trabalhos, uma vez que demonstrou tratar de uma raça geneticamente estável. Os resultados encontrados podem ser usados em futuras estratégias de gestão genética dos rebanhos de Canelas-Preta, usando-os como base para programas de conservação, utilização e melhoramento da raça.

O uso do melhoramento participativo, associado à utilização do BLUP como preditor de seleção, são ferramentas que poderão auxiliar programas de melhoramento das Canelas-Preta. A execução dessa proposta também propiciará a raça, sua expansão e reintrodução em suas localidades de origem, fortalecendo e estimulando a produção eficiente e sustentável dessas aves.