

ALBERTO ALEXANDRE DE SOUSA BORGES

**INFORMAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR EM POPULAÇÕES
LOCALMENTE ADAPTADAS DE *Gallus gallus domesticus* DA SUB-REGIÃO
MEIO-NORTE DO BRASIL**

TERESINA – PI

2021

**INFORMAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR EM POPULAÇÕES
LOCALMENTE ADAPTADAS DE *Gallus gallus domesticus* DA SUB-REGIÃO
MEIO-NORTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Produção Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Mello de Araújo

TERESINA – PI

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processos Técnicos

B732i Borges, Alberto Alexandre de Sousa

Informação genética molecular em populações localmente adaptadas de *Gallus gallus domesticus* da Sub-Região Meio-Norte do Brasil. / Alberto Alexandre de Sousa . -- 2021.

52 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciência Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2021.

“Orientador: Prof.^a Dr.^a Adriana Mello de Araújo”

1. Recurso genético 2. Genotipagem 3. Semiárido. I. Araújo, Adriana Mello de. II. Título.

CDD 636.50821

**INFORMAÇÃO GENÉTICA MOLECULAR EM POPULAÇÕES LOCALMENTE
ADAPTADAS DE *GALLUS GALLUS DOMESTICUS* DA SUB- REGIÃO MEIO-
NORTE DO BRASIL**

ALBERTO ALEXANDRE DE SOUSA BORGES

Dissertação aprovada em: 30/08/2021

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Adriana Mello de Araújo (Presidente) / EMBRAPA



Prof. Dr. Natanael Pereira da Silva Santos (Interno) / DZO/CCA/UFPI



Profa. Dra. Mônica Corrêa Ledur (Externa) / EMBRAPA



Prof. Dr. José Williams Gomes de Oliveira Filho (Externo) / IFPI

“Entregue o seu caminho ao senhor;

confie nele, e ele agirá”

(Salmos 37:5)

Aos meus pais Elzira de Sousa e José Alberto (*in memoriam*), e ao meu irmão Carlos Alberto, por tudo que representam na minha vida!

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ser a minha fortaleza, a minha inspiração, e por nunca ter deixado eu desistir em meio as dificuldades, tanto acadêmicas, quanto pessoais e familiares. Todas as minhas conquistas, eu devo a ele!

À minha querida mãe, Elzira de Sousa, a mulher mais forte que eu conheço, por ser o meu aconchego, minha base, por sempre me educar pelos bons caminhos (junto com meu pai), e por sempre me incentivar nos estudos.

Ao meu querido pai, José Alberto, por ter sido o meu maior exemplo de pessoa aqui na terra. Seus ensinamentos jamais serão esquecidos, e meu sonho era que o senhor estivesse vivo nesse dia, para vivenciar junto com nossa família esse momento, mas para sempre o senhor estará vivo em nossos corações. Saudades eternas!

Ao meu querido irmão, Carlos Alberto, por sempre estar comigo em todos os momentos, e por ser o meu confidente, e meu melhor amigo.

A todos os meus familiares, pelo apoio, e por sempre acreditarem em mim.

À minha namorada, Maria Clara, por toda a parceria, carinho, amor, e por sempre acreditar em mim, e me apoiar em todas as circunstâncias.

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Mello, por todos os ensinamentos, pelo acolhimento, paciência, e por acreditar em mim, desde os tempos de PIBIC. Serei eternamente grato!

À Dra. Mônica Ledur, por me receber tão bem na Embrapa Suínos e Aves, pela paciência, e por todas as sugestões e ensinamentos. Obrigado por tudo!

Ao Prof. Dr. José Williams, por ter sido a pessoa que me incentivou nos estudos ainda na graduação no IFPI, por todos os ensinamentos, paciência, e por acreditar em mim. Se hoje estou aqui, devo muito ao senhor.

Ao Dr. Geice Ribeiro, por sempre estar disponível a me ajudar, seja nas práticas de laboratório desde o PIBIC, seja em outros diversos trabalhos. O meu muito obrigado!

Ao Alexandre Tessmann, que me recebeu como um pai na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia – SC), me auxiliando todos os dias nos procedimentos de laboratório, além de fazer com que

eu me sentisse acolhido, em um lugar longe da minha casa. Eu jamais me esquecerei de você, meu amigo!

À dona Marlene e seus familiares, pelo excelente acolhimento que eu tive na sua casa, em Concórdia – SC.

Ao Sr. José Alves da Silva Câmara, proprietário da fazenda Lagoa em São Miguel do Tapuio - PI, por ter contribuído com a pesquisa, cedendo suas aves.

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), por abrir as portas para a realização da pesquisa, desde a época de Pibic.

À Universidade Federal do Piauí (UFPI), pela oportunidade do curso de mestrado.

A todos os demais funcionários da Embrapa Suínos e Aves, em especial a Adriana Ibelli, por sempre estar comigo, sempre preocupada com o meu bem estar, e com a minha pesquisa, bem como as estagiárias do laboratório Débora e a Ágata, por todo o apoio.

A todos os funcionários da Embrapa Meio-Norte, que fizeram parte de toda a minha trajetória, em especial o Sr. Ozires e o Sr. Maurício, que sempre estiveram comigo nas coletas.

A todos os meus amigos, em especial os do meu querido bairro Santa Clara, por todo o apoio e parceria.

Aos meus amigos da graduação do curso de Biologia do IFPI, pelo apoio, e por sempre me incentivarem a continuar. Grato pela amizade!

À CAPES, pela concessão da bolsa. Sem ela, não seria possível a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO:	13
ABSTRACT:	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Histórico da avicultura no Brasil.....	16
2.2 Características gerais das galinhas.....	17
2.3 Recursos genéticos animais: preocupação mundial.....	19
2.4 Perspectivas futuras.....	20
2.5 Marcadores utilizados na análise de diversidade genética.....	20
2.6 Marcadores moleculares: Microsatélites.....	21
2.7 Parâmetros de diversidade genética: Ho, He e PIC.....	22
2.8 Diferenciação genética entre subpopulações: Fst.....	23
2.9 Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	23
2.10 Efeito gargalo de garrafa.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
CAPÍTULO 1:	27
RESUMO:	28
ABSTRACT:	28
INTRODUÇÃO.....	29
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
Caracterização dos animais pesquisados.....	30
Coleta e armazenagem do material.....	33
Extração do DNA.....	34
Amplificação do DNA genômico: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e genotipagem..	34
Análises dos dados.....	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
CONCLUSÃO.....	40
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	44
APÊNDICES.....	45

LISTA DE TABELAS

ANEXOS

Tabela 1 - Marcadores Microsatélites utilizados na pesquisa, localização cromossômica e sequencia (Forward/Reverse) de acordo com ISAG/FAO.....44

APÊNDICES

Tabela 2 - Parâmetros de diversidade genética, englobando todos os indivíduos do plantel da Embrapa Meio-Norte45

Tabela 3 – Parâmetros de diversidade genética, englobando os indivíduos do plantel da Embrapa Meio-Norte, separados por localidade 46

Tabela 4 - Parâmetros relacionados ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.....47

Tabela 5 - Valores de P obtidos na análise feita no software Bottleneck, para a detecção de gargalos populacionais, nos 4 grupos de aves para diferentes modelos de mutação.....48

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Brejo (MARANHÃO); B: galinha com o fenótipo de penas frisadas (MARANHÃO).....17

Figura 2 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Chapadinha (MARANHÃO); B: galinha do grupo Canela-Preta 18

Figura 3 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Itapecuru (MARANHÃO); B: galinha da cidade de Paulistana (PIAUI)18

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Localidades de origem das aves do Núcleo de conservação da Embrapa-Meio-Norte (Estado do Maranhão). 1. Itapecuru-Mirim; 2. Chapadinha; 3. Brejo.....30

Figura 2 - Localidades de origem das aves do Núcleo de conservação da Embrapa-Meio-Norte (Estado do Piauí). 1. Teresina; 2. Picos; 3. Jaicós; 4. Paulistana31

Figura 3 - Mapas dos estados do Maranhão e do Piauí, com as respectivas localidades destacadas 31

Figura 4 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Brejo (MARANHÃO); B: galinha da localidade de Itapecuru-Mirim (MARANHÃO)..... 32

Figura 5 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Chapadinha (MARANHÃO); B: galinha com o fenótipo de penas frisadas, de Chapadinha (MARANHÃO) 32

Figura 6 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha caracterizada como Canela-preta; B: galinha oriunda de Paulistana (PIAUI) 33

Figura 7 - *FTA card*, contendo gotas de sangue das aves.....33

APÊNDICES

Figura 8. Eletroferograma dos marcadores ADL0268, MCW0020, MCW0037 e MCW0069, e seus respectivos alelos.....49

LISTA DE ABREVIATURAS

DAD-IS - *Domestic Animal Diversity Information System*

FAO - Food and Agriculture Organization

FTA - *Flinders Technology Associates*

HWE – *Hardy-Weinberg Equilibrium*

IAM - Infinite Alleles Model

PCR - Polymerase Chain Reaction

PIC – Polymorphism Information Content

SMM - Stepwise Mutation Model

SSR – Simple Sequence Repeats

TPM - Two Phase Model

RESUMO:

Em galinhas de pequenas propriedades, espera-se que o nível de diversidade genética seja alto, devido aos diversos cruzamentos realizados desde a época da introdução das mesmas aqui no Brasil. Com isso, a pesquisa tem como objetivo identificar se há diversidade genética de galinhas *Gallus gallus domesticus* da sub-região Meio-Norte do Brasil, através de marcadores moleculares do tipo microssatélite. Foram coletadas amostras de sangue de 37 aves, em *FTA (Flinders Technology Associates) cards*. As aves eram oriundas de duas microrregiões do estado do Maranhão (Itapecuru-Mirim, 11 aves e Chapadinha, 13 aves) e uma microrregião do Piauí (Paulistana, 6 aves), e aves Canela-Preta (7 aves) de Teresina. O DNA extraído a partir dos *FTA cards* foi amplificado em PCR e genotipado em sequenciador. Os 15 primers ISAG/FAO selecionados para o estudo amplificaram com sucesso, mostrando 84 alelos distintos na genotipagem das 37 aves. O valor médio de heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,726, e o valor médio de heterozigosidade observada em todos os indivíduos foi de 0,681. A riqueza alélica (AR) média em todo o plantel foi de 6,281, seguido de média de 0,673 para o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). O grupo 1 (Brejo/Itapecuru) obteve o maior número de marcadores (LEI0216, MCW0037, LEI0192 e LEI0094) que apresentaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg e todos eles apresentaram déficit de heterozigotos. O (F_{st}) apresentou média de 0,0266, o que é considerado baixo, e, portanto, não foi possível verificar a existência de diferenciação genética entre os grupos. Conclui-se que os marcadores utilizados foram informativos para o estudo de diversidade genética. As aves do Núcleo da Embrapa Meio-Norte, apesar dos testes estatísticos não terem detectado diferença entre os grupos, demonstraram ter diversidade genética, com base nos índices de H_e , H_o e PIC. Por se tratar de uma caracterização genética, essa pesquisa é de extrema importância, para que ações de manejo genético sejam realizadas, além de futuras pesquisas que oportunizem a conservação dos recursos genéticos.

Palavras-chave: Recurso genético. Genotipagem. Semiárido.

ABSTRACT:

In chickens from small properties, it is expected that the level of genetic diversity is high, due to the various crosses made since the time of their introduction here in Brazil. With this, the research aims to identify if there is genetic diversity of *Gallus gallus domesticus* chickens from the Mid-Northern subregion of Brazil, through microsatellite molecular markers. Blood samples were collected from 37 birds in *FTA cards*. The birds came from two microregions of the state of Maranhão (Itapecuru-Mirim, 11 birds and Chapadinha, 13 birds) and a microregion of Piauí (Paulistana, 6 birds), and Canela-Preta birds (7 birds) from Teresina. DNA extracted from *FTA cards* was amplified in PCR and genotyped in sequencer. The 15 primers ISAG/FAO choose in the study successfully amplified, showing 84 different alleles in the genotyping of 37 birds. The mean value of expected heterozygosity (H_e) was 0.726, and the mean value of heterozygosity observed in all individuals was 0.681. The average allelic richness (AR) in the the whole flock was 6.281, followed by an average of 0.673 for polymorphic information content (PIC). Group 1 (Brejo/Itapecuru) obtained the highest number of markers (LEI0216, MCW0037, LEI0192 and LEI0094) that were not in Hard-Weinberg equilibrium and all of them presented heterozygous deficit. The (F_{st}) recorded the mean value of 0.0266, which is considered low, and, therefore, it was not possible to verify the existence of genetic differentiation between the groups. It was concluded that the markers used were informative for the study of genetic diversity. The birds of the Embrapa Meio-Norte Nucleus, although the statistical tests did not detect differences between the groups, showed genetic diversity, based on the H_e , H_o and PIC indices. Characterization is important so that genetic management actions and future research that provide opportunities for the conservation of genetic resources are carried out.

Keywords: Genetic resource. Genotyping. Semiarid.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que mais exporta carne de frango no mundo, e está em segundo no ranking de produção, perdendo apenas para os Estados Unidos (ABPA, 2021). Apesar disso, o Brasil caracteriza-se ainda pela produção de aves em sistema de quintais, ou galinhas caipiras, sendo a carne de galinha a principal fonte de proteína animal para habitantes de localidades rurais, que geralmente possuem uma pequena criação, com o objetivo de subsistência, e também de ser uma fonte de renda extra, pois a carne dessas galinhas é bastante apreciada, pelo sabor característico, o que faz com que haja a procura regional por este tipo de aves. Tais fatos elevam a importância de pesquisas relacionadas a genética dessas aves, a fim de selecionar os melhores animais, identificando cruzamentos mais vantajosos (HASSABALLAH, 2015).

Além do melhoramento, pesquisas relacionadas à conservação dos recursos genéticos são muito importantes, pois acredita-se que as aves localmente adaptadas possuem uma vasta diversidade genética, sendo bastante útil para programas de conservação. Porém, a maioria das aves localmente adaptadas não fazem parte de nenhum programa de conservação de recursos genéticos (CARVALHO et al., 2016).

Segundo o banco de dados do Sistema de Informação de Diversidade de Animais Domésticos (*Domestic Animal Diversity Information System, DAD-IS*), estão registradas informações de 16 espécies de aves, e 3.505 populações de raças. As raças de galinha correspondem a 63% do total de raças de aves (FAO, 2013).

Com o advento da biotecnologia, várias técnicas foram implementadas para estudos a nível molecular, como o aperfeiçoamento de protocolos de extração, PCR (*Polymerase chain reaction*, ou reação em cadeia de polimerase) e o uso de marcadores moleculares, o que permite acesso direto ao DNA. A identificação desses marcadores moleculares possibilitou o estudo de diversidade genética, filogenia, mapeamento genético, dentre outras finalidades (ELLEGREN, 2004).

Um marcador molecular pode ser definido como um fenótipo molecular (fragmentos do material genético), originado de um segmento específico de DNA ou de um gene expresso, ou mesmo podem ser entendidos como “pontos de referência” do DNA, capazes de diferenciar indivíduos. Esses fenótipos moleculares são herdadas geneticamente (MILACH, 1998).

O marcador SSR (*Simple Sequence Repeats*), também conhecido como microsatélite, consiste em sequências de 1 a 6 nucleotídeos repetidos em sequência, presentes no genoma,

variando o número de repetições, o que evidencia o polimorfismo entre os indivíduos de uma população. O polimorfismo encontrado nesse tipo de marcador deve-se a mutações que ocorrem no material genético, ou pelo deslizamento da enzima DNA polimerase (*slippage*) na replicação do DNA (ELLEGRÉN, 2004).

Aves criadas em granjas possuem alta produtividade, conseguindo, devido ao melhoramento genético, ambiente e alimentação, ganhar peso com mais rapidez, em relação as demais aves. Esse processo colabora para a substituição de galinhas crioulas por aves criadas em granja. Entretanto, as galinhas localmente adaptadas possuem características importantes para o melhoramento, como resistência a patógenos e a parasitas, fazendo com que sejam necessárias pesquisas de caracterização molecular destes animais para, além de conhecê-las melhor, evitar a extinção das mesmas, através de programas de conservação de recursos genéticos (FONTEQUE et. al., 2014; CARVALHO et. al., 2018).

Essa pesquisa teve como objetivo geral identificar a diversidade genética de galinhas *Gallus gallus domesticus* da sub-região Meio-Norte do Nordeste do Brasil, por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite, e como objetivos específicos selecionar e otimizar *primers* SSR para estudo genético populacional de galinhas domésticas, caracterizar a diversidade genética das galinhas domésticas encontradas nas comunidades da sub-região Meio-Norte do Brasil e enriquecer o banco de germoplasma ativo da Embrapa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da avicultura no Brasil

A maioria das pesquisas de cunho histórico afirmam que, no Brasil, a galinha foi introduzida por volta do ano 1500, trazida pelos colonizadores portugueses, na época do descobrimento, embora alguns pesquisadores defendam que isso tenha ocorrido antes, com a vinda dos corsários franceses. Na ocasião, as aves foram trazidas para fazer parte da alimentação dos colonizadores, e eram criadas soltas em quintais, o que favoreceu a ocorrência de diversos cruzamentos, que originariam as linhagens presentes nos dias atuais (COSTA, 2011; FONTEQUE, 2014).

Apesar dessas aves terem sido trazidas pelos colonizadores no século XVI, somente no século XX a avicultura recebeu a devida atenção, por conta da expansão populacional ocorrida no Brasil, entre o fim do século XIX e início do século XX. Esse aumento populacional exigiu que mais recursos alimentares fossem implementados, para suprir a demanda. No ano de 1913,

foi criada a primeira associação voltada para a criação de aves: a Sociedade Brasileira de Avicultura. O objetivo principal dessa sociedade era promover um melhor desenvolvimento da atividade no país, atentando para a qualidade (COSTA, 2011).

2.2 Características gerais das galinhas

A galinha (*Gallus gallus domesticus*) faz parte da ordem das aves galiformes, que inclui galinha, peru, frango, dentre outros. É um animal cosmopolita, e pode ser encontrado em todos os continentes do planeta. Essas aves são originadas de diferentes grupos genealógicos: americano, mediterrâneo, inglês e asiático. A origem diversificada das aves proporcionou a ocorrência de cruzamentos aleatórios de animais não aparentados, e de diferentes linhagens. O fato de haver cruzamentos diversificados influencia diretamente nas linhagens produzidas, que apresentam alta rusticidade e alta diversidade genética (LIU et al., 2006). Nas figuras abaixo, podemos observar características fenotípicas dessas aves.



Figura 1. Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Brejo (MARANHÃO); B: galinha com o fenótipo de penas frisadas (MARANHÃO). Fonte: o autor.



Figura 2. Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Chapadinha (MARANHÃO); B: galinha do grupo Canela-Preta. Fonte: o autor.



Figura 3. Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Itapecuru (MARANHÃO); B: galinha da cidade de Paulistana (PIAUI). Fonte: o autor.

Dentre outras características importantes das galinhas, são boas forrageadoras, e não há a necessidade de uma dieta ou de um local específico para a sua criação, podendo ser criadas soltas, e se adaptarem a diversos ambientes, além de conviver em grande quantidade no mesmo local. Isso facilita a reprodução dessas aves, o que faz com que a sua criação seja bastante comum em sistemas de produção familiar (KAYA e YILDIZ, 2008).

De maneira geral, as aves localmente adaptadas são criadas em locais com poucos recursos financeiros e em instalações simples, sem o manejo adequado, com o objetivo de complementar a renda mensal. Com isso, os programas de conservação necessitam atuar em conjunto com os pequenos criadores, com a finalidade de informar os mesmos sobre a importância de um manejo adequado.

2.3 Recursos genéticos animais: preocupação mundial

A preocupação mundial com a conservação de recursos genéticos animais é crescente nos últimos anos, por conta da substituição de raças localmente adaptadas por linhagens comerciais, que afetam diretamente os animais localmente adaptados. Esse processo causa erosão genética, que é a redução da diversidade genética entre populações (DURUZ et al., 2017). Para que esse problema fosse reduzido, a FAO criou um plano de ação mundial para o manejo adequado dos recursos genéticos animais (FAO, 2007).

O plano publicado pela FAO em 2007 foi destinado aos animais domésticos de interesse zootécnico, para a conservação dos recursos genéticos dos mesmos. Dentre os objetivos desse plano de ação, podemos destacar o uso sustentável dos recursos genéticos animais, a repartição justa e equitativa dos benefícios gerados pela utilização dos recursos, assegurar a conservação dos recursos genéticos para as gerações presentes e futuras e conscientizar a sociedade da importância da conservação (FAO, 2007). Entretanto, a FAO publicou em 2015 uma segunda avaliação dos recursos genéticos animais (*The Second Global Assessment of Animal Genetic Resources*), e destacou uma discrepância entre países em relação as medidas de conservação. As principais dificuldades relatadas para a melhoria da conservação foram: a falta de recursos financeiros, e de pessoas qualificadas, com capacidade técnica (FAO, 2015).

A conservação dos recursos genéticos animais é de suma importância para a manutenção das espécies localmente adaptadas, pois é ideal que haja diversidade genética nessas populações. Atualmente, pesquisas com viés de conservação dos animais de interesse zootécnico, como caprinos, ovinos e galináceos vem ganhando espaço, pois, nos últimos anos, os pesquisadores estão mais preocupados em relação a conservação, devido a importância futura que esses animais podem oferecer, em relação a diversidade genética, que é a base da continuidade das espécies (CARVALHO et al., 2016).

Com isso, a conservação dos recursos genéticos animais pode ser feita a partir de estudos de caracterização molecular. A caracterização é um processo fundamental para se desenvolver projetos de conservação, pois só é possível conservar o que é conhecido, ou caracterizado. Em outras palavras, esses estudos fornecem um panorama da diversidade genética da população que está sendo estudada. É importante que essas pesquisas continuem, afim de contemplar a maior quantidade de populações domésticas possíveis (CARVALHO et al., 2016).

Em se tratando das galinhas localmente adaptadas da sub-região Meio-Norte (Piauí e Maranhão), a conservação da diversidade genética é essencial para a manutenção dos animais

e também para a realização do melhoramento de maneira adequada, pois é difícil afirmar quais as melhores características que serão úteis futuramente, em relação a adaptação (CARVALHO, et al., 2020).

Além disso, também existe a preocupação com a conservação das variedades de galinhas domésticas. De acordo com dados da FAO (2013), várias raças de galinhas ainda não foram identificadas e registradas. Somente 25% das raças identificadas não sofrem nenhum risco de extinção, o que é preocupante, frente a grande quantidade de raças de galinhas existentes. Essa situação reforça mais ainda a necessidade de pesquisas de caracterização.

2.4 Perspectivas futuras

Nos últimos anos, a procura por produtos oriundos de sistemas de produção familiar vem crescendo, devido a preocupação com a saúde e com a qualidade na alimentação. Essa exigência faz com que esse mercado seja bastante promissor para os próximos anos, e que a procura pela carne e ovos de galinhas localmente adaptadas de pequenos sistemas de produção seja aumentada e mais valorizada, pois o perfil de consumidor desse mercado muitas vezes aceita pagar um preço maior em relação a carne industrial, em troca de uma maior qualidade (ANDERSON, 2011).

A perspectiva futura para a avicultura tradicional é bastante promissora, pois a maneira como essas aves são criadas nas pequenas comunidades acaba atraindo os consumidores. As aves criadas soltas, livres e forrageando, num sistema orgânico, faz com que o sabor da carne dessas aves seja característico e bastante apreciado no nosso país, levando a um maior valor agregado do produto (CARVALHO et. al., 2016; MORAIS et al., 2015).

2.5 Marcadores utilizados na análise de diversidade genética

Um marcador é todo qualquer fenótipo ou característica, que seja possível realizar a sua análise, com o objetivo de diferenciar indivíduos de uma população. Os primeiros marcadores utilizados com esse objetivo foram os morfológicos, baseados em caracteres visuais (AL-SAMARAI e AL-KAZAZ, 2015). Tais fenótipos são levados em consideração nos programas de melhoramento, para melhor direcionar os cruzamentos (CARVALHO et al., 2020).

Com o passar do tempo, diversos outros marcadores foram sendo utilizados, muito por conta do avanço tecnológico. Marcadores baseados em isoenzimas foram bastante utilizados em estudos de diferenciação genética, a partir da década de 70. A análise e caracterização genética desse tipo de marcador é feita no processo de eletroforese, pela migração das

moléculas no gel de agarose (YANG et. al., 2013).

Após a utilização de isoenzimas, os marcadores moleculares baseados na molécula de DNA são os mais utilizados desde a década de 80, para estudos de caracterização genética de populações animais. Os marcadores, como o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), o AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), o SSR (Simple Sequence Repeats) e os SNPs (Single nucleotide Polymorphism) possuem a vantagem de fazer a análise diretamente no DNA, superando a limitação dos marcadores morfológicos, por exemplo (YANG et. al., 2013).

2.6 Marcadores moleculares: Microssatélites

Os marcadores moleculares do tipo Microssatélites (ou SSR) são pequenas regiões de DNA repetidas em *tandem* (sequência), que possuem repetições (motivos) de 1 a 6 nucleotídeos, podendo ser mono, di, tri, tetra, penta ou hexanucleotídeos (ELLEGREN, 2004). Podem ser classificados baseado na maneira de como a repetição se comporta: se a sequência de repetição não sofre nenhuma interrupção, o marcador é classificado como perfeito. Quando a repetição sofre uma interrupção, com a existência de duas bases no meio, é classificado como imperfeito. Por fim, o marcador pode ser composto, quando ocorre duas sequências de repetição com motivos diferentes (OLIVEIRA et al., 2006).

O número de repetições presentes indicam o tamanho do alelo. Quando um *locus* possui o mesmo número de repetições nos cromossomos homólogos, ele é considerado homocigoto, e, conseqüentemente, para que um *locus* seja considerado heterocigoto, o número de repetições em sequência deve ser diferente, nos cromossomos homólogos. Em geral, uma população possui diferentes número de repetições no mesmo *locus*, e portanto, um diversificado número de alelos, o que permite os microssatélites diferenciarem indivíduos, de acordo com os diferentes alelos (OLIVEIRA et al., 2006).

A alta taxa de mutação dos microssatélites faz com que os mesmos sejam altamente polimórficos (GAO et al., 2013). Marcadores mais longos, com maior número de repetições do motivo, possuem maiores taxas de mutação (PETIT et al., 2005). Esses marcadores são bastante utilizados nos estudos de diversidade e caracterização genética, pois são baseados nas próprias sequências de DNA (OLIVEIRA et al., 2006). Possuem como uma vantagem a herança codominante, o que permite que sejam identificados os indivíduos heterocigotos (ZUCCHI, 2003). Como desvantagem, podemos destacar a necessidade de equipamentos e de técnicos

especializados, bem como a necessidade de haver *primers* específicos, de acordo com a espécie trabalhada (ZALAPA et. al., 2012).

O conhecimento desses marcadores microssatélites auxilia no estudo de variabilidade genética das galinhas, viabilizando a criação de programas de melhoramento das aves por meio de seleção (CARVALHO et. al., 2018). As informações coletadas a partir da utilização dos microssatélites ajudam os programas de conservação e de seleção, pelo fato desses marcadores serem bastante utilizado em estudos de caracterização genética. Com isso, os programas podem tomar melhores decisões, seja para selecionar animais para cruzamentos, seja para a conservação de recursos genéticos (CLEMENTINO et al., 2010).

Os microssatélites apresentam basicamente três modelos mutacionais na formação dos alelos: o modelo IAM (Infinite Alleles Model, ou modelo de infinitos alelos); o SMM (Stepwise Mutation Model, ou modelo de passos de mutação); e o TPM (Two Phase Model, ou modelo de duas fases). O IAM consiste na criação aleatória de um novo alelo que não estava presente na população, a partir de uma determinada mutação. Já o SMM parte do princípio de que as mutações ocorrem de alelos já preexistentes, por meio da inserção ou deleção de apenas uma repetição. Por fim, o modelo TPM parte do pressuposto de que as mutações podem também ocorrer por mais de uma unidade de repetição, diferente do modelo SMM (OLIVEIRA et al., 2006; HARTL e CLARK, 2010).

2.7 Parâmetros de diversidade genética: Ho, He e PIC

A diversidade genética de uma população pode ser medida a partir de alguns parâmetros, como por exemplo a Heterozigosidade Observada (H_o), em conjunto com a Heterozigosidade Esperada (H_e). A H_o pode ser calculada a partir da soma dos valores de todos os *locus*, e dividindo pelo número total de *locus* analisados. O ideal é que H_o seja maior do que H_e , indicando assim que o número de heterozigotos na população é alto. Baixos níveis de heterozigosidade podem ser causados por alguns fatores, como por exemplo cruzamentos entre animais aparentados. Somente populações em equilíbrio de Hardy-Weinberg possuem H_o e H_e equivalentes (MENEZES et. al., 2006).

O PIC (Polymorphic Information Content) é um parâmetro descrito por Botstein (1980), que permite mensurar o grau de informação polimórfica que um marcador molecular pode oferecer. Entre outras palavras, ele é um indicador de qualidade do marcador em estudos de diversidade genética. Segundo Botstein et al. (1980), um marcador é muito informativo se tiver valores de PIC acima de 0,5. Valores entre 0,25 e 0,5 indicam que o marcador é mediantemente

informativo. Abaixo de 0,25 o marcador é considerado pouco informativo.

2.8 Diferenciação genética entre subpopulações: Fst

As estatísticas de Wright (1951) são utilizadas para mensurar diferenças entre indivíduos (FIS), subpopulações (FST) e população total (FIT), e busca mostrar se há endogamia em um desses três níveis (MEIRMANS e HEDRICK, 2011). O FIS é utilizado para mensurar o grau de endogamia dentro de uma população, pois consegue medir a chance de dois alelos, de um mesmo loco serem iguais por descendência. Os valores de Fst, utilizados para apontar endogamia por meio da diferença genética das subpopulações, variam de 0 a 1. Níveis próximos a 1 mostram que existe diferenciação genética entre as subpopulações, indicando que ocorreu fixação alélica. Caso o valor de Fst seja negativo ou abaixo de 5% (0,05), indica que não há essa diferenciação (WRIGHT, 1951; HARTL e CLARK, 2010).

2.9 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A lei de Hardy-Weinberg (HWE) consiste na definição de que uma população qualquer se encontra em equilíbrio quando esta é isolada das demais, e possui indivíduos que se reproduzem e contribuem para a formação das próximas gerações, sem haver qualquer tipo de interferência de outras populações nos acasalamentos (sem a interferência do homem também na escolha dos acasalamentos). Porém, considerando que essa população se encontra no meio, sem nenhuma barreira, seja ela física ou biológica, essa troca de informações genéticas por meio dos cruzamentos é praticamente inevitável, promovendo assim o fluxo gênico (MEIRMANS e HEDRICK, 2011).

As frequências dos alelos são utilizadas para mensurar se a população está ou não em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma população ideal, considerada como parâmetro de comparação, deve possuir frequências alélicas constantes, e isso só é possível se o tamanho da população for grande, se os cruzamentos não forem direcionados (aleatórios), e se não houverem fatores externos, como seleção e migração (ALLENDORF e LUIKART, 2006)

2.10 Efeito gargalo de garrafa

O efeito *bottleneck* (gargalo de garrafa) é uma das causas do processo de deriva genética (alteração ao acaso de frequências alélicas). Esse efeito é assim chamado por conta da diminuição do número de indivíduos de uma população e, conseqüentemente, a diminuição da frequência de alguns alelos, ou até mesmo, ocasionar a perda (HEDRICK, 2005).

Para que uma população esteja em equilíbrio de mutação-deriva, ou seja, sem deriva

genética causada por gargalo, ela necessita manter o tamanho populacional durante os anos. Desse modo, levando em consideração a manutenção do número de indivíduos, a chance de um *locus* encontrar-se em excesso ou em déficit de heterozigotos é a igual (CORNUET e LUIKART, 1996).

REFERÊNCIAS

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual 2021**, 2021.

ALLENDORF, F.W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Singapore: Blackwell Publishing, 2006.

AL-SAMARAI, F. R.; AL-KAZAZ, A. Applications of Molecular Markers in Animal Breeding: A review. **American Journal of Applied Scientific Research**, v. 1, n. 1, p.1-5. 2015.

ANDERSON, K E. Comparação da composição de ácidos graxos, colesterol e vitamina A e E em ovos de galinhas alojadas em gaiolas e instalações de produção convencionais. **Poultry Science**, v. 90, p. 1600-1608, 2011.

BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

CARVALHO, D. A. et al. Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas crioulas Canela-Preta. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51, n. 11, p. 1899-1906, 2016.

CARVALHO, D. A. et al. Galinhas caipiras nativas: seleção de indivíduos geneticamente superiores. *In*: CARVALHO, D. A.; SARMENTO, J. L. R.; ALMEIDA, M. J. O. **Conservação, uso e melhoramento de galinhas caipiras**. – Ponta Grossa, PR: Atena, p. 18-26., 2020.

CARVALHO, D. A. et al. Genetic Variability of twelve microsatellite loci in native canela-preta chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 04, 2018.

CLEMENTINO, C. S. et al. Microsatellite DNA Loci for Population Studies in Brazilian Chicken Ecotypes. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, p. 1100-1106, 2010.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

COSTA, S. **A saga da avicultura brasileira: como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango**. São Paulo: UBABEF, 2011.

DURUZ, S. et al. A WebGIS platform for the monitoring of Farm Animal Genetic Resources (GENMON). **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, 2017.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature**. v. 5, n.6, p. 438-445, 2004.

FAO. **Status and trends of Animal Genetics Resources. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture**. Four tenth Regular Session, 2013.

FAO. **The Global Plan of Action for Animal Genetic Resources and the Interlaken Declaration**. Suíça, 2007.

FAO. **The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**; Scherf, B.D., Pilling, D., Eds.; FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments: Rome, 2015.

FONTEQUE, G.V. et al. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg caipira) chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 98-102, 2014.

GAO, C. et al. Revisiting an important component of plants genomes: microsatellites. **Functional Plant Biology**, v. 40, p. 645-661, 2013.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2010.

HASSABALLAH, K. et al. Morpho-biometrical characterization of local chicken (*Gallus gallus*) in three agro-ecological zones of Chad. **Livestock Research for Rural Development**, v. 27, n. 3, 2015.

HEDRICK, P. W. A standardized genetic differentiation measure. **Evolution**, v. 59, p. 1633-1638, 2005.

KAYA, M.; YILDIZ, M.A. Genetic diversity among Turkish native chickens, Denizli and Gerze, estimated by microsatellite markers. **Biochem Genetics**, v. 46, p. 480-491. 2008.

LIU Y. P. et al. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian jungles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.38, n.1, p.12–19, 2006.

MEIRMANS, P. G.; HEDRICK, P. W. Assessing population structure: F-ST and related measures. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 5–18, 2011.

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

MILACH, S.C.K. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: Milach, S.C.K. (Ed.). **Marcadores moleculares em plantas**, 1998.

MORAIS, J. et al. Curva de crescimento de diferentes linhagens de frango de corte caipira. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1872-1878, 2015.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294- 307, 2006.

PETIT, R. J. et al. Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 885-890, 2005.

WRIGHT, S. The Genetics Structure of Populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

YANG, W. et al. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 4, 2013.

ZALAPA, J. E. et al. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 2, p. 193-208, 2012.

ZUCCHI, M. I. et al. Estrutura genética e fluxo gênico em *Eugenia dysenterica* DC no Cerrado brasileiro utilizando marcadores SSR. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, 2003.

CAPÍTULO 1:**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE AVES LOCALMENTE ADAPTADAS DA
SUB-REGIÃO MEIO-NORTE DO BRASIL**

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE AVES LOCALMENTE ADAPTADAS DA SUB-REGIÃO MEIO-NORTE DO BRASIL

Alberto Alexandre de Sousa Borges¹ Adriana Mello de Araújo²

RESUMO:

Em galinhas de pequenas propriedades, espera-se que o nível de diversidade genética seja alto, devido aos diversos cruzamentos realizados desde a época da introdução das mesmas aqui no Brasil. Com isso, a pesquisa tem como objetivo identificar se há diversidade genética de galinhas *Gallus gallus domesticus* da sub-região Meio-Norte do Brasil, através de marcadores moleculares do tipo microsatélite. Foram coletadas amostras de sangue de 37 aves, em *FTA (Flinders Technology Associates) cards*. As aves eram oriundas de duas microrregiões do estado do Maranhão (Itapecuru-Mirim, 11 aves e Chapadinha, 13 aves) e uma microrregião do Piauí (Paulistana, 6 aves), e aves Canela-Preta (7 aves) de Teresina. O DNA extraído a partir dos *FTA cards* foi amplificado em PCR e genotipado em sequenciador. Os 15 primers ISAG/FAO selecionados para o estudo amplificaram com sucesso, mostrando 84 alelos distintos na genotipagem das 37 aves. O valor médio de heterozigosidade esperada (H_e) foi de 0,726, e o valor médio de heterozigosidade observada em todos os indivíduos foi de 0,681. A riqueza alélica (AR) média em todo o plantel foi de 6,281, seguido de média de 0,673 para o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). O grupo 1 (Brejo/Itapecuru) obteve o maior número de marcadores (LEI0216, MCW0037, LEI0192 e LEI0094) que apresentaram desequilíbrio de Hard-Weinberg e todos eles apresentaram déficit de heterozigotos. O (F_{st}) apresentou média de 0,0266, o que é considerado baixo, e, portanto, não foi possível verificar a existência de diferenciação genética entre os grupos. Conclui-se que os marcadores utilizados foram informativos para o estudo de diversidade genética. As aves do Núcleo da Embrapa Meio-Norte, apesar dos testes estatísticos não terem detectado diferença entre os grupos, demonstraram ter diversidade genética, com base nos índices de H_e , H_o e PIC. Por se tratar de uma caracterização genética, essa pesquisa é de extrema importância, para que ações de manejo genético sejam realizadas, além de futuras pesquisas que oportunizem a conservação dos recursos genéticos.

Palavras-chave: Recurso genético. Genotipagem. Semiárido.

ABSTRACT:

In chickens from small properties, it is expected that the level of genetic diversity is high, due to the various crosses made since the time of their introduction here in Brazil. With this, the research aims to identify if there is genetic diversity of *Gallus gallus domesticus* chickens from the Mid-Northern subregion of Brazil, through microsatellite molecular markers. Blood samples were collected from 37 birds in *FTA cards*. The birds came from two microregions of the state of Maranhão (Itapecuru-Mirim, 11 birds and Chapadinha, 13 birds) and a microregion of Piauí (Paulistana, 6 birds), and Canela-Preta birds (7 birds) from Teresina. DNA extracted from *FTA cards* was amplified in PCR and genotyped in sequencer. The 15 primers ISAG/FAO choose in the study successfully amplified, showing 84 different alleles in the genotyping of 37 birds. The mean value of expected heterozygosity (H_e) was 0.726, and the mean value of heterozygosity observed in all individuals was 0.681. The average allelic richness (AR) in the the whole flock was 6.281, followed by an average of 0.673 for polymorphic information content (PIC). Group 1 (Brejo/Itapecuru) obtained the highest number of markers (LEI0216, MCW0037, LEI0192 and LEI0094) that were not in Hard-Weinberg equilibrium and all of them presented heterozygous deficit. The (F_{st}) recorded the mean value of 0.0266, which is considered low, and, therefore, it was not possible to verify the existence of genetic differentiation between the groups. It was concluded that the markers used were informative for the study of genetic diversity. The birds of the Embrapa Meio-Norte Nucleus, although the statistical tests did not detect differences between the groups, showed genetic diversity, based on the H_e , H_o and PIC indices. Characterization is important so that genetic management actions and future research that provide opportunities for the conservation of genetic resources are carried out.

Keywords: Genetic resource. Genotyping. Semiarid.

INTRODUÇÃO

As galinhas domésticas foram introduzidas no Brasil no período colonial, trazidas pelos europeus, e criadas em quintais. Estas populações passaram por longo período de adaptação às condições locais, submetidas ao processo de seleção natural e miscigenação, formando grupos de galinhas caipiras, que se pode observar nos dias de hoje (FONTEQUE, et al., 2014). Acredita-se que essas aves possuem elevado grau de diversidade genética, porém, estudos são necessários para caracterizar geneticamente esses animais conhecidos por galinhas caipiras, dispostos em várias comunidades rurais da região Nordeste.

Medidas obtidas a partir do estudo de marcadores moleculares, como a heterozigosidade observada e esperada (H_o e H_e) e PIC (Conteúdo de informação Polimórfica) são importantes para os estudos de diversidade genética, pois esses parâmetros conseguem mensurar o grau de diversidade genética de um grupo de indivíduos, podendo assim ser usados em programas de conservação de recursos genéticos (MENEZES et al., 2006). Além disso, um outro parâmetro importante para conhecer a estrutura da população é o F_{ST} , utilizado para verificar a diferenciação genética entre subpopulações. Níveis de F_{ST} próximos a zero indicam frequências alélicas similares nas subpopulações e, portanto, pouca diferenciação genética. Quando o valor é próximo a 1, indica que existe diferenciação entre as subpopulações (WRIGHT, 1951; HARTL e CLARK, 2010).

Pesquisas buscando conhecer a diversidade genética de galinhas domésticas são importantes, para o monitoramento deste material genético, pois apesar da grande dispersão das galinhas criadas em quintais no Nordeste, as chamadas galinhas caipiras são pouco caracterizadas, o que dificulta o acesso à informação de diversidade, e justifica cada vez mais a realização de pesquisas para essa finalidade. Além de conhecer, também há a preocupação de conservar os grupos existentes que possuem grande potencial de recursos genéticos (FAO, 2013).

O marcador molecular do tipo microsatélite caracteriza-se por ser uma região do DNA com repetições em sequências de 1 a 6 nucleotídeos. São bastante utilizados em estudos de diversidade genética por serem marcadores altamente informativos e polimórficos e, devido a sua natureza codominante, são capazes de identificar indivíduos homozigotos e heterozigotos em um conjunto de dados (ZUCCHI, 2003; ELLEGREN, 2004).

Essa pesquisa tem como objetivo identificar a diversidade genética de galinhas *Gallus gallus domesticus* da sub-região Meio-Norte do Nordeste do Brasil, por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélite.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização dos animais pesquisados

Do Núcleo de Conservação de Recursos Genéticos da sub-região Meio-Norte do Brasil, da Embrapa, foram selecionadas 37 amostras de aves, originadas de duas microrregiões do estado do Maranhão (Itapecuru-Mirim, 11 aves; e Chapadinha, 13 aves) e uma microrregião do Piauí (Paulistana, 6 aves). Além destes indivíduos, amostras de sete aves caracterizadas como Canela-Preta (CARVALHO et al., 2017), oriundas de Teresina-PI, foram adicionadas ao estudo de diversidade local adaptado a sub-região Meio-Norte em galinhas adaptadas. A pesquisa possui registro na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa, número 002/2016.

As aves do Núcleo de Conservação de Recursos Genéticos do Meio-Norte da Embrapa foram previamente descritas e separadas quanto a origem geográfica, através de marcadores ISSR (SILVA JÚNIOR, 2020). Os marcadores ISSR utilizados (UBC313, UBC822, UBC841, UBC845, UBC873, UBC884, UBC887 e UBC892) foram desenvolvidos pela University of British Columbia, Vancouver, Canadá. Com isso, as aves foram assim agrupadas: 1- Chapadinha/MA; 2- Itapecuru-Mirim/MA e Brejo/MA (conglomerado devido ao comércio de feiras intenso na região); 3- Canela-preta/PI; 4- Paulistana/PI.

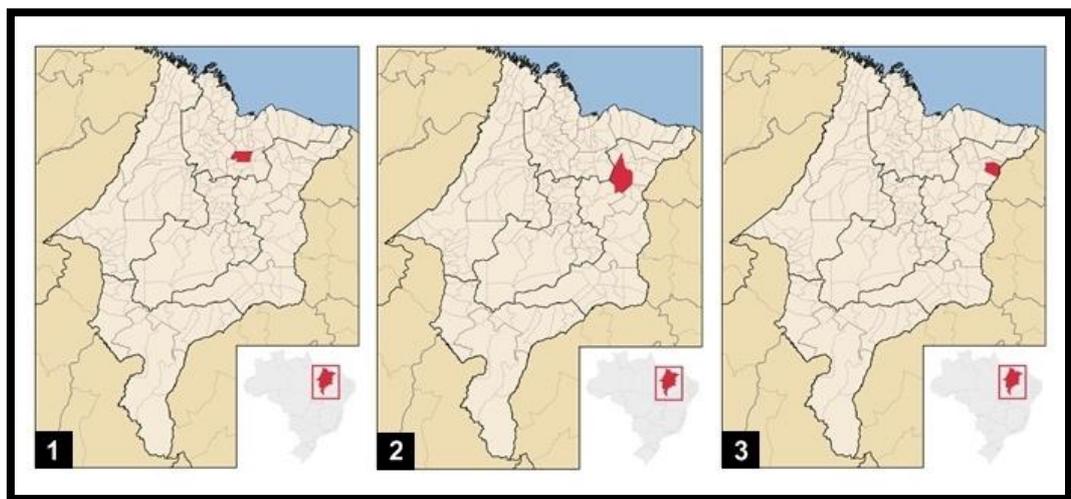


Figura 1 - Localidades de origem das aves do Núcleo de conservação da Embrapa-

Meio-Norte (Estado do Maranhão). 1. Itapecuru-Mirim; 2. Chapadinha; 3. Brejo. **Fonte:** Wikipédia commons (editado).

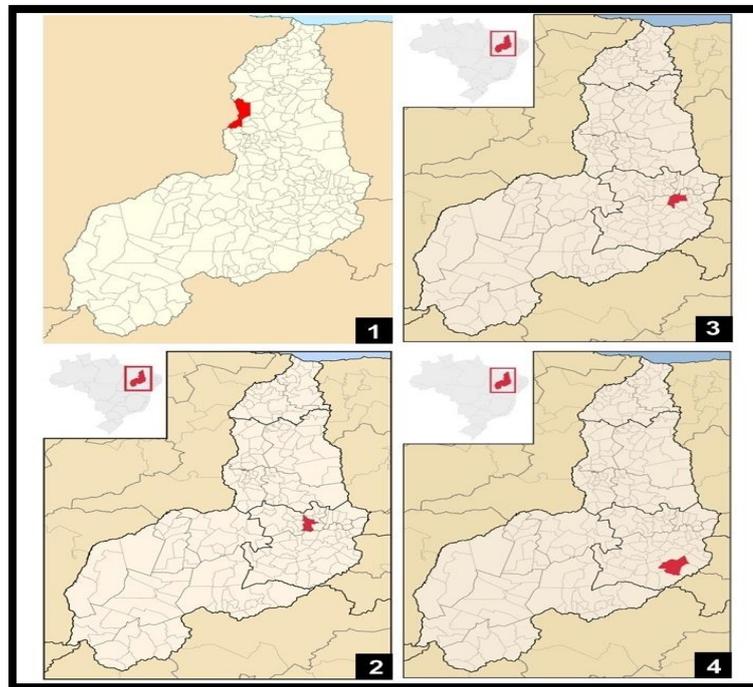


Figura 2 - Localidades de origem das aves do Núcleo de conservação da Embrapa-Meio-Norte (Estado do Piauí). 1. Teresina; 2. Picos; 3. Jaicós; 4. Paulistana. **Fonte:** Wikipédia commons (editado).

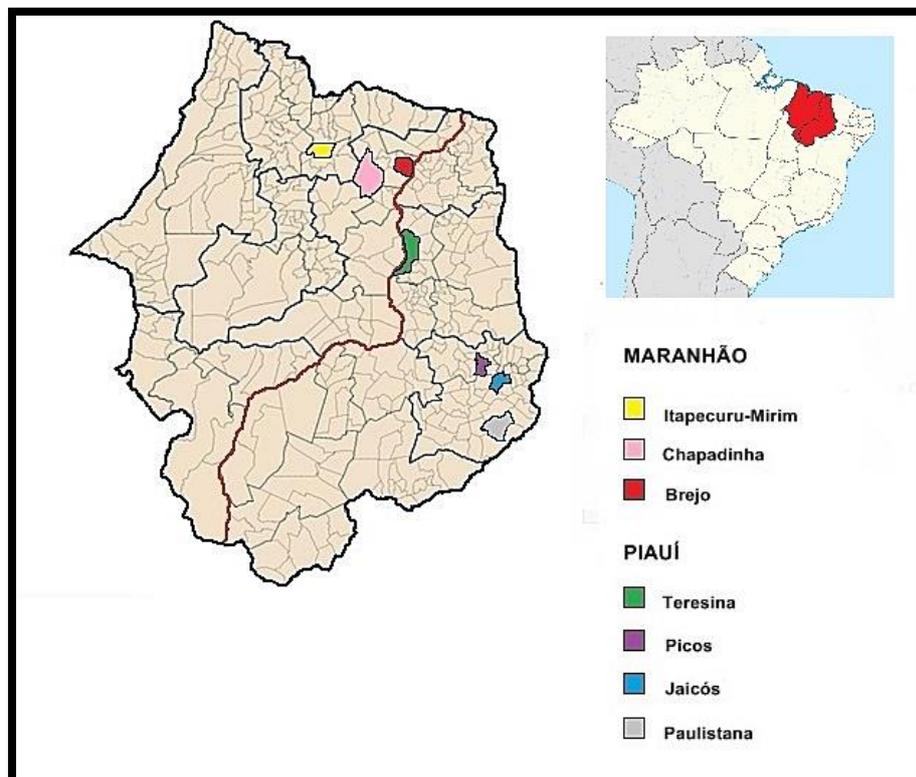


Figura 3 - Mapas dos estados do Maranhão e do Piauí, com as respectivas localidades destacadas. **Fonte:** Wikipédia commons (editado).

As aves do grupo de Chapadinha possuem coloração predominantemente amarelada, algumas possuem coloração preta, olhos amarelados, pés e metatarsos amarelados, além de peso médio de 2,00 kg e tamanho corporal médio de 43,15 cm, em aves de aproximadamente 18 meses de idade. As aves do grupo de Itapecuru-Mirim são de plumagem amarelada, algumas com plumagem acinzentada, olhos e bicos amarelados, pés e metatarsos amarelados, peso médio de 1,917 kg, e tamanho corporal 42,04 cm. As galinhas caracterizadas como Canela-Preta possuem plumagem preta, olhos escurecidos, bico preto com detalhes amarelados, pés e metatarsos pretos, média de peso de 2,2 kg, e tamanho médio 43,57 cm. Por fim, as aves oriundas de Paulistana possuem uma coloração basicamente acinzentada e preta, com olhos amarelados e castanhos, bicos amarelados, pés e metatarsos amarelados, uma média de peso de 1,969 kg e tamanho médio de 41,16 cm. Abaixo, podemos verificar nas imagens algumas fotografias das aves, e seus respectivos grupos.



Figura 4 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha da localidade Brejo (MARANHÃO); B: galinha da localidade de Itapecuru-Mirim (MARANHÃO). **Fonte:** o autor.



Figura 5 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A:

galinha da localidade Chapadinha (MARANHÃO); B: galinha com o fenótipo de penas frisadas, de Chapadinha (MARANHÃO). **Fonte:** o autor.



Figura 6 - Fotografia das aves do núcleo de conservação da Embrapa Meio-Norte. A: galinha caracterizada como Canela-preta; B: galinha oriunda de Paulistana (PIAUÍ). **Fonte:** o autor.

Para a caracterização da diversidade genética, foram utilizados 15 marcadores moleculares do tipo microssatélites (SSR, Tabela 1) recomendados pelo ISAG/FAO (FAO, 2011). A pesquisa contou com a colaboração da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia-SC) no fornecimento dos marcadores moleculares e nas análises de laboratório.

Coleta e armazenagem do material

O material utilizado para a extração de DNA foi o sangue, retirado da veia branquial (localizada abaixo da asa) de cada ave. O sangue foi coletado em *FTA cards* (Whatman® *FTA*®), que conseguem preservar o material genético. Foi coletado 1ml de sangue de cada ave, e posteriormente gotejado no *FTA card* (Fig. 7). Os cartões foram conservados em freezer a -20°C até a etapa de extração de DNA. A coleta em *FTA card* pode ser observada na figura abaixo.



Figura 7. *FTA card*, contendo gotas de sangue das aves. **Fonte:** o autor.

Extração do DNA

As análises foram realizadas no laboratório de Genética da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC. O protocolo de extração de DNA utilizado para o sangue coletado em *FTA cards* foi o *Purelink genomic mini kit*, da marca *Invitrogen*. Inicialmente, de cada *FTA card* foram cortados 3 cubos de 1mm de lado e adicionados em um tubo eppendorf de 1,5 mL. Para degradar proteínas indesejadas, foi pipetado 180 uL de *Digestion Buffer* no tubo contendo o tecido, e 20 uL de proteinase K (fornecido com o kit) para cada amostra, e agitado em vórtex por 20 segundos. Os tubos contendo as amostras foram incubados a 55°C com agitação, por uma hora, e depois centrifugados por 3 minutos, para a obtenção do *pellet* de DNA.

Após essa etapa, o líquido foi transferido para outro tubo eppendorf, e foi adicionado 20uL de RNase A, para cada amostra, incubado a temperatura ambiente por 2 minutos, e ao fim do tempo, foi adicionado 200 uL *PureLink® Genomic Lysis / Binding Buffer* e 200 uL de etanol 96-100 %. A solução foi agitada em vórtex para ficar homogênea.

Após a *lise* das células, o líquido foi adicionado em uma coluna de sílica (utilizada para reter o material genético), e centrifugado a 10000 rpm, por 1 minuto. O líquido foi descartado, e a coluna de sílica foi colocada em outro tubo. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes, e em cada uma delas, foi adicionado o *wash buffer*. A coluna vazia foi centrifugada a 23000 rpm por 4 minutos, e transferida para outro tubo, onde foi pipetado 100 uL de *Elution Buffer*. Por fim, o tubo contendo o DNA foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugado a 23000 rpm por 2 minutos.

Amplificação do DNA genômico: Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e genotipagem

A reação de PCR (*Polmerase Chain Reaction*) foi feita com os marcadores agrupados em 4 mixes diferentes: Mix 1 (ADL0268, LEI0094, MCW0216, MCW0037 e LEI0192, temperatura de anelamento 58°C); Mix 2 (MCW0111, MCW0034 e MCW0069, temperatura de anelamento 60°C); Mix 3 (MCW0330, MCW0098, e MCW0078, temperatura de anelamento 60°C); e Mix 4 (MCW0020, MCW0103, MCW0165 e MCW0123, temperatura de anelamento 60°C). Cada mix foi preparado utilizando-se 1µl de DNA das amostras, 4,44 µl de água livre de DNAsas, 1,11 µl de tampão, 1,11 µl de MasterAmp, 0,22 de cada um dos *primers*, 0,555 de dNTP, 0,5 de MgCl₂, e 0,185 de Taq polimerase.

As amplificações do DNA foram realizadas no termociclador com gradiente Veriti 96-well Thermalcycler, Applied Biosystems. A fase inicial de desnaturação foi de 94°C por 1,5 min, seguida de 45 ciclos a 94°C por 40 segundos, com temperatura de anelamento de 36°C a 1 min

e 72°C por 2 min. O material foi submetido a uma fase de extensão final a 72°C por 5 min. A genotipagem das amostras foi feita em sequenciador ABI3130xl (Applied Biosystems).

Análises dos dados

Para verificar a presença de alelos nulos, foi utilizado o programa Micro-checker (OOUSTERHOUT et al., 2004). A frequência alélica dos marcadores e o número de alelos, heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foram estimados utilizando-se o programa Cervus v. 3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007). A riqueza alélica foi analisada utilizando-se o software HP-Rare 1.1 (KALINOWSKI, 2005). Para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a partir do teste de probabilidade, do excesso e déficit de heterozigotos, foi utilizado o programa online GENEPOP v.4.0.10 (ROUSSET, 2008).

Para verificar a presença de gargalos populacionais nos grupos de aves, foi utilizado o software Bottleneck 1.2. (PIRY et al., 1999). Os modelos de mutação considerados na pesquisa foram: IAM (Infinite allele model), TPM (Two-phased model) e SMM (Stepwise Mutation Model), que são modelos de mutação adequados para estudos com microssatélites. O teste de Wilcoxon foi utilizado para verificar a possibilidade de ocorrência desses gargalos.

As estatísticas F de Wright foram obtidas a partir do software SPAGeDi 1.1 (HARDY e VEKEMANS, 2002), para verificar a presença de endogamia e informações sobre a diferenciação genética entre os grupos (F_{st}).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 15 primers utilizados na pesquisa, todos demonstraram ampliações nos resultados. Isso indica que os marcadores microssatélites utilizados foram eficientes para a genotipagem dos indivíduos. Um total de 84 alelos diferentes foram encontrados nos 37 indivíduos estudados. O número de alelos encontrados é bem inferior ao encontrado por Carvalho et. al. (2018), que identificou 408 alelos em galinhas Canela-Preta, em um total de 118 indivíduos, número superior aos 37 da presente na pesquisa.

Okumu et. al. (2017) encontrou 282 alelos em uma população de 150 galinhas indígenas do Quênia, número superior ao encontrado no presente trabalho. Porém, fazendo uma relação entre o número de alelos e o número das amostras, foi observado um maior número de alelos

na amostra da sub-região Meio-Norte do Brasil, proporcionalmente falando ($84/37 = 2,02$; $282/150 = 1,88$).

O número médio de alelos por *locus* foi de 6,333 para todo o plantel (Tabela 2). Em relação aos quatro grupos da origem geográfica, as médias obtidas foram menores nos grupos 3 e 4, das localidades do Piauí (Tabela 3). Os loci MCW0123, MCW0069, MCW0334 e MCW0330 obtiveram os maiores números de alelos, com 9 alelos. O marcador que demonstrou menor número de alelos foi o MCW0037, com 3 alelos (Tabela 2).

O número de alelos por *locus* variaram, portanto, de 3 a 9, valor inferior comparado aos demais trabalhos com galinhas, para medida de diversidade. Fonteque et al. (2014) encontrou em sua pesquisa número que variou entre 2 a 28 alelos por loco, em uma amostra de 100 aves. Kumar et al. (2015) encontrou um valor médio de 19 alelos por *locus*, em sua pesquisa com aves selvagens e galinhas domésticas da Índia. Nxumalo et al. (2020), em sua pesquisa com ecótipos de galinhas nativas da África do Sul, encontrou valores médios de alelos por loco de 8,47, variando de 4 a 13 alelos, de um total de 19 *locus* estudados em 199 amostras de sangue das aves.

A quantidade de alelos por *locus* neste estudo foi similar a observada por Mtileni et al. (2010), que encontrou valores médios para o número de alelos por *locus* entre 3,5 a 6,2 em aves indígenas da África do Sul. Essa similaridade pode ser atribuída ao fluxo gênico, onde as galinhas são criadas soltas e misturadas. Carvalho et al. (2018) obteve valores bastante superiores em relação aos trabalhos de Mtileni et al. (2010), Fonteque et al. (2014), e Kumar et al. (2015), e em relação aos indivíduos da presente pesquisa, encontrando valores médios de 31,5 alelos por *locus*, indicando que as galinhas Canela-Preta, possuem um grande número de alelos, indicando assim uma diversidade genética elevada. Nos trabalhos citados anteriormente, apenas Mtileni et al. (2010) utilizou os mesmos microssatélites da pesquisa em questão. Nos trabalhos de Kumar et al. (2015) e Carvalho et al. (2018), o único marcador em comum com a presente pesquisa foi o LEI0192. No trabalho de Fonteque et al. (2014), os marcadores utilizados também foram diferentes, sendo iguais apenas o LEI0192, e o MCW0330.

A riqueza alélica (AR) é um parâmetro que mede diversidade genética em um determinado grupo de indivíduos, com relação a quantidade de alelos diferentes, encontrados em um *locus*. A média de AR do plantel de aves foi de 6,281 (Tabela 2), sendo o marcador MCW0330 com o maior valor (8,9186) e o marcador MCW0037 com o menor valor (3,000). Os valores médios de AR para os grupos separados (Tabela 3) mostram maior AR nos grupos

originários do Maranhão (1 e 2). Nos grupos 1 e 3, o marcador MCW0330 foi o que obteve maior valor de AR (7,727 e 7,000, respectivamente). Nos grupos 2 e 4, os marcadores MCW0123 e MCW0103 foram os que obtiveram o maior valor de AR (8,615 e 7,000, respectivamente). Nos quatro grupos, o marcador com menor valor de AR foi o MCW0037 (3,000; 2,981; 3,000; e 2,000, respectivamente).

Nxumalo et al. (2020), analisando aves nativas da África do Sul obteve valores médios de riqueza alélica (AR) de 4,5, valor inferior ao observado nas aves originárias do Maranhão (1 e 2), de tanto e tanto, respectivamente. Leroy et al. (2012) descreveu valores de riqueza alélica de 4,84 para populações da Costa do Marfim, e de 2,04 em frangos comerciais, demonstrando que essas aves com fim comercial possuem menor valor de riqueza alélica em relação as aves localmente adaptadas.

A conservação visa contribuir para a redução do processo de endogamia, fazendo com que a riqueza alélica seja mantida em uma população. Valores de AR são de extrema importância para os programas de conservação de recursos genéticos, pois o ideal é que se tenha uma elevada riqueza alélica, para que os cruzamentos sejam direcionados de maneira adequada, afim de que o número de alelos permaneça alto, pois se houver um nível elevado de endogamia, o número de alelos e a variabilidade genética tendem a ser diminuídos (CABALLERO et al., 2010).

Em relação a heterozigosidade esperada, o valor médio encontrado para todas as aves foi de 0,7268 (Tabela 2). Nos grupos analisados por região de origem das aves, a média foi de 0,732 para o grupo 1, 0,718 para o grupo 3, 0,7055 para o grupo 2, e 0,667 para o grupo 3. (Tabela 3). Os marcadores MCW0103 e MCW0330 obtiveram os maiores valores de He (0,868 e 0,803, respectivamente). Os menores valores de He (Tabela 3) foram obtidos pelos marcadores MCW0098, MCW0037, MCW0069 e MCW0078, para os 4 grupos (0,615; 0,563; 0,495 e 0,318 respectivamente). Já o valor médio de heterozigosidade observada encontrado na pesquisa foi 0,6811, sendo o menor valor obtido pelo marcador LEI0084 (0,378) e valor máximo de 0,973 para o marcador MCW0123.

Os grupos 1 e 4 tiveram os menores valores de Ho (0,6338 e 0,667 respectivamente), enquanto os maiores valores de Ho foram dos grupos 2 e 3 (0,669 e 0,790 respectivamente). Apenas o grupo 3 (galinhas Canela-Preta) teve valor médio de Ho superior ao valor de He, indicando que galinhas desse grupo possuem uma grande diversidade genética, e corroborando com a pesquisa de Carvalho et al. (2018), que demonstrou uma grande quantidade de alelos, e

consequentemente, uma maior quantidade de heterozigotos. Dentre o grupo 3, quatro marcadores registraram H_o igual a 1,000: MCW0123, ADL0268, MCW0078 e MCW0020, e 9 dos 15 marcadores indicaram H_o maior que H_e (Tabela 3).

As médias de H_e (0,7268) e de H_o (0,6811) nas aves localmente adaptadas do Meio-Norte brasileiro foram similares as médias registradas por Carvalho et al. (2016), que obteve valores médios de 0,887 para H_e e 0,674 para H_o . Esses altos índices de heterozigosidade podem ser justificados pelo fato de as populações serem de núcleos de conservação, onde se tem como primícias manter o máximo de variabilidade possível. Valores distintos de heterozigosidade podem ser encontrados em vários trabalhos devido aos vários tipos de galinhas espalhados pelo mundo, além de condições de laboratório, onde alguns possuem mais tecnologia do que outros, aumentando a confiabilidade dos dados, além de diferenças na localização geográfica das aves. Valores de heterozigosidade abaixo de 0,5 podem indicar a ocorrência de cruzamentos não aleatórios, que induzem a redução no número de alelos (OKUMU et al., 2017).

A média dos valores referentes ao Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) encontrada para todo o plantel foi de 0,6739 (Tabela 2), sendo que neste estudo o marcador MCW0037 apresentou o valor mínimo (0,541) e o marcador MCW0330 o valor máximo (0,832). No grupo 2, diferentemente, a maior média obtida foi a do marcador MCW0123 (0,781). O menor PIC (0,456) foi do marcador MCW0037, sendo que no grupo 4, o maior valor foi do marcador MCW0103 (0,782) e o menor valor foi registrado pelo marcador MCW0078 (0,272). Nos grupos separados, o grupo 4 foi o que teve menor valor médio de PIC (0,557), enquanto o grupo 1 registrou o maior valor (0,6276). Valores médios de 0,909 referentes ao PIC foram encontrados na pesquisa de Carvalho et al. (2018), utilizando 12 marcadores microsatélites, onde o valor do PIC variou entre 0,745 e 0,967.

Em relação a informação dos marcadores referentes ao PIC, a maioria dos marcadores foram informativos para os 4 grupos de origem geográfica, sendo que nos grupos 1 e 3, 14 dos 15 marcadores tiveram valores acima de 0,5. No grupo 2, 13 dos 15 marcadores tiveram valor acima de 0,5, e no grupo 4, 11 dos 15 foram informativos. Um marcador molecular é muito informativo, quando possui valores de referência que vão de 0,5 a 1,0, indicando que existe bastante polimorfismo. Valores entre 0,25 e 0,5 indicam que o marcador é intermediário e abaixo de 0,25 significa que o marcador é pouco informativo, indicando a baixa existência de polimorfismo (BOTSTEIN et al., 1980; COSTA e LORENZO, 2009).

O teste de diferenciação genética entre subpopulações (F_{st}) registrou o valor de 0,0266, o que é considerado baixo, e, portanto, não foi possível verificar a existência de diferenciação genética entre os grupos. Considerando os grupos de dois a dois, o F_{st} foi moderado (0,0747) apenas entre os grupos 3 (Canela-Preta) e 4 (Paulistana), demonstrando que há uma diferenciação moderada entre esses dois grupos de aves, talvez por conta de que essas aves são de localidades distantes, onde não houve troca de material genético. Valores de F_{st} abaixo de 0,05 indicam que não existe diferença genética entre subpopulações. Entre 0,05 e 0,15, a diferença é considerada moderada. Para ser considerada alta, a diferenciação deve ter valores acima de 0,25 (WRIGHT, 1951).

Berima et al. (2013) encontraram valor de F_{st} idêntico ao das galinhas da presente pesquisa ($F_{st} = 0,026$) em raças de galinhas sudanesas. Outros valores de F_{st} considerados baixos foram encontrados nos trabalhos de Touko et al. (2015) em galinhas de Camarões (0,048), no trabalho de Lyimo (2013) com cinco ecótipos de frangos da Tanzânia (0,040) e na pesquisa de Carvalho et al. (2016), com galinhas crioulas Canela-Preta (0,029), pertencentes ao estado do Piauí (Brasil).

No teste de HWE (Tabela 4), para o conglomerado Brejo/Itapecuru (grupo 1), LEI0216, MCW0037, LEI0192 e LEI0094 apresentaram resultados significativos para o desequilíbrio de Hardy-Weinberg (p -valor $< 0,05$), com déficit de heterozigotos. O marcador MCW0069 no grupo 2, MCW0165 no grupo 3, e MCW0037 no grupo 4 registraram resultados significativos (p -valor $< 0,05$), também com déficit de heterozigotos. Por fim, o teste de excesso de heterozigotos não obteve resultado significativo em nenhum *locus*.

Valores significativos no teste de probabilidade de Equilíbrio de Hardy-Weinberg indicam os *locus* que estão em desequilíbrio de HWE. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores, tais como cruzamentos dirigidos, endogamia, ancestrais comuns, seleção natural e artificial, ou até mesmo a migração (MENEZES, 2006). Como as aves vieram de pequenas propriedades, o desequilíbrio pode ter sido causado por algum processo inadequado de manejo, que pode ter ocasionado endogamia, ou até mesmo migração ou fluxo gênico de uma população externa (DÁVILA et al., 2009).

Os marcadores MCW0069 no grupo 2, MCW0165 no grupo 3, MCW0111 e MCW003 no grupo 4, obtiveram valores significativos para o teste de déficit de heterozigotos. Para o teste de excesso de heterozigotos, o único marcador que foi significativo (p -valor $< 0,05$) foi o

MCW0165, no grupo 2 (Chapadinha/MA). Nenhum dos demais conglomerados teve valores significativos para esse teste.

Wilkinson et al. (2011) pesquisou 24 raças de galinhas britânicas e apenas duas não apresentaram déficit de heterozigotos. O déficit de heterozigotos pode ser atribuído a fatores como o agrupamento de populações e o acasalamento consanguíneo. Esses fatores contribuem para o déficit de heterozigotos, pois reduzem o número de alelos em uma população, e assim fazem com que o número de indivíduos homozigotos cresça (WILKINSON et al., 2011).

Em relação a análise de detecção de gargalos populacionais, utilizando o teste de Wilcoxon, o modelo de mutação IAM mostrou valores significativos (p -valor $< 0,05$) nos grupos 1, 2 e 3, indicando a presença de gargalos. No grupo 3, o modelo de mutação TPM também obteve valor significativo. No modelo SMM, nenhum valor foi significativo, demonstrando, portanto, a ausência de gargalos populacionais. O efeito gargalo presente em três grupos, relacionado ao modelo de mutação IAM, pode ser explicado pelo fluxo gênico existente entre os grupos de aves, que porventura podem ter sofrido cruzamentos, levando em consideração que, o modelo IAM respeita um padrão de que as mutações ocorrem devido a formação de um novo alelo, que não estava presente anteriormente na população (OLIVEIRA, 2006).

A presença de gargalos populacionais indica que o tamanho efetivo da população foi alterado, devido a alguns fatores, como a ação antrópica, como a falta de manejo adequado, e consequentemente o favorecimento de acasalamentos inapropriados, por exemplo. Soltan et al. (2018), em seu trabalho com galinhas indígenas do Egito, observou a presença de gargalo populacional indicado pelo modelo IAM, sem detectar efeito gargalo para os modelos SMM e TPM. Negi et al. (2020), em sua pesquisa com francolins (aves galiformes) na Índia, não detectou resultados significativos em nenhum dos modelos de mutação, concluindo que a população não sofreu gargalos populacionais.

CONCLUSÃO

Todos os marcadores microssatélites utilizados na pesquisa indicaram valor de PIC superior a 0,5, e consequentemente, todos foram informativos para as aves do Meio-Norte do Brasil. As aves demonstraram ter diversidade genética, com maior riqueza alélica e diversidade nas populações do Maranhão.

O recurso genético conhecido por Canela-Preta, se destacou por registrar o maior valor médio de heterozigiosidade observada. Este fator pode ser devido a introgressão e mistura de raças caipiras da região Nordeste.

Baseando-se nos índices de HWE, alguns marcadores demonstraram desequilíbrio de Hardy-Weinberg, inferindo um possível efeito externo, como por exemplo, a troca de material genético entre as aves, proporcionada pelos criadores. Esse fator pode ter sido determinante para a ocorrência da endogamia, que altera as frequências alélicas nas populações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Considerando que as aves vieram de pequenas propriedades, essa caracterização é importante, para que ações de manejo genético e futuras pesquisas sejam feitas, visando a conservação dos recursos genéticos, e a diferenciação de grupos específicos com características próprias. Tais ações contribuiriam para a manutenção de alelos de interesse, e consequentemente, para a manutenção da variabilidade genética.

A pesquisa contribui para o enriquecimento do germoplasma de animais adaptados aos trópicos ativo na Embrapa. Esse fato é importante, pois serve de subsídio para futuras pesquisas, além de caracterizar animais localmente adaptados da sub-região Meio-Norte do Brasil, e incentivar a conservação desses recursos genéticos animais.

REFERÊNCIAS

- BERIMA M. A. et al. Population structure and genetic diversity of Sudanese native chickens. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 6424-6431, 2013.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- CABALLERO, A. et al. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 409-419, 2010.
- CARVALHO, D. A. et al. Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas crioulas Canela-Preta. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 51, n. 11, p. 1899-1906, 2016.
- CARVALHO, D. A. et al. Genetic Variability of twelve microsatellite loci in native canela-preta chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 04, 2018.
- CARVALHO, D.A. et al. Padrão racial fenotípico de galinhas brasileiras da raça Canela-Preta. **Archivos de Zootecnia**. v. 66, n. 254, p. 195-202, 2017.

COSTA, J.; LORENZO, M. Biology, diversity and strategies for the monitoring and control of triatomines - Chagas disease vectors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, Suppl.1, p. 46-51, 2009.

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

ELLEGREN. H. Microsatellites: simple sequence with complex evolution. **Nature**, v. 5, n. 6, p. 438-445, 2004.

FAO. **Molecular genetic characterization of animal genetic resources**. FAO Animal Production and Health Guidelines, n. 9, 2011.

FAO. **Status and trends of Animal Genetics Resources**. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Four tenth Regular Session, 2013.

FONTEQUE, G.V. et al. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 98-102, 2014.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 618-620, 2002.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. 4 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2010.

KALINOWSKI, S. T. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. **Molecular Ecology Resources**, v. 5, p. 187-189, 2005.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L.; MARSHALL, T.C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

KUMAR, V. et al. Genetic diversity and population structure analysis between indian red jungle fowl and domestic chicken using microsatellite markers. **Animal biotechnology**, v. 26, p. 201-210, 2015.

LEROY, G. et al. Gene diversity, agroecological structure and introgression patterns among village chicken populations across North, West and Central Africa. **BMC Genetics**, v. 13, n. 34, 2012.

LYIMO, C. M. et al. Assessing the genetic diversity of five Tanzanian chicken ecotypes using molecular tools. **South African Journal of Animal Science**, v. 43, p. 499-510, 2013.

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

MTILENI, B. J. et al. Genetic diversity and conservation of South African indigenous chicken populations. **The Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 128, p. 209-218, 2010.

NEGI, P. et al. Genetic structure and diversity of Black Francolin in Uttarakhand, Western Himalaya, India. **Journal of Wildlife and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 29-39, 2020.

NXUMALO, N. et al. Genetic diversity, population structure and ancestral origin of KwaZulu-Natal native chicken ecotypes using microsatellite and mitochondrial DNA markers. **Italian Journal of Animal Science**, v. 19, n. 1, p. 1275-1288, 2020.

OKUMU, O. N. et al. Genetic diversity of indigenous chickens from selected areas in Kenya using microsatellite markers. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 489-495, 2017.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.

OOUSTERHOUT, C. V. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity**, v. 90, p. 502–503, 1999.

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.

SILVA JÚNIOR, M. S. F. S. *et al.* Caracterização genética de galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de comunidades rurais do Meio-Norte do Brasil. *In: CARVALHO, D. A.; SARMENTO, J. L. R.; ALMEIDA, M. J. O. Conservação, uso e melhoramento de galinhas caipiras.* – Ponta Grossa, PR: Atena, p. 18-26., 2020.

SOLTAN, M. E. et al. Genetic structure and bottleneck exploring of sinai chickens indigenous to egypt. **Egyptian Poultry Science**, v. 38, n. 2, p. 345-357, 2018.

TOUKO, B. A. H. et al. Molecular typing of the major histocompatibility complex B microsatellite haplotypes in Cameroon chicken. **Animal Genetic Resources**, v. 56, p. 47-54, 2015.

WILKINSON, S. et al. Characterization of the genetic diversity, structure and admixture of British chicken breeds. **Animal Genetics**, v. 43, n. 5, p. 552-563, 2011.

ZUCCHI, M. I. et al. Estrutura genética e fluxo gênico em *Eugenia dysenterica* DC no Cerrado brasileiro utilizando marcadores SSR. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, 2003.

WRIGHT, S. The Genetics Structure of Populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354, 1951.

ANEXOS

Tabela 1- Marcadores Microsatélites utilizados na pesquisa, localização cromossômica e sequência (Forward/Reverse) de acordo com ISAG/FAO.

Marcador	Localização	Sequência (5' – 3') Forward - Reverse	Tamanho do alelo
ADL268	Cromos. 1	CTCCACCCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	100-116
MCW0037	Cromos. 3	ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA GAAAGCTCACATGACACTGCGAAA	152-160
MCW0111	Cromos. 1	GCTCCATGTGAAGTGGTTTA ATGTCCAATTGTCAATGATG	096-120
MCW0034	Cromos. 2	TGCACGCACTTACATACTTAGAGA TGTCTTCCAATTACATTCATGGG	212-246
LEI0192	Cromos. 6	TGCCAGAGCTTCAGTCTGT GTCATFACTGTTATGTTTATGTC	244-370
MCW0020	Cromos. 1	CTTCTTTGACATGAATTGGCA GCAAGGAAGATTTTGTACAAAATC	179-185
MCW0330	Cromos. 17	TGGACCTCATCAGTCTGACAG AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	256-300
MCW0123	Cromos. 14	CCACTAGAAAAGAACATCCTC GGCTGATGTAAGAAGGGATGA	76-100
MCW0103	Cromos. 3	AACTGCGTTGAGAGTGAATGC TTTCTTAAGTGGATGCTTCTG	264-276
MCW0078	Cromos. 5	CCACACGGAGAGGAGAAGGTCT TAGCATATGAGTGTACTGAGCTTC	135-147
LEI0094	Cromos. 4	GATCTCACCAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	247-287
MCW0069	Cromos. 26	GCACTCGAGAAAACCTCCTGCG ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA	158-176
MCW0098	Cromos. 4	GGCTGCTTTGTGCTCTTCTCG CGATGGTCGTAATTCTCACGT	261-265
MCW0165	Cromos. 23	CAGACATGCATGCCAGATGA GATCCAGTCTGCAGGCTGC	114-118
MCW0216	Cromos. 13	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	139-149

APÊNDICES

Tabela 2. Parâmetros de diversidade genética, englobando todos os indivíduos do plantel da Embrapa Meio-Norte.

<i>Locus</i>	A	AR	Ho	He	PIC	Fst
MCW0123	9	8,913	0,973	0,806	0,773	-0,0143
MCW0111	7	7	0,647	0,780	0,731	0,0476
ADL0268	6	5,9941	0,865	0,775	0,726	0,0577
MCW0165	4	3,9997	0,811	0,638	0,557	-0,0026
MCW0078	6	6	0,703	0,625	0,584	0,0317
MCW0216	6	5,9944	0,622	0,745	0,693	0,0127
MCW0037	3	3	0,405	0,618	0,541	0,0209
MCW0069	9	8,6701	0,541	0,673	0,618	0,0807
MCW0020	4	4	0,757	0,733	0,672	0,0130
MCW0034	9	8,8267	0,757	0,812	0,773	0,0409
MCW0098	5	4,9994	0,568	0,664	0,591	0,0295
LEI0192	4	3,9997	0,622	0,619	0,551	0,0231
LEI0094	7	6,9078	0,378	0,734	0,683	0,0089
MCW0103	7	7	0,757	0,820	0,784	0,0024
MCW0330	9	8,9186	0,811	0,861	0,832	0,0442
Média	6,333	6,281	0,6811	0,7268	0,6739	0,0266
Desv. Padrão	2,0586	1,9957	0,1645	0,8089	0,0955	

A = quantidade de alelos; **AR** = Riqueza alélica; **Ho** = Heterozigosidade observada; **He** = Heterozigosidade esperada; **PIC** = Conteúdo de informação polimórfica; **Fst** = Índice de fixação.

Tabela 3. Parâmetros de diversidade genética, englobando os indivíduos do plantel da Embrapa Meio-Norte, separados por localidade.

<i>Locus</i>	GRUPO 1 (N = 11)					GRUPO 2 (N =13)					GRUPO 3 (N = 7)					GRUPO 4 (N = 6)				
	A	AR	Ho	He	PIC	A	AR	Ho	He	PIC	A	AR	Ho	He	PIC	A	AR	Ho	He	PIC
MCW0123	5	4,995	1.000	0.792	0.718	9	8,615	0.923	0.831	0.781	6	6,000	1.000	0.868	0.779	5	5,000	1.000	0.803	0.699
MCW011	5	5,000	0.600	0.742	0.662	6	6,000	0.727	0.823	0.753	3	3,000	0.571	0.659	0.530	4	4,000	0.667	0.712	0.599
ADL0268	6	5,722	1.000	0.693	0.614	5	4,981	0.769	0.791	0.722	4	4,000	1.000	0.780	0.674	3	3,000	0.667	0.712	0.579
MCW0165	3	3,000	0.727	0.628	0.519	4	3,692	0.846	0.582	0.471	4	4,000	0.857	0.747	0.641	3	3,000	0.833	0.712	0.579
MCW0078	5	4,904	0.636	0.632	0.569	5	4,962	0.769	0.677	0.614	4	4,000	1.000	0.714	0.600	3	3,000	0.333	0.318	0.272
MCW0216	5	4,904	0.455	0.758	0.675	6	5,807	0.615	0.735	0.670	5	5,000	0.857	0.769	0.666	4	4,000	0.667	0.636	0.530
MCW0037	3	3,000	0.273	0.645	0.542	3	2,981	0.462	0.563	0.456	3	3,000	0.857	0.692	0.567	2	2,000	0.000	0.485	0.346
MCW0069	6	5,722	0.636	0.632	0.569	6	5,790	0.538	0.723	0.653	4	4,000	0.429	0.495	0.427	4	4,000	0.500	0.561	0.476
MCW0020	4	3,995	0.636	0.697	0.607	4	3,981	0.692	0.729	0.644	4	4,000	1.000	0.758	0.646	4	4,000	0.833	0.742	0.622
MCW0034	8	7,627	0.818	0.805	0.738	7	6,673	0.846	0.831	0.770	5	5,000	0.714	0.703	0.602	4	4,000	0.500	0.742	0.622
MCW0098	5	4,813	0.636	0.615	0.541	5	4,673	0.462	0.655	0.561	4	4,000	0.571	0.659	0.541	3	3,000	0.667	0.667	0.535
LEI0192	4	3,904	0.273	0.515	0.451	4	3,980	0.692	0.643	0.562	3	3,000	0.857	0.648	0.523	3	3,000	0.833	0.667	0.535
LEI0094	5	4,818	0.273	0.745	0.657	6	5,809	0.231	0.800	0.732	4	4,000	0.571	0.626	0.520	4	4,000	0.667	0.561	0.476
MCW0103	5	5,000	0.727	0.801	0.729	7	6,806	0.769	0.818	0.759	5	5,000	0.714	0.780	0.685	7	7,000	0.833	0.879	0.782
MCW0330	8	7,727	0.818	0.883	0.823	7	6,519	0.692	0.782	0.714	7	7,000	0.857	0.868	0.780	6	6,000	1.000	0.803	0.701
Média	5,1	5,009	0,6338	0,7055	0,6276	5,6	5,418	0,669	0,732	0,617	4,3	4,333	0,790	0,718	0,612	3,9	3,933	0,667	0,667	0,557
Desv/pad	1,4	1,354	0,227	0,095	0,099	1,5	1,457	0,175	0,090	0,105	1,1	1,112	0,186	0,095	0,098	1,2	1,127	0,259	0,140	0,131

GRUPO 1: Brejo e Itapecuru / **GRUPO 2:** Chapadinha e arrepiada / **GRUPO 3:** Teresina (Canela-preta) / **GRUPO 4:** Picos, Jaicós e Paulistana / **A** = quantidade de alelos; **AR** = Riqueza alélica; **Ho** = Heterozigosidade observada; **He** = Heterozigosidade esperada; **PIC** = Conteúdo de informação polimórfica; **Desv/pad** = Desvio padrão.

Tabela 4. Parâmetros relacionado ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

<i>Locus</i>	TODAS AS AVES			GRUPO 1			GRUPO 2			GRUPO 3			GRUPO 4		
	pHWE			pHWE			pHWE			pHWE			pHWE		
	Prob	Def	Exc	Prob	Def	Exc	Prob	Def	Exc	Prob	Def	Exc	Prob	Def	Exc
MCW0123	0,0000*	1,000	0,0019*	0,3729	0,3729	0,0559	0,5401	0,5401	0,2817	0,1727	0,1727	0,3696	1,0000	1,0000	0,2063
MCW0111	0,413	0,0296*	0,9704	0,2607	0,2607	0,8389	0,4860	0,4860	0,8846	0,0992	0,0992	0,9680	0,7866	0,0055*	0,7707
ADL0268	0,5602	0,8290	0,1753	0,1649	0,1649	0,0048*	0,3964	0,3964	0,5657	0,7427	0,7427	0,1780	1,0000	1,0000	0,6930
MCW0165	0,0002*	0,1654	0,8346	1,0000	1,0000	0,3409	0,0858	0,0858	0,0321*	0,0381*	0,0381*	0,7182	0,1020	0,1020	0,4508
MCW0078	0,5221	0,8223	0,2039	0,6753	0,6753	0,7506	0,3568	0,3568	0,2841	0,5821	0,5821	0,0920	1,0000	1,0000	0,9103
MCW0216	0,0061*	0,0156*	0,9844	0,0195*	0,0195*	0,9866	0,1145	0,1145	0,9870	1,0000	1,0000	0,4526	0,7516	0,7516	0,6645
MCW0037	0,0272*	0,0023*	0,9982	0,0072*	0,0072*	0,9997	0,7837	0,7837	0,8490	0,7604	0,7604	0,2414	0,0309*	0,0309*	1,0000
MCW0069	0,0372*	0,1931	0,8095	0,3836	0,3836	0,5994	0,0278*	0,0278*	0,8324	0,4445	0,4445	0,9028	0,5164	0,5164	0,8878
MCW0020	0,6373	0,4433	0,5596	0,5944	0,5944	0,8718	0,7811	0,7811	0,6873	0,6132	0,6132	0,1483	0,3467	0,3467	0,4203
MCW0034	0,7572	0,3244	0,6869	1,0000	1,0000	0,5726	0,6049	0,6049	0,5028	0,6668	0,6668	0,5286	0,2522	0,2522	0,9006
MCW0098	0,1601	0,2801	0,7293	0,6786	0,6786	0,5060	0,1969	0,1969	0,9329	0,8141	0,8141	0,8557	0,2973	0,2973	0,4494
LEI0192	0,8234	0,4362	0,6147	0,0418*	0,0418*	0,9980	0,6317	0,6317	0,4591	0,7185	0,7185	0,2247	1,0000	1,0000	0,3489
LEI0094	0,0000*	0,0000*	1,0000	0,0014*	0,0014*	1,0000	0,0000	0,0000	0,9998	1,0000	1,0000	0,7890	1,0000	1,0000	0,4735
MCW0103	0,0199*	0,0283*	0,9717	0,4283	0,4283	0,7789	0,2355	0,2355	0,9191	0,2703	0,2703	0,9171	0,7577	0,7577	0,9110
MCW0330	0,0257*	0,2029	0,8143	0,5769	0,5769	0,8458	0,3803	0,3803	0,8878	0,4789	0,4789	0,6083	0,2438	0,2438	0,1934

GRUPO 1: Brejo e Itapecuru / **GRUPO 2:** Chapadinha e arrepiada / **GRUPO 3:** Teresina (Canela-preta) / **GRUPO 4:** Picos, Jaicós e Paulistana / **Prob** = Teste de probabilidade; **Def** = Déficit de Heterozigotos; **Exc** = Excesso de Heterozigotos.

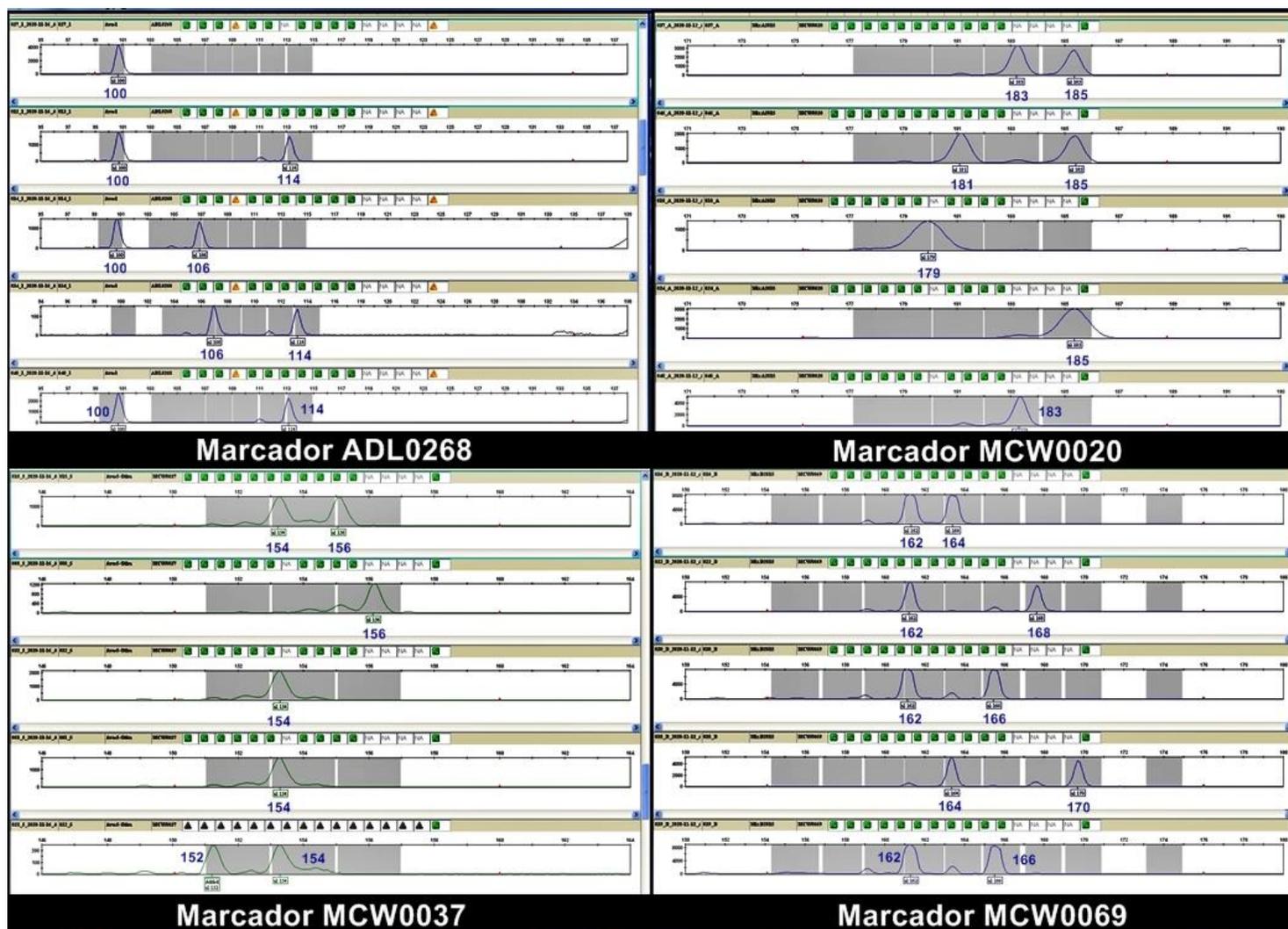
* Valores significativos para os testes de probabilidade, déficit e excesso de heterozigotos (p-valor < 0,05)

Tabela 5. Valores de P obtidos na análise feita no software Bottleneck, para a detecção de gargalos populacionais, nos 4 grupos de aves para diferentes modelos de mutação.

GRUPOS	MODELOS DE MUTAÇÃO		
	IAM	TPM	SMM
Grupo 1	0.01767*	0.31934	0.80530
Grupo 2	0.00003*	0.04730	0.78940
Grupo 3	0.00623*	0.03650*	0.21060
Grupo 4	0.13843	0.42346	0.57654

*Valores de p significativos, respeitando a significância de 5% (p-valor < 0,05), obtidos pelo teste de Wilcoxon para os modelos de mutação IAM (Infinite Alleles Model, ou modelo de infinitos alelos), TPM (Two Phase Model, ou modelo de duas fases) e SMM (Stepwise Mutation Model, ou modelo de passos de mutação).

Figura 8. Eletroferograma dos marcadores ADL0268, MCW0020, MCW0037 e MCW0069, e seus respectivos alelos.



Arquivo 1. Arquivo Genepop, utilizado como base para as análises.

"Microsatellites aves"

MCW0123
 MCW0111
 ADL0268
 MCW0165
 MCW0078
 MCW0216
 MCW0037
 MCW0069
 MCW0020
 MCW0034
 MCW0098
 LEI0192
 LEI0094
 MCW0103
 MCW0330
 POP

268268	Brejo/Itapecuru018 ,	078084	100102	106114	114114	139139	143143	156156	156160	179179	224224	257259	256256	255257	268270
258286	Brejo/Itapecuru019 ,	082088	100104	106114	112114	139143	139143	152154	156162	181181	222222	257259	256256	261261	272272
268276	Brejo/Itapecuru020 ,	078088	096096	104114	112116	133139	137145	152152	156156	179179	222224	257257	248256	261263	268276
258276	Brejo/Itapecuru021 ,	084088	096104	106114	114116	135139	143145	154154	156156	179185	222236	245257	256256	255255	272276
276284	Brejo/Itapecuru022 ,	078082	100100	108114	112116	135135	141141	152154	162168	185185	222246	257257	252256	255281	272276
258268	Brejo/Itapecuru023 ,	078084	000000	106114	114116	131139	143145	152154	156156	179181	222234	247259	256256	257257	272272
260274	Brejo/Itapecuru032 ,	080084	100102	106114	116116	139143	141141	154154	156164	179183	224230	257257	252252	255255	268272
276286	Brejo/Itapecuru033 ,	078084	100100	108114	116116	139143	143143	152152	156162	179185	214222	247257	252256	255255	270276

258286 Brejo/Itapecuru034 , 084088 098102 106114 114116 139139 145145 154154 156156 179185 224226 255259 256256 261261 268272
 284284 Brejo/Itapecuru035 , 080084 100100 100114 114116 139139 145145 154154 164170 179185 224234 257257 256256 257257 266270
 266286 Brejo/Itapecuru008 , 080084 096102 112114 114116 133139 137145 156156 156162 183185 222230 257259 264264 257257 266266
 POP
 266270 266286 Chapadinha/arrepiada024 , 084088 100102 106112 114118 131139 139143 152156 156156 185185 222234 259259 252256 257257
 268268 268268 Chapadinha/arrepiada025 , 084084 096096 112112 114116 135141 143145 154154 156156 179185 222234 259259 252256 257257
 264264 266284 Chapadinha/arrepiada026 , 084090 098098 104114 114116 139139 143143 154156 156156 181185 222234 259259 248256 257257
 266274 266274 Chapadinha/arrepiada027 , 078084 096102 112114 114116 135139 143143 152154 156156 179185 230246 259259 252252 257261
 266268 266286 Chapadinha/arrepiada028 , 082084 000000 112114 116116 135139 143145 156156 156162 179183 230246 257257 256256 255255
 270270 268286 Chapadinha/arrepiada029 , 076094 102112 100114 114116 139139 137145 154154 156164 185185 224234 257259 256256 255255
 266268 266286 Chapadinha/arrepiada030 , 078084 096100 100114 116116 133141 143143 154156 162166 179183 236246 257257 248264 253253
 272276 260276 Chapadinha/arrepiada031 , 086090 100106 106106 114116 131139 139139 154156 156156 183185 222224 255259 256256 259259
 268274 274286 Chapadinha/arrepiada046 , 080084 098100 112112 114116 131139 143145 156156 158164 181185 226230 257259 256264 261281
 268272 268286 Chapadinha/arrepiada047 , 080086 000000 100114 112116 139139 143145 154156 162174 183185 234246 257257 252256 259259
 266268 266266 Chapadinha/arrepiada048 , 080084 100102 100112 114116 131139 141141 154154 162162 183183 234234 255259 252256 259259
 264268 286286 Chapadinha/arrepiada049 , 078084 102112 104106 114116 133139 145147 154154 162174 179179 222222 247257 256264 255259
 266268 266266 Chapadinha/arrepiada050 , 082088 100100 106112 114116 135139 143147 154154 162166 179183 222230 245257 252256 255255
 POP
 266266 266274 Teresina(can-preta)011 , 078084 098098 106112 114116 135141 137145 154156 156166 179185 222222 257257 252256 255255
 268272 268284 Teresina(can-preta)012 , 080086 096102 106112 114116 135139 141145 152154 156156 183185 222232 257257 252256 255259

268274 274284 Teresina(can-preta)013 , 078084 096102 100114 112114 135139 139145 152152 156164 179185 224246 247259 252256 255257
 268272 268268 Teresina(can-preta)014 , 078084 096102 100106 114116 135139 139143 152154 156156 179183 222224 257259 252256 255257
 272276 276286 Teresina(can-preta)015 , 082086 096096 112114 114116 135139 143145 154156 156156 183185 224234 245257 252264 255261
 268268 258268 Teresina(can-preta)016 , 082088 102102 106114 112114 139143 139139 152154 162164 181183 222224 259259 256264 257257
 268274 274284 Teresina(can-preta)017 , 080084 096102 106112 118118 139141 139145 152156 156156 179185 222222 257259 252252 255255
 POP
 268272 276286 Picos/Jaicós/Paulis036 , 080084 096096 106114 112116 139139 139143 152152 156162 179181 230234 259259 252256 255261
 264268 272286 Picos/Jaicós/Paulis037 , 076084 102106 100100 112112 135139 141145 154154 162162 183185 224234 247259 256264 255257
 268276 276286 Picos/Jaicós/Paulis038 , 084088 102106 100106 114116 139139 143145 152152 162162 181181 224224 247257 256256 255255
 268274 260274 Picos/Jaicós/Paulis039 , 080084 096102 114114 114116 139139 143143 154154 162166 179185 234234 247259 252264 255259
 266266 266286 Picos/Jaicós/Paulis040 , 078084 102102 100114 114116 131139 143143 154154 156164 179181 230246 259259 256264 255259
 270276 276286 Picos/Jaicós/Paulis001 , 076088 100102 100106 114116 139139 143145 154154 162162 179181 224224 247257 256264 255255