



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, ANCESTRALIDADE INDIVIDUAL E PADRÕES
DE INTROGRESSÕES EM RAÇAS DE GALINHAS IBERO-AMERICANAS**

TERESINA - PI

2020

DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

**DIVERSIDADE GENÉTICA, ANCESTRALIDADE INDIVIDUAL E PADRÕES
DE INTROGRESSÕES EM RAÇAS DE GALINHAS IBERO-AMERICANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí
(UFPI), como requisito para obtenção de titulação de
doutor na Área de Concentração: Produção Animal.

Orientador: Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento
Coorientadora: Dra. Maria Claudene Barros

TERESINA – PI

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

- C331d Carvalho, Débora Araújo de.
Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas ibero-americanas / Débora Araújo de Carvalho. -- 2020.
124 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Teresina, 2020.
“Orientador: Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento.”
“Coorientadora: Dra. Maria Claudene Barros.”
1. Galinhas – Aspectos genéticos. *Gallus gallus* – Conservação genética. 3. DNA mitocondrial. I. Sarmiento, José Lindenberg Rocha. II. Barros, Maria Claudene. III. Título.

CDD 636.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



DEFESA DE TESE

TÍTULO: Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas

CANDIDATA: DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

APROVADA (A)
NÃO APROVADA ()

Teresina, 27 de março de 2020.

Prof. Dr. José Lindenberg Rocha Sarmiento
Presidente

Aprovada – A
Não Aprovada – NAp



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



DEFESA DE TESE

TÍTULO: Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas

CANDIDATA: DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

APROVADA (A)
NÃO APROVADA ()

Teresina, 27 de março de 2020.

Profa. Dra. Maria Claudene Barros
Coorientadora

Aprovada – A
Não Aprovada – NAp



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



DEFESA DE TESE

TÍTULO: Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas

CANDIDATA: DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

APROVADA (A)
NÃO APROVADA ()

Teresina, 27 de março de 2020.

Prof. Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo
Examinador Externo

Aprovada – A
Não Aprovada – NAp



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



DEFESA DE TESE

TÍTULO: Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas

CANDIDATA: DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

APROVADA (A)
NÃO APROVADA ()

Teresina, 27 de março de 2020.

Dr. Marcos Jacob de Oliveira Almeida
Examinador Externo



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL




DEFESA DE TESE

TÍTULO: Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas

CANDIDATA: DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

APROVADA (A)
NÃO APROVADA ()

Teresina, 27 de março de 2020.


Prof. Dr. Fábio Barros Britto
Examinador Interno

Aprovada – A
Não Aprovada – NAp



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PROGRAMAS STRICTO SENSU
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



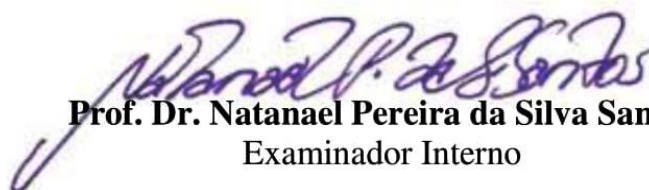
DEFESA DE TESE

TÍTULO: Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas

CANDIDATA: DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

APROVADA (A)
NÃO APROVADA ()

Teresina, 27 de março de 2020


Prof. Dr. Natanael Pereira da Silva Santos
Examinador Interno

Aprovada – A
Não Aprovada – NAp

**DIVERSIDADE GENÉTICA, ANCESTRALIDADE INDIVIDUAL E PADRÕES
DE INTROGRESSÕES EM RAÇAS DE GALINHAS IBEROAMERICANAS**

DÉBORA ARAÚJO DE CARVALHO

Tese aprovada em: 27/03/2020

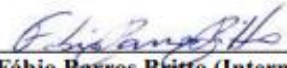
Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Lindenberg Röcha Sarmento (Presidente) / DZO/CCA/UFPI



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



Prof. Dr. Fábio Barros Britto (Interno) / CCN/UFPI



Prof. Dr. Juan Vicente Delgado Bermejo (Externo) / UCO



Prof. Dr. Marcos Jacob de Oliveira Almeida (Externo) / EMBRAPA



Profa. Dra. Maria Claudene Barros (Externa) / UEMA

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 esta 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 conquista para mim...

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela oportunidade que me concedeu de realizar essa pesquisa de conclusão de curso, graças a isso uma 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 consegui concluir com êxito mais uma etapa importante na minha vida.

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

Aos professores José Lindenberg Rocha Sarmento, Maria Claudene Barros, Marcos Jacob de Oliveira Almeida, Juan Vicente Delgado Bermejo, Amparo Martinez Martinez e Esperanza Camacho, sinto-me privilegiada por ter sido orientada por vários pesquisadores comprometidos com trabalhos de conservação animal. Vocês são exemplo de profissionais, agradeço pela confiança, pelos ensinamentos, pela preocupação com o meu bem estar e desenvolvimento da pesquisa. A todos minha sincera gratidão.

À Família Red CONBIAND, que vem desenvolvendo trabalhos admiráveis com as raças nativas em vários países, por ter me recebido na UCO com todo carinho e atenção, mobilizando sua equipe para me auxiliar nas análises laboratoriais. Todos foram bem prestativos e me ajudaram muito além do que pensei. A equipe de laboratório da UCO é sensacional. Grata também pela disponibilização dos bancos de dados das várias raças que muito ajudaram para a realização da proposta desta tese. A vocês o meu MUITO obrigado.

Ao INIAV, nas pessoas de Nuno Carolino e Inês Carolino, pela disponibilização dos bancos de dados das aves portuguesas, grata pela confiança a mim dispensada.

À querida família GEMA da UFPI, a cada integrante minha gratidão por tê-los conhecido. Me 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.

À equipe do laboratório de Genética e Biologia Molecular da UEMA – Caxias. Todos muito prestativos, pude fazer valiosas amizades, a vocês meu carinho.

À querida professora Regina Gomes da UFPI, por ter mobilizado grande equipe para oportunizar minha ida até a Espanha para a realização do doutorado sanduíche. A você minha eterna gratidão e consideração, muito obrigada.

Ao professor Fabio Britto, pelas constantes ajudas, durante toda essa trajetória, sempre muito solícito quando precisei.

Aos professores Ronaldo Vasconcelos e Paulo Carneiro da UESB, bem como sua equipe pela disponibilização dos materiais biológicos das galinhas de raças da Bahia, grata pela parceria e confiança.

Aos verdadeiros amigos que fiz durante o doutorado como Bruna Lima, Artur Rocha e Darlan Evangelista. Quero tê-los para sempre no meu ciclo de amizades. Aos demais amigos que me ajudaram na realização da tese. Vocês são demais.

Aos produtores de galinhas Canela-Preta, bem como de raças nativas de galinhas em todo mundo, a vocês dedico esse trabalho.

À Universidade Federal do Piauí – UFPI, via programa de Pós Graduação em Ciência Animal pela oportunidade maravilhosa de fazer parte do quadro de alunos desta instituição de excelente ensino e referência!

A toda a equipe técnica e de apoio da pós-graduação pelo carinho, sempre bem atenciosos e dispostos a ajudar.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e a toda a minha família e amigos que torceram por mim, seja em pensamento, palavra e oração, meus sinceros agradecimentos.

Sumário

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	15
LISTA DE TABELAS	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	20
CAPÍTULO 1 - Importância socioeconômica e genética das raças nativas de galinhas caipiras: uma revisão	21
1. INTRODUÇÃO	23
2. CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DAS GALINHAS	24
3. GALINHAS CAIPIRAS NO BRASIL	25
4. IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO DAS RAÇAS NATIVAS	26
5. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA	27
6. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DAS GALINHAS NATIVAS	28
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO 2 - Parâmetros genéticos populacionais aplicados na caracterização e conservação de raças nativas	33
1. INTRODUÇÃO	35
2. DIVERSIDADE GENÉTICA	35
3. ESTRUTURA GENÉTICA	36
4. MARCADORES DE DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)	37
5. MARCADORES MICROSSATÉLITES	39
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	40
CAPÍTULO 3 - Raças nativas de galinhas do Brasil e países da Península Ibérica	44
1. INTRODUÇÃO	46
2. RAÇAS DE GALINHAS DO BRASIL E DA PENÍNSULA IBÉRICA	47
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS	57
CAPÍTULO 4 - Diferenciação genética entre galinhas de raças brasileiras, exóticas e linhagem industrial	59
Introdução	62
Materiais e Métodos	63
Resultados e Discussão	67
Conclusões	74

Referências	75
CAPÍTULO 5 - Diversidade genética de dezesseis raças nativas de galinhas do Brasil, Portugal e Espanha	78
Introdução	81
Materiais e Métodos	82
Resultados e Discussão	86
Conclusões	95
Referências	95
CAPÍTULO 6 - Decifrando a origem e diversidade genética de três raças nativas de galinhas do Nordeste do Brasil	101
Introdução	104
Materiais e Métodos	105
Resultados e Discussão	111
Conclusões	117
CONSIDERAÇÕES FINAIS	123

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPITULO 3 - Raças nativas de galinhas do Brasil e países da Península Ibérica

Figura 1. Galinhas caipiras da raça Canela-Preta.....	48
Figura 2. Galinhas da raça Peloco.....	49
Figura 3. Galinhas da raça Caneluda do Catolé.....	49
Figura 4. Fêmea e Macho das galinhas da raça Amarela.....	50
Figura 5. Galinhas da Raça Branca.....	51
Figura 6. Galinhas da raça Preta Lusitânica.....	51
Figura 7. Galinhas da raça Pedrês Portuguesa.....	52
Figura 8. Galinhas da raça Andaluza Azul.....	53
Figura 9. Galinhas da raça Catellana Negra.....	53
Figura 10. Raça de galinhas Combatiente Español.....	54
Figura 11. Galinhas da raça Extremeña Azul.....	54
Figura 12. Galinhas da raça Ibicenca.....	55
Figura 13. Galinhas da raça Mallorquina.....	55
Figura 14. Galinhas da raça Pita Pinta.....	56
Figura 15. Galinhas da raça Sureña.....	56
Figura 16. Galinhas da variedade Utrerana Perdiz.....	57

CAPITULO 4 - Diferenciação genética entre galinhas de raças brasileiras, exóticas e linhagem industrial

Figura 1. Mapa da localização dos estados e municípios onde amostras de galinhas de cada uma das raças brasileiras foram coletadas dentro da região Nordeste do Brasil.....	64
Figura 2. Dispersão gráfica das distâncias interpopulacionais dos seis grupos genéticos de galinhas (CP: Canela-Preta, CAN: Caneluda do Catolé, PEL: Peloco, PES: Pesadão, LEGH: Leghorn, CORN: Cornish) em relação aos eixos cartesianos estabelecidos pelos componentes principais (PC ₁ e PC ₂) com base na matriz de dissimilaridade.....	71
Figura 3. Dendograma de Neighbor-net construído utilizando a distância de Nei entre os seis grupos genéticos avaliados (três raças nativas e três grupos comerciais). CP: Canela-Preta; CAN: Caneluda do Catolé; PEL: Peloco; PES: Pesadão; LEGH: Leghorn; CORN: Cornish.....	72

Figura 4. Representação gráfica do valor de K para a formação de grupos de galinhas das raças brasileiras e exóticas.....72

Figura 5. Análise de estrutura populacional de 196 indivíduos de seis raças de galinhas representando formação de quatro a seis grupos com base em 25 marcadores microssatélites.....73

CAPÍTULO 5 - Diversidade genética de dezesseis raças nativas de galinhas do Brasil, Portugal e Espanha

Figura 1. Mapa da localização dos países onde foram amostradas as raças de galinhas (Brasil, Espanha e Portugal).....83

Figura 2. *Neighbor-net* construído utilizando a distância de Nei entre as 19 raças estudadas.....90

Figura 3. Representação gráfica do valor de K ótimo para a formação dos grupos de galinhas estudados, baseado na análise do programa STRUCTURE.....93

Figura 4. Análise de estrutura populacional realizado no software STRUCTURE com 816 indivíduos, representando os 19 grupos de galinhas investigados (16 raças nativas e 3 grupos controles) com base em 25 marcadores de microssatélites.....94

Figura 5. Análise discriminante de componentes principais realizada no programa R com 816 indivíduos, representando os 19 grupos de galinhas investigados (16 raças nativas e 3 grupos controles) com base em 25 marcadores microssatélites.....94

Figura 6. Representação gráfica do melhor número de *clusters* para a formação dos grupos de galinhas estudados, baseado na análise de componentes principais.....95

CAPÍTULO 6 - Decifrando a origem e diversidade genética de três raças nativas de galinhas do Nordeste do Brasil

Figura 1. Mapa da localização dos estados onde cada amostra de galinha das raças brasileiras foi coletada dentro da região Nordeste.....106

Figura 2. Rede de junção mediana dos seis haplótipos referentes às raças brasileiras, nove sequências de referência de Liu et al. (2006), duas sequências de galinhas do Egito (África) e uma sequência para cada uma das subespécies *Gallus gallus murghi*, *Gallus gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus* e *Gallus gallus bankiva*.....113

Figura 3. *Neighbor-net* construído utilizando a distância de Nei entre as 20 raças estudadas. CP: Canela-Preta; CAN: Caneluda do Catolé; PEL: Peloco; AAZ: Andaluza Azul; CASN: Castellana Negra; CES: Combatiente Español; EAZ: Extremêna Azul; IB: Ibicenca; MLL: Mallorca; PPA: Pita Pinta; SUR: Sureña; UP: Utrerana Perdiz; ARAU: Araucana; NIG: galinhas da Nigéria; AM: Amarela; BR: Branca; PLU: Preta Lusitânica; PP: Pedrês Portuguesa; LEGH: Leghorn; CORN: Cornish.....117

Figura 4. Análise de estrutura populacional realizada no software STRUCTURE com 100 indivíduos de três raças de galinhas brasileiras (Canela-Preta, Caneluda e Peloco), com base em 25 marcadores microssatélites. Representações gráficas de $k = 1$ a $k = 5$118

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 4 - Diferenciação genética entre galinhas de raças brasileiras, exóticas e linhagem industrial

Tabela 1. Descrição dos *loci* de microssatélites utilizados para estudo genético das raças de galinhas brasileiras, exóticas e linhagem industrial.....65

Tabela 2. Média e desvio padrão para diversas estimativas ao longo de cada *locus* para as três raças brasileiras e três raças exóticas.....67

Tabela 3. Estatística da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 25 *loci* de microssatélites em três raças de galinhas nativas brasileiras e três raças exóticas.....69

CAPITULO 5 - Diversidade genética de dezesseis raças nativas de galinhas do Brasil, Portugal e Espanha

Tabela 1. Valores médios para os parâmetros populacionais calculados para cada *locus* nas populações de raças de galinhas estudadas do Brasil, Portugal e Espanha.....86

Tabela 2. Número médio de alelos (MNA), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e índice de fixação de Wright [$1 - (H_o/H_e)$] para as populações estudadas.....88

Tabela 3. Estatística da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 25 *loci* de microssatélites nos 19 grupos genéticos estudados.....91

Tabela 4. Matriz de distância de NEI, representando os 19 grupos de galinhas investigados (16 raças nativas e 3 grupos controles) com base em 25 marcadores de microssatélites.....100

CAPITULO 6 - Decifrando a origem e diversidade genética de três raças nativas de galinhas do Nordeste do Brasil

Tabela 1. Informações de raças por países e quantidade de indivíduos utilizado por raça estudada.....110

Tabela 2. Diversidade mtDNA de três raças de galinhas brasileiras.....111

Tabela 3. Polimorfismos de nucleotídeos observados na região D-loop do mtDNA de 47 sequências de galinhas, nas três diferentes raças nativas avaliadas112

Tabela 4. Estatísticas da análise de variância molecular (AMOVA) nas três raças de galinhas brasileiras, obtidos a partir dos dados de mtDNA.....113

Tabela 5. Média para diversas estimativas ao longo de cada *locus* para as três raças de galinhas estudadas.....115

Tabela 6. Matriz de distância de NEI representando os 20 grupos de galinhas investigados (18 raças nativas e dois grupos comerciais) com base em 25 marcadores de microssatélites.....122

RESUMO

CARVALHO, D.A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e padrões de introgressões em raças de galinhas Ibero-Americanas**. 2020. Tese. (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

As raças de galinhas nativas (*Gallus gallus*) são importantes para o desenvolvimento da produção avícola mundial e para a subsistência. Contudo, apenas 25% destas raças estão em algum tipo de programa de conservação. Informações moleculares poderão apoiar esses programas de conservação e a utilização dessas raças, auxiliando no progresso de projetos e fornecendo informações importantes sobre esses recursos genéticos para a produção avícola comercial e para o relato da história da humanidade. Objetivou-se com este estudo avaliar, através de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial, os níveis da diversidade genética, a relação filogenética e os padrões de introgressão existentes entre raças nativas de galinhas brasileiras e de países da Península Ibérica, para fornecer subsídios para programas de conservação e uso sustentável da diversidade genética da espécie. A pesquisa foi realizada pela UFPI em parceria com UEMA, UCO e INIAV. Foram avaliadas raças nativas do Nordeste do Brasil (3), Portugal (4), Espanha (9), Chile (1), Nigéria (1) e como grupos controles três variedades comerciais, totalizando 21 grupos genéticos. Fez-se uso de vários softwares estatísticos para estimar, em nível de DNA nuclear e não nuclear, os índices de diversidade nucleotídica, diversidade haplotípica e as distâncias dentro, entre e para todas as populações incluídas nos grupos que foram formados. As análises filogenéticas mitocondriais apontam que as raças nativas de galinhas brasileiras apresentam múltiplas origens, principalmente de galinhas Europeias, indianas, africanas e chinesas. As três raças de galinhas do Brasil avaliadas pertencem a três grupos genéticos distintos. Dentre estes, a raça Canela-Preta apresenta características genéticas próprias e as raças Caneluda do Catolé e Peloco compartilham combinações gênicas. Com base nos microssatélites, as galinhas do Brasil são mais próximas geneticamente das aves de Portugal, Nigéria e Araucanas do Chile. As raças do Brasil, Portugal e Espanha contêm estruturas genéticas específicas de cada país, o que demonstra a riqueza genética da espécie *Gallus gallus*. Estes resultados contribuirão diretamente para conservação dessas raças e para incentivar a promoção de novas pesquisas genéticas em outros estados do Brasil, bem como em outros países. Estes são os primeiros trabalhos nessa envergadura com raças nativas de galinhas do Brasil em conjunto com raças da Península Ibérica. Isto resulta em fortalecimento, valorização e reconhecimento dessas raças no meio científico, bem como na área rural com produtores. Os dados genéticos demonstram que as raças de galinhas nativas constituem um reservatório vasto e importante de diversidade genética para a produção e conservação da espécie *Gallus gallus*. Portanto, estimular a produção, bem como a comercialização desses materiais genéticos se faz primordial, pois dessa forma será promovida a conservação e utilização desses patrimônios genéticos, que também devem ser mais estudados a fim de elucidar o real potencial genético dessas aves que se mostram promissoras.

PALAVRAS-CHAVE: Conservação genética, DNA Mitocondrial, *Gallus gallus*, Microssatélites, Raças Nativas.

ABSTRACT

CARVALHO, D.A. **Genetic diversity, individual ancestry and introgression patterns in Ibero-American chicken breeds**. 2020. Thesis (PhD in Animal Science). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2020.

Native chicken breeds are important for the development of world poultry production and livelihoods, however only 25% of the world's native chicken breeds (*Gallus gallus*) are in any type of conservation program. Molecular information can support these conservation programs and the use of these breeds, assisting in the progress of projects and providing important information about these valuable genetic resources for commercial poultry production and for the report of the human history. Given the above, the objective of this study was to evaluate, through microsatellite markers and mitochondrial DNA, the levels of genetic diversity, the phylogenetic relationship and the patterns of introgressions that exist between native chicken breeds from Brazil and countries of the Iberian Peninsula, in order to provide subsidies for conservation programs and sustainable use of the species' genetic diversity. The research was carried out by UFPI in partnership with UEMA, UCO and INIAV. Three native breeds from northeastern Brazil, four breeds from Portugal, nine breeds from Spain, one breed from Chile, and one breed from Nigeria were used. Also, three commercial strains were evaluated as control groups, totalling 19 genetic groups. Various statistical programs were used to estimate, at the level of nuclear and non-nuclear DNA, the indexes of nucleotide diversity, haplotypic diversity, and the distances within, between and for all populations included in the groups that were formed. Mitochondrial phylogenetic analyses indicate that the Brazilian native breeds have multiple origins, especially European, Indian, African, and Chinese. The three Brazilian chicken breeds evaluated belong to three distinct genetic groups. The Canela-Preta breed has its own genetic characteristics, whereas the Caneluda do Catolé and Peloco breeds share genetic combinations. Based on microsatellites, chickens from Brazil are genetically closer to birds from Portugal, Nigeria and Araucanas from Chile. The breeds from Brazil, Portugal and Spain contain specific genetic structures for each country, which demonstrates the genetic richness of the *Gallus gallus* species. These results will directly contribute to the conservation of these breeds and encourage the promotion of new genetic research in other states of Brazil, as well as in other countries. These are the first works on this scale with native breeds of chickens from Brazil in conjunction with the Iberian Peninsula. Our results will help in strengthening, valuation and recognition of these breeds in the scientific community, as well as in the rural area by producers. The genetic data demonstrate that the native chicken breeds constitute a wide and important reservoir of genetic diversity for the production and conservation of the *Gallus gallus* species. Thus, stimulating the production, as well as the commercialization of these genetic materials is paramount, because in this way it would be promoting the conservation and use of these genetic assets, which should also be further studied in order to elucidate the real genetic potential of these promising birds.

KEYWORDS: Genetic conservation, Mitochondrial DNA, *Gallus gallus*, Microsatellites, Native Breeds.

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

As galinhas caipiras estão presentes em todo o mundo e representam uma fonte de proteína e renda para pequenos agricultores. As raças nativas de galinhas são patrimônios genéticos de cada país, de modo que sua criação está relacionada à cultura, história, ações culinárias ou religiosas. Sendo assim, conservar essas raças através de seu uso é primordial para o desenvolvimento e fortalecimento agropecuário de um país. Paralelamente com a recorrente mudança edafoclimática que ocorre no mundo, faz-se necessário, no que tange a área de produção animal, desenvolver linhagens mais resistentes que atendam a demanda de consumo de proteína animal a nível global. Com isso, é estratégico conservar as raças nativas, uma vez que estas são detentoras de genes relacionados à adaptação e resistência. Para isso, deve-se primeiramente conhecer a variabilidade genética que esses animais possuem, para então elaborar programas específicos de uso sustentável de cada raça.

A integralização dos laboratórios a nível internacional possibilita melhor aproveitamento dos dados gerados em diferentes países, pois dissemina entre os parceiros de forma mais ampla, rápida e eficiente os conhecimentos e novas tecnologias geradas, reforçando a importância da pesquisa em rede. Os dados gerados a partir de projetos conjuntos servirão de auxílio para reconhecimento e valorização das raças em estudo nos seus países de origem, além de fortalecer os respectivos programas de conservação, utilização e seleção de cada raça.

Conservar uma raça nativa é garantir genes que poderão ser utilizados em futuros programas de melhoramento intra e inter raça. Dado o exposto, objetivou-se avaliar através de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial, os níveis da diversidade genética, a relação filogenética e os padrões de introgressões existentes entre galinhas brasileiras e de países da Península Ibérica, com o intuito de fornecer subsídios para programas de conservação e uso sustentável da diversidade genética da espécie.

Esta Tese foi desenvolvida sob protocolo Nº 399/17 da Comissão de Ética em experimentação animal da UFPI, estruturada conforme as normas para elaboração de Teses do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UFPI e organizada a partir da revisão de literatura em capítulos.

CAPÍTULO 1

**Importância socioeconômica e genética das raças nativas de galinhas caipiras: uma
revisão**

IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA E GENÉTICA DAS RAÇAS NATIVAS DE GALINHAS CAIPIRAS: UMA REVISÃO

RESUMO: Os estudos que visam à caracterização, conservação e melhoramento de galinhas de raças nativas tendem a crescer expressivamente, dado o potencial econômico desse tipo de ave. Para tanto, se faz necessária a promoção, no meio científico agropecuário, das características qualitativas e do papel que as aves nativas possuem no desenvolvimento do país. Esta revisão de literatura foi realizada com o objetivo de analisar a importância socioeconômica e genética das raças nativas de galinhas, bem como a relevância da conservação e utilização genética dessas aves. As raças nativas são conhecidas por sua tolerância a diversas condições de ambiente. Por este motivo, essas raças podem ser consideradas bancos de genes para o desenvolvimento de novas linhagens na avicultura industrial. Levando-se em consideração as mudanças climáticas que vêm ocorrendo e a importância da produção da raça pura, que é realizada principalmente por pequenos agricultores locais (o que as torna patrimônio nacional), é possível entender a relevância de conservar esses materiais genéticos.

PALAVRAS-CHAVE: Avicultura. Conservação. Raças Nativas. Recursos Genéticos.

SOCIOECONOMIC AND GENETIC IMPORTANCE OF NATIVE BREEDS OF FREE-RANGE CHICKENS: A REVIEW

ABSTRACT: Studies aimed at characterizing, conserving and improving native chicken breeds tend to grow significantly, given the economic potential of this type of bird. Therefore, it is necessary to promote in the agricultural scientific environment, the qualitative characteristics and the role that native birds have in the development of the country. This literature review has the objective of analyzing the socioeconomic and genetic importance of the native breeds of chickens, as well as the relevance of the conservation and use of the genetic use of these birds. Native breeds are famous by their tolerance to various environmental conditions. For this reason, these breeds can be considered as gene banks for the development of new lines in industrial agriculture. Considering the climate changes that are occurring and the importance of purebred production, which is carried out mainly by small local producers (which makes these breeds a national heritage), it is possible to understand the relevance of conserving these genetic materials.

KEYWORDS: Poultry production. Conservation. Native Breeds. Genetic Resources.

1. INTRODUÇÃO

O meio rural tem sido visto como portador de soluções para os problemas de desemprego e para a melhoria da qualidade de vida da população humana. As atividades neste campo específico exigem a permanência dos produtores na propriedade para melhor gerirem a criação, contribuindo para a geração de renda da família e para a geração de emprego. Essa atividade é típica de pequenas propriedades rurais. Contudo, a maioria dos pequenos produtores não tem condições de competir com a produção avícola industrial. Por isso, deve-se pensar na avicultura familiar e nos produtos oriundos da produção tradicional como uma atividade diferenciada, rentável e adaptável à realidade produtiva tradicional (FONTEQUE et al., 2014; CARVALHO et al., 2016).

Paralelamente, o consumo de carne avícola (frango de corte) é o terceiro maior do mundo (GUIMARÃES et al., 2017), o que reforça a necessidade de produção de aves em larga escala. Todavia, as raças nativas são as geradoras de linhagens industriais, uma vez que estas últimas surgiram bem depois da existência das raças nativas. As linhagens industriais pioneiras são, portanto, oriundas de afinamento genético e pressão de seleção dentro das raças já existentes. A seleção de linhagens especializadas é uma tecnologia moderna quando comparada à existência das raças nativas. Esta afirmação demonstra a relevância da conservação das raças nativas, não só pela sua importância histórico-cultural, uma vez que cada raça representa um patrimônio genético de um país, mas também pela sua importância para a avicultura de subsistência e industrial. Entretanto, apenas 25% das raças de galinhas nativas estão em algum tipo de programa de conservação (HOFFMANN, 2009; DAMBRÓS JUNIOR, 2010). Isto implica na necessidade de ações com fins de resgatar, estudar e conservar esses animais.

Houve uma conscientização por parte dos pesquisadores no que tange à importância das raças nativas domésticas na biodiversidade mundial, devido aos genes e combinações gênicas que estas possuem e que podem ser úteis na agropecuária no futuro (MARIANTE et al., 2008; CARVALHO et al., 2016). Segundo Egito (2007), para a manutenção da espécie, cada raça possui, possivelmente, uma combinação única de genes, sendo a presença e a frequência das formas alélicas a base da variação genotípica. Com isso, a diversidade

genética dentro das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variação presente dentro de cada raça. Neste contexto, a diversidade genética é imprescindível para o melhoramento genético sustentável, uma vez que não é possível prever com objetividade quais características poderão ser necessárias no futuro.

Assim, o foco primordial no estabelecimento de estratégias para a conservação deve ser a caracterização das raças e populações, de modo a fornecer uma visão global da diversidade genética existente. Estudos de caracterização genética de raças de galinhas nativas têm sido realizados por alguns países, como Espanha, Índia e Peru (CARVALHO et al., 2016). Contudo, são necessários mais trabalhos, envolvendo outras regiões, que busquem elucidar a origem, a formação, a distância genética e a variabilidade genética dessas aves. De maneira geral, a realização de estudos comparativos de diversidade genética e da relação genética entre as diferentes raças existentes no mundo consolida uma base de dados ampla com aplicações para conservação, compreensão da evolução e uso em programas de seleção (EGITO, 2007).

Os marcadores moleculares tipo microssatélites e a região *D-loop* do DNA mitocondrial têm sido amplamente utilizados em estudos de diversidade genética. Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), as pesquisas que fazem uso desses marcadores consolidaram-se na primeira década dos anos 2000 (FAO, 2004; FONTEQUE et al., 2014). Vale ressaltar que a população humana está em ascensão e, com isso, a demanda na produção de proteína de origem animal está cada dia maior. Por este motivo, faz-se necessária maior difusão de estudos que permitam conhecer a composição genética de aves nativas, bem como sua origem e evolução, pois essas informações subsidiarão programas de conservação, utilização e melhoramento genético.

Neste capítulo, será apresentada uma discussão sobre a importância socioeconômica e genética das raças nativas de galinhas caipiras, bem como a relevância da conservação e utilização genética destas aves.

2. CLASSIFICAÇÃO E ORIGEM DAS GALINHAS

As galinhas domésticas pertencem ao reino Animalia, filo Chordata, classe aves, ordem galliformes, família Phasianidae, gênero *Gallus*, espécie *Gallus gallus* e subespécie *Gallus gallus domesticus*. A origem das galinhas domésticas ascende de até quatro tipos de galinhas selvagens (*Jungle Fowl*): *Gallus sonnerati* (*Grey Jungle Fowl*); *Gallus gallus* (*Red Jungle Fowl*); *Gallus lafayettei* (*Ceylon Jungle Fowl*); e o *Gallus varius* (*Green Jungle Fowl*) (DELACOUR, 1977; MOISEYEVA et al., 2003). Baseados em estudos filogenéticos, pesquisadores defendem que o *Red Jungle Fowl* (*Gallus gallus*), proveniente do Sudoeste asiático, aparenta ser a espécie mais próxima das galinhas caipiras atuais (HIRST, 2014).

Achados arqueológicos apontam que a evidência das primeiras galinhas domésticas ocorreu por volta do ano 5400 a.C., no continente asiático, mais precisamente na China. As galinhas eram criadas com intuítos sagrados, pois até então era proibido o consumo de sua carne. Posteriormente, as aves espalharam-se pela Pérsia e Grécia antiga, devido à cultura de lutas de galos que era habitual na época. As galinhas são conhecidas em todo o mundo por sua característica de adaptabilidade às diversas condições climáticas. Por conta desta particularidade, esses animais se espalharam por todos os continentes. Com o advento da invasão romana, a galinha foi introduzida em todo o seu império, inclusive nos países da Península Ibérica (DGAV, 2013; HIRST, 2014; CLAUER, 2016).

3. GALINHAS CAIPIRAS NO BRASIL

Correntes de pesquisadores, em sua maioria, defendem que as galinhas caipiras foram introduzidas no Brasil por meio da colonização da Península Ibérica (Portugal e Espanha), por volta do ano de 1500. Contudo, outra corrente científica menor acredita que as galinhas caipiras nacionais foram, possivelmente, introduzidas antes mesmo da colonização, quando corsários franceses abasteciam seus navios com pau-brasil, a partir da troca com os índios por espelhos, pentes, ferramentas e galinhas que sobravam de suas dispensas. O ponto em comum de ambos é que essas aves foram introduzidas no país por povos europeus (MESQUITA, 1970; FONTEQUE et al., 2014; CARVALHO, 2016).

Essas galinhas foram soltas em quintas e fazendas em todas as regiões do Brasil. Então, houve cruzamentos aleatórios entre esses grupos genéticos durante

séculos e, com isso, surgiram as raças de galinhas nativas brasileiras. Estas aves são criadas, principalmente, por pequenos agricultores e têm um papel muito importante para a agricultura familiar: são importantes fontes de alimento e renda para essas famílias. A cultura da criação doméstica desse tipo de animais em território nacional é realizada desde a colonização e se estende até os dias atuais (MESQUITA, 1970; CARVALHO, 2016).

Considera-se as galinhas caipiras tolerantes às condições edafoclimáticas do Brasil, menos susceptíveis a doenças e tolerantes à baixa oferta qualitativa e quantitativa de alimentos. Em geral, essas aves são criadas a campo, no sistema extensivo. Elas desenvolvem papéis relevantes na cultura brasileira, pois acompanham a migração humana desde a colonização (FONTEQUE et al., 2014; CARVALHO et al., 2016). Seus produtos (carne e ovos) são muito apreciados e têm valor financeiro diferenciado e atrativo, quando comparados a preços de produtos das aves especializadas. A galinha caipira possui características próprias de sabor e textura da carne e ovos que a destacam no mercado consumidor (TODANO; NISHIBORI; TSUDZUKI, 2009).

A promoção da produção de galinhas nativas fortalece a agricultura familiar, possibilitando a utilização sustentável e promovendo a conservação pelo seu uso. Criadas em sistema semelhante ao orgânico, essas aves tornaram-se potencialmente lucrativas. Isto porque a procura por alimentos, que tende à produção tradicional, teve relevante aumento desde a década de 1980. Por conta deste fator, tem sido crescente a valorização de galinhas nativas, o que aponta para necessidade de maior exploração produtiva e comercial dessas aves e de seus produtos (MORENG; AVENS, 1990; CARVALHO et al., 2015).

4. IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO DAS RAÇAS NATIVAS

A manutenção da diversidade genética dentro de espécies tem sido preocupação de pesquisadores e instituições em todo o mundo, uma vez que a variabilidade intrapopulacional está relacionada à adaptação gênica de cada raça dentro da espécie. A perda da diversidade genética acarreta prejuízos ao patrimônio genético de cada país, além de reduzir a quantidade de opções de combinações gênicas a serem usadas no desenvolvimento de produtos especializados de origem animal (linhagens e híbridos) para alimentação da

crescente população mundial. Dada esta realidade, em 1993 a FAO lançou um programa internacional com o objetivo de salvaguardar e difundir a diversidade genética, catalogar os recursos de cada região, descobrir quais raças estão em perigo de extinção e arranjar soluções para contrariar a extinção (FAO, 2007).

Existem muitas raças de galinhas em todo o mundo que ainda não são catalogadas. Ainda assim, entre aquelas que são catalogadas, apenas 25% não correm risco de extinção; 41% estão classificadas como risco desconhecido; 31% sofrem algum risco de extinção; e 3% já foram oficialmente extintas da natureza (FAO, 2013), situação esta que precisa urgentemente ser revertida.

Contudo, um novo nicho de mercado tem se apresentado promissor: nos dias atuais, com o consumidor cada vez mais exigente, a certificação dos produtos é importante, porque os sistemas de produção que beneficiam o natural e tradicional são os preferidos de muitos consumidores. Neste contexto, as raças de galinhas nativas se inserem novamente, ressaltando mais uma vez a importância de conservá-las, pois esses materiais genéticos são utilizados nesses sistemas de produção (FAO, 2007). Estudos genéticos são essenciais para mensurar a diversidade dessas aves. Essas investigações são respaldadas com a caracterização genética que, por sua vez, é baseada em marcadores moleculares. Esses métodos de trabalhos são primordiais como ferramentas de conservação de aves nativas.

5. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

Raças nativas são aquelas que se formaram em um determinado país, mas tiveram suas bases genéticas oriundas de outros países (ALMEIDA, 2007). Programas mundiais de conservação de Recursos Genéticos Animais (RGA) têm sido desenvolvidos com base na preocupação pela perda da diversidade genética devido à extinção de raças e populações. A FAO tem sido uma das principais incentivadoras de tais ações no mundo. De acordo com a FAO (1998), elementos importantes nos programas nacionais de conservação incluem o inventário, a caracterização e a documentação dos dados obtidos.

A perda alélica dentro das raças, causada pela constante introdução de raças exóticas nas populações nativas, bem como a pressão de seleção sobre animais de genética superior, têm causado erosão genética nesses animais, sem

que haja reposição dos alelos que estão sendo perdidos. Como consequência direta de tais ações, a variação genética, representada por diferenças entre raças, linhagens ou populações, é perdida e não pode ser facilmente regenerada. Entretanto, nos dias atuais existe uma conscientização sobre a importância das raças domésticas na biodiversidade mundial, devido aos genes e combinações gênicas que estes possuem e que poderão ser úteis para a agropecuária no futuro (BARKER, 1994; EGITO, 2007).

A caracterização genética de galinhas nativas vem sendo feita por países como Espanha, Índia e Peru, com o objetivo de evitar a perda desse importante material genético. Segundo a FAO (2010), em todo o mundo existem 1.491 raças em perigo de extinção, sendo esse índice referente apenas a raças catalogadas. Porém, apenas 25% das raças de galinhas nativas fazem parte de algum tipo de programa de conservação. Logo, são necessárias pesquisas que ajudem a elucidar sobre a genética destas raças (CLEMENTINO, 2010; CARVALHO et al., 2016).

A investigação da variabilidade é relevante para os grupos de conservação de recursos genéticos, bem como para os programas de melhoramento. A variabilidade genética mede a variação de diferentes alelos do mesmo gene, em uma determinada população. A mensuração da variabilidade genética é relevante porque esta se encontra diretamente relacionada com a manutenção da variabilidade inter-racial, o que evita a extinção de raças e a erosão genética (CARVALHO et al., 2018).

6. IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA DAS GALINHAS NATIVAS

Concretizada principalmente por pequenos produtores, a criação de galinhas caipiras nativas é uma atividade antiga e realizada em todo o mundo. Neste contexto, as raças nativas de galinhas desempenham papel relevante na agricultura familiar, pois são fontes de alimento e de renda para esses grupos. Isto porque essas famílias comercializam o excedente de sua produção (carne ovos), que tem valor agregado conforme a forma como as aves são criadas (sistema tradicional a campo) (FONTEQUE et al., 2014; CARVALHO et al., 2016).

A criação de galinhas tem sido uma das atividades que fixam o homem ao campo, reduzindo assim o êxodo rural. Essa atividade é rentável e faz parte da

cultura dos agricultores familiares, à medida que vem passando de geração em geração, até chegar aos dias atuais. Com uso de instrumentações produtivas, a criação de galinhas tem se tornado ainda mais lucrativa e atrativa para os pequenos agricultores. Isto representa um fator fundamental que deve ser ainda mais estimulado (CARVALHO, 2016).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As raças nativas de galinhas caipiras desempenham papel primordial para os agricultores familiares. A criação dessas aves no sistema tradicional é considerada uma atividade antiga que corresponde, principalmente, a esse tipo de produtor (isto é, os pequenos e familiares) e é fonte de alimento e renda para essas famílias. Advém daí, então, a relevância histórico-cultural e econômica das raças nativas de galinhas caipiras para o desenvolvimento agropecuário.

As raças de galinhas nativas são consideradas patrimônio genético nacional. Estas aves apresentam características de rusticidade e são adaptáveis às condições de ambiente dos países nos quais surgiram. Esses animais são detentores de elevada variabilidade genética, podendo ser utilizados no desenvolvimento de novas linhagens especializadas no futuro. A perda de uma raça nativa implica em perda de um patrimônio genético. Logo, se deve promover a conservação dessas raças através de sua utilização como forma de salvaguardar a história, a genética e o patrimônio nacional.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M.J.O. **Caracterização de caprinos da raça Marota no Brasil.** 2007. 150f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia - PA, 2007.
- BARKER, J.S.F. **A global protocol for determining genetic distance among domestic livestock breeds.** *In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Proceedings.* Guelph - Canadá, p.501-508, 1994.
- CARVALHO, D.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de galinhas nativas Canelas-Preta.** 2016.71p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia,

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina - MG, 2016.

CARVALHO, D.A. et al. **Caracterização Fenotípica de galinhas caipiras comercializadas como nativas no Ceasa de Teresina-PI.** In: Simpósio internacional de raças nativas, 2015. Anais.Teresina - PI, 2015.

CARVALHO, D.A. et al. **Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas caipiras Canela-Preta no Estado do Piauí.** 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.4, p.1275-1281, 2018.

CLAUER, P. **Poultry**, 2016. Disponível em: <<http://extension.psu.edu/animals/poultry/topics/generaleducationalmaterial/teaching-chicken/history-of-the-chicken>>. Acesso em: 01 de julho de 2019.

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

DAMBRÓS JUNIOR, D. **A avicultura no Brasil.** EMBRAPA, 2010. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/cias/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=15>. Acesso em: 3 de dezembro de 2019.

DELACOUR, J. **The pheasants of the world.** 2. ed. Hindhead, Surrey: Spur Publications, 1997.

DGAV, Direção Geral da Agricultura e Veterinária. **Raças autóctones portuguesas.** Lisboa: 2013.

EGITO, A.A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação.** 2007. 232p. Tese (Doutorado) - Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Primary guidelines for development of national farm genetic resources management plans**, 1998. Disponível

em:<<https://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/primery.pdf>>. Acesso em: 01 de julho de 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -
FAO. **Guidelines for development of national management of farm animal genetic resources plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): recommended microsatellite markers**. Rome, Italy, 2004.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -
FAO. **The global plan of action for animal genetic resources and the interlaken declaration**, Suíça, 2007. Disponível em:
em:<<http://www.fao.org/docrep/010/a1404e/a1404e00.htm>>. Acesso em: 02 de julho de 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -
FAO. **La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la Agricultura**, 2010. Disponível em:
<<http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>>. Acesso em: 01 de julho de 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -
FAO. **Status and trends of Animal Genetics Resources**. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Fourteenth Regular Session, 15-19 abr. 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.

GUIMARÃES, D.D. et al. **Suinocultura: estrutura da cadeia produtiva, panorama do setor no Brasil e no mundo e o apoio do BNDES**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n.45, p.85-136, 2017.

HIRST, K.K. **Chicken domestication in America: the latest info**, 2014. Disponível em:
<http://archaeology.about.com/od/domestications/qt/chicken_2.htm>. Acesso em: 01 de julho de 2019.

HOFFMANN, I. **The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources**. World's Poultry Science Journal, v.65, p.286-535, 2009.

MARIANTE, A.S. et al. **Managing genetic diversity and society needs.** Revista Brasileira de Zootecnia, v.37, p.127-136, 2008.

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

MOISEYEVA, I.G. et al. **Evolutionary relationships of Red Jungle Fowl and chicken breeds.** Genetics Selection Evolution, v.35, p.403-423, 2003.

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

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.

CAPÍTULO 2

Parâmetros genéticos populacionais aplicados na caracterização e conservação de raças nativas

PARÂMETROS GENÉTICOS POPULACIONAIS APLICADOS NA CARACTERIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE RAÇAS NATIVAS

RESUMO: A caracterização genética populacional de uma raça é relevante para programas de conservação, pois permite conhecer a diferenciação genética entre indivíduos da mesma raça e entre indivíduos de demais raças da mesma espécie. Ainda são poucos os estudos populacionais com raças de galinhas nativas. Dado o exposto, objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica quanto aos conceitos e os parâmetros comumente utilizados em investigações de genética populacional aplicados à conservação e à caracterização de raças nativas, com o intuito de direcionar futuros estudos nessa temática com galinhas caipiras.

PALAVRAS-CHAVE: *Gallus gallus*. Galinhas Caipiras. Genética de Populações. Microsatélites. Variabilidade Genética.

POPULATION GENETIC PARAMETERS APPLIED TO THE CHARACTERIZATION AND CONSERVATION OF NATIVE BREEDS

ABSTRACT: The population genetic characterization of a breed is relevant for conservation programs, as it allows knowing the genetic differentiation between individuals of the same breed and between individuals of other breeds of the same species. There are still few population studies with native chicken breeds. Given the above, the objective we aimed to carry out a bibliographic review of the concepts and parameters commonly used in investigations of population genetics applied to the conservation and characterization of native breeds, in order to direct future studies on this topic.

KEYWORDS: *Gallus gallus*. Free-range Chickens. Population Genetics. Microsatellites. Genetic Variability.

1. INTRODUÇÃO

A investigação da diversidade genética de uma determinada população (raça) se dá basicamente por dois princípios: quantificação dos níveis de variabilidade dentro das populações e caracterização do nível de estruturação genética entre populações. O estudo genético populacional de raças nativas é necessário para a caracterização genética da raça e serve como padrão para a diferenciação genética da raça caracterizada das demais raças da mesma espécie (JIMENEZ; COLLADA, 2000; FRAKHAM et al., 2002; CAMACHO, 2016).

Investigações genéticas das raças nativas de galinhas têm sido estimuladas por várias instituições em todo o mundo. Um exemplo é a FAO, que é uma das principais idealizadoras globais de tais ações. Os diversos tipos de marcadores moleculares têm sido utilizados para fins de caracterização genética e estudos de diversidade genética intra e interpopulacionais de várias raças nativas de diversas espécies. Para a espécie *Gallus gallus*, por exemplo, pesquisadores de países como Espanha, Brasil, Egito, Itália e Equador têm feito uso dessas ferramentas moleculares e de parâmetros populacionais para caracterizarem suas raças nativas. Estas informações são primordiais para projetos de conservação de recursos genéticos (FAO, 2010; CECCOBELLI et al., 2013; CARVALHO et al., 2016; OSMAN; YONEZAWA; NISHIBORI, 2016; MACRI et al., 2019; TOALOMBO VARGAS et al., 2019).

Apesar desses avanços, os estudos de caracterização populacional de raças de galinhas nativas ainda são poucos (CARVALHO et al., 2016). Mas, com o despertar das instituições de pesquisas, a exemplo do Brasil, quanto à relevância desse tipo de investigação, torna-se necessária a fixação dos conceitos populacionais, bem como dos parâmetros usualmente utilizados em tais tipos de pesquisas. Dado o exposto, este estudo objetivou realizar uma revisão quanto aos conceitos e os parâmetros comumente utilizados em investigações de genética populacional aplicados à conservação e à caracterização de raças nativas, com o intuito de direcionar futuros estudos nesta temática.

2. DIVERSIDADE GENÉTICA

Diversidade genética pode ser definida como a variedade de genótipos e alelos presentes em uma determinada população. Esta variedade se reflete em distintas características morfológicas, fisiológicas e de comportamento entre os indivíduos e as populações. A mensuração da diversidade populacional pode ocorrer em três níveis: a) diversidade dentro das populações; b) entre populações; e c) entre as espécies. A diversidade genética é imprescindível para a evolução adaptativa da espécie (JIMENEZ; COLLADA, 2000; FRAKHAM et al., 2002).

A variabilidade genética entre espécies ou raças é promovida por mutação espontânea ou induzida, recombinação genética e/ou migração. Vários fatores podem interferir na distribuição da variabilidade genética de cada espécie, tais como: tamanho da população, sistema de reprodução e fluxo gênico. As populações nativas se caracterizam por possuírem alta variabilidade genética, em decorrência de eventos evolutivos como mutação e migração. Esta particularidade, entretanto, pode ser perdida por eventos como deriva genética e endocruzamento (MORAND et al., 2002; CAMACHO, 2016).

Os parâmetros populacionais mais utilizados para estimar a diversidade genética de populações são: Heterozigosidade observada (H_o); Heterozigosidade esperada (H_e); Riqueza alélica (A_R); e Porcentagem de *loci* polimórficos (P). A comparação entre H_o e H_e auxilia na estimativa da estrutura genética de populações (NEI, 1987). A riqueza alélica concentra-se na estimação da diversidade de alelos e o polimorfismo na diversidade de genes ou *loci*. A interpretação dos parâmetros citados acima aplicados à determinada raça permite compreender as relações entre os indivíduos (por exemplo, proximidade genética), além de possibilitar o reconhecimento da existência ou não de fatores como mutação, seleção e migração na população de animais analisada. Esse procedimento serve de base para o direcionamento do manejo genético dos rebanhos, que é uma ação relevante para programas de conservação de recursos genéticos.

3. ESTRUTURA GENÉTICA

O estudo da estrutura genética de populações é relevante para o entendimento dos processos evolutivos, uma vez que permite estimar a função do fluxo gênico, da seleção natural e da evolução não adaptativa, e a maneira como

estes parâmetros afetam as frequências alélicas das populações. Estrutura genética é conceituada como o arranjo genético que caracteriza uma população, ou seja, a distribuição não casual dos alelos e genótipos no espaço e tempo resultante das ações conjuntas das forças evolutivas. A correlação de fatores ecológicos e evolutivos determina a estrutura genética de uma espécie (CAMACHO, 2016).

A estimação das diversidades intra e inter-populacional permite avaliar como está distribuída e estruturada a variabilidade genética em populações. Estas estimativas permitem determinar a existência de diferenças significativas na composição genética de distintas populações de uma espécie e descrever o nível de diferenciação entre estas através de índice de distância ou fixação. A determinação dessas estruturas é realizada a partir do uso de marcadores moleculares (GODOY, 2009).

Sabe-se que a presença de variabilidade genética dentro de uma espécie a qualifica para que esta responda às pressões de ambiente, evolua e sobreviva ao longo do tempo. A estimativa da variabilidade genética baseia-se no modelo clássico do princípio de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Este modelo parte do pressuposto de que, em uma população infinita, na qual os acasalamentos ocorrem ao acaso e não há ação de nenhum fator evolutivo (mutação, migração e seleção), a composição gênica do grupo se manterá em equilíbrio ao longo das gerações.

No entanto, desvios das proporções esperadas pelo EHW significam que alguma das primícias anteriores foi violada. O conhecimento da diversidade genética, bem como da estrutura das populações de galinhas, são imprescindíveis tanto para a conservação *in situ* ou *ex situ* como para estabelecer formas de produção sustentável (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2002; HEDRICK, 2011).

4. MARCADORES DE DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

A utilização de marcadores moleculares tem contribuído de forma relevante no avanço das pesquisas populacionais, uma vez que as informações promovidas a partir desses marcadores poderão, junto com informações fenotípicas, contribuir com as diretrizes para programas de conservação e melhoramento genético (CARVALHO, 2016).

Para estudos de domesticação, ou seja, para identificar os prováveis ancestrais selvagens (filogenia), o número de linhagens maternas na população em estudo e sua origem geográfica, o marcador molecular mais utilizado é o DNA mitocondrial (mtDNA). O mtDNA é formado por uma fita simples de DNA circular e assemelha-se a um plasmídeo - possui menos que 20kb na maioria das espécies de produção e está localizado no citoplasma celular, dentro da mitocôndria (organela celular responsável pela produção de energia) (BRUFORD et al., 2003; EGITO, 2007).

O mtDNA possui três principais características relevantes para estudos de domesticação: a) conservado evolutivamente o suficiente para permitir a identificação da população ancestral que deu origem a população em estudo; b) variável e estruturado geograficamente de forma a permitir a localização aproximada do ponto de domesticação; e c) sua evolução é rápida e em uma taxa constante, o que permite a adaptação da origem de determinado polimorfismo (BRUFORD et al., 2003).

Vários pesquisadores em todo o mundo têm feito uso do marcador mtDNA para estudos evolutivos em galinhas nativas, a fim de traçar a possível filogenia dessas aves. Kanginakudru et al. (2008) estudaram a filogenia de galinhas Indianas; Ceccobelli et al. (2013) estudaram galinhas da Itália; Englund, Strömstedt e Johansson (2014) estudaram raças de galinhas da Suécia; e Ceccobelli et al. (2015) pesquisaram raças de galinhas do Mediterrâneo.

Estudos filogenéticos a partir de informações mitocondriais são possíveis a partir da técnica de sequenciamento. O sequenciamento do DNA é um aglomerado de processos bioquímicos que tem por finalidade determinar a ordem dos nucleotídeos (adenina, guanina, citosina e timina) em uma amostra de DNA. A técnica de sequenciamento do DNA teve início na década de 1970.

Contudo, foi a partir da década de 1980 que essa técnica passou por um importante avanço, com o desenvolvimento da “técnica de desoxi”, também conhecida como terminadores de cadeia ou Sanger, que ainda é bastante utilizada. Entretanto, mais recentemente, foram desenvolvidas novas técnicas, como sequenciamento de nova geração. Desde então, novos métodos têm sido lançados para estudos genômicos e têm contribuído muito para avanços das pesquisas científicas (PEREIRA et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

5. MARCADORES MICROSSATÉLITES

Os marcadores moleculares do tipo microssatélites são estáveis e de herança codominante, possuem alto nível polimórfico e são eficazes em estudos populacionais. Microssatélites são sequências repetitivas de um a seis nucleotídeos em Tandem, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR). Comumente, são repetições de mono (1 base), tetra (4 bases) ou, principalmente, dinucleotídeos (2 bases), que estão localizados entre genes ou dentro de íntrons. Essas sequências repetitivas são flanqueadas por sequências únicas (ENGEL et al., 1996), que podem ser utilizadas como localizadores.

Os marcadores microssatélites apresentam várias vantagens, pois são codominantes, multi-alélicos, altamente reprodutíveis, com elevada resolução e alto grau de polimorfismo. Além disso, esses marcadores apresentam herança mendeliana simples e sua detecção tem como base a reação de PCR (*Polymerase chain reaction*) (JIMENEZ; COLLADA, 2000).

Instituições e pesquisadores de todo o mundo têm feito uso dos marcadores microssatélites em suas pesquisas. Em 1995, a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), juntamente com a Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG), reuniram-se e formaram equipes para elaborarem diretrizes e recomendações técnicas para a avaliação da diversidade genética em raças de animais domésticos. Esta iniciativa foi idealizada através do projeto *Measurement of Domestic Animal Diversity* (MoDAD) (http://www.fao.org/dad_is) e selecionou uma lista de *loci* de microssatélites para estudos de diversidade genética. Posteriormente, em 2010, a lista foi ampliada com inclusão de novos marcadores (FAO, 2011).

O marcador molecular microssatélite tem sido amplamente utilizado em pesquisas na espécie *Gallus gallus*, em vários países, principalmente para estudos de caracterização e diversidade genética dessas aves. Como exemplo, é possível citar Cuc et al.(2010), que estudaram a caracterização genética de galinhas do Vietnã; Bianchi et al. (2011), que pesquisaram a diversidade de duas raças de galinhas italianas; Ceccobeli et al. (2015), que analisaram a diversidade genética de dezesseis raças de galinhas do Mediterrâneo; Fonteque et al. (2014), que realizaram a caracterização genética de galinhas brasileiras que põem ovos azuis; Carvalho et al. (2016), que caracterizaram geneticamente galinhas da raça

brasileira Canela-Preta; e Soltan et al. (2018), que investigaram a estrutura genética de galinhas nativas do Egito.

Os parâmetros populacionais são essenciais para estudos de caracterização de diversidade genética de raças de galinhas nativas. Para tais estudos, faz-se uso, principalmente, dos marcadores moleculares. Esses estudos são básicos para conhecer a genética de uma raça; isto respalda e valoriza as raças nativas, ao mesmo tempo em que fortalece e apoia os programas de conservação de recursos genéticos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para conhecimento genético de uma população nativa, investiga-se a sua variabilidade e estrutura genética que, por sua vez, são estimados a partir de parâmetros populacionais como heterozigosidade observada, heterozigosidade esperada, riqueza alélica e porcentagem de *loci* polimórficos.

Para investigação de tais parâmetros na caracterização de raça, faz-se uso, principalmente, dos marcadores moleculares microssatélites e do DNA mitocondrial.

REFERÊNCIAS

BIANCHI, M. et al. **Microsatellites based survey on the genetic structure of two Italian local chicken breeds**. Italian Journal of Animal Science, v.10, n.3, 2011.

BRUFORD, M.W.; BRADLEY, D.G.; LUIKART, G. **DNA markers reveal the complexity of livestock domestication**. Nature Reviews Genetics, v.4, n.11, p.900-910, 2003.

CAMACHO, L.M.D. **Desenvolvimento de marcadores microssatélites e caracterização da diversidade genética de populações de *Chrysolea Obovata* (Asteraceae)**. 2016. 128 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade vegetal e meio ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2016.

CARVALHO, D.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de galinhas nativas canelas-preta**. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia,

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina - MG, 2016.

CARVALHO, D.A. et al., **Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas caipiras Canela-Preta no Estado do Piauí**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.51, n.11, p.1899-1906, 2016.

CECCOBELLI, S. et al. **Phylogeny, genetic relationships and population structure of five Italian local chicken breeds**. Italian Journal of Animal Science, v.12, n.3, 2013.

CECCOBELLI, S. et al. **Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA**. Livestock Science, v.175, p.27-36, 2015.

CUC, N.T.K. et al. **Assessing genetic diversity of Vietnamese local chicken breeds using microsatellites**. Animal Genetics, v.41, n.5, p.545-547, 2010.

EGITO, A.A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. 2007. 232 p. Tese (Doutorado), Universidade de Brasília, Brasília - DF, 2007.

ENGEL, S.T. et al. **Conservation of microsatellite loci across species of artiodactyls: implications for population studies**. Journal of Mammalogy, v.77, n.2, p.504-518, 1996.

ENGLUND, T.; STRÖMSTEDT, L.; JOHANSSON, A.M. **Relatedness and diversity of nine Swedish local chicken breeds as indicated by their tDNAD-loop**. Hereditas, v.151, n.6, p.229-233, 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la Agricultura**, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/a1250s/a1250s00.htm>>. Acesso em: 01 de julho de 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Molecular genetic characterization of animal genetic resources. Animal Production and Health Guidelines**. Rome, n.9, 2011.

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.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge University Press, 2002.

GODOY, J.A. **La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies**. Revista Ecosistemas, v.18, n.1, 2009.

HEDRICK, P.W. **Genetics of Populations**. Jones & Bartlett Publishers. 675 p. 2011.

JIMÉNEZ, P.; COLLADA, C. **Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso em los programas de conservación**. Forest Systems, v.9, n.4, p.237-248, 2000.

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

MACRI, M. et al. **Diversidad genética de la raza Gallina Utrerana**. Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, v.13, p.52-59, 2019.

MORAND, M.E. et al. **A generalized heterozygote deficiency assessed with microsatellites in French common ash populations**. Molecular Ecology, v.11, n.3, p.377-385, 2002.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987.

OSMAN, S.A.; YONEZAWA, T.; NISHIBORI, M. **Origin and genetic diversity of Egyptian native chickens based on complete sequence of mitochondrial DNA D-loop region**. Poultry Science, v.95, n.6, p.1248-1256, 2016.

PEREIRA, G.L. et al. **Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária**. Ars Veterinária, v.29, n.3, p.190-199, 2013.

SANTOS, W.F. et al. **Sequenciamento de DNA: métodos e aplicações**. Proceedings of Safety, Health and Environment World Congress, v.13, p.139-141, 2013.

SOLTAN, M.E. et al. **Genetic structure and bottleneck exploring of Sinai chickens indigenous to Egypt.** Egyptian Poultry Science Journal, v.38, n.2, 2018.

TOALOMBO VARGAS, P.A. et al. **Deciphering the patterns of genetic admixture and diversity in the Ecuadorian Creole chicken.** Animals, v.9, n.9, 670, 2019.

CAPÍTULO 3

Raças nativas de galinhas do Brasil e países da Península Ibérica

RAÇAS NATIVAS DE GALINHAS DO BRASIL E PAÍSES DA PENÍNSULA IBÉRICA

RESUMO: As raças nativas de galinhas são importantes para a conservação de recursos genéticos de cada país. Os recursos genéticos nativos, por sua vez, são considerados patrimônios de cada nação. Os países da Península Ibérica (Portugal e Espanha) atuaram na colonização do Brasil. Dada a relação histórica dos países Brasil, Portugal e Espanha, objetivou-se fazer uma breve descrição, baseada na literatura, sobre algumas de suas raças de galinhas nativas, como forma de ressaltar a importância da diversidade genética das raças de galinhas. Os países estudados possuem diversas raças de galinhas que apontam a riqueza genética da espécie *Gallus gallus* nesses territórios.

PALAVRAS-CHAVE: Caipira. Diversidade. *Gallus gallus*. Recursos Genéticos.

NATIVE BREEDS OF CHICKENS FROM BRAZIL AND COUNTRIES FROM THE IBERIAN PENINSULA

ABSTRACT: Native chicken breeds are important for the conservation of genetic resources in each country. Native genetic resources, in turn, are considered heritage of each nation. The countries of the Iberian Peninsula (Portugal and Spain) acted in the colonization of Brazil. Given the historical relationship of Brazil, Portugal and Spain, we aimed to make a brief description based on the literature, about some of the native chicken breeds of these countries, in order to emphasize the importance of the genetic diversity of the chicken breeds. The countries studied have several chicken breeds that show the genetic richness of the *Gallus gallus* species in these territories.

KEY WORDS: Free-range. Diversity. *Gallus gallus*. Genetic Resources.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a espécie de galinhas (*Gallus gallus*) é naturalizada, pois essas aves não existiam em território nacional até, possivelmente, o advento da colonização. Contudo, existem muitas raças nativas, uma vez que, a partir dos animais trazidos pelos colonizadores espanhóis, as aves se adaptaram, cruzaram aleatoriamente e sofreram seleção natural por séculos. Assim, esses animais foram desenvolvendo novas combinações gênicas e genotípicas que promoveram o aparecimento das características comportamentais, produtivas e reprodutivas específicas de aves encontradas apenas no Brasil, formando, assim, as raças nativas brasileiras (ALBINO et al., 2001; CARVALHO, 2016).

Sierra Alfranca (2001) define o termo raça como conceito técnico-científico, identificador e diferenciador de um grupo de animais através de certo número de características (morfológicas, produtivas, psicológicas, adaptativas, dentre outras) que são transmissíveis à prole, mantendo, além disso, alguma variabilidade e dinâmica evolutiva. No Brasil, sabe-se que existe número expressivo de raças de galinhas consideradas nativas. Contudo, não se tem catalogado o quantitativo dessas raças e ainda são poucos os trabalhos sobre essas aves (CARVALHO et al., 2016).

As raças de galinhas atualmente criadas no Brasil podem ser classificadas de duas formas, de acordo com sua origem: nativas ou exóticas. Neste caso, o termo “nativa” também pode ser substituído por “local” ou “autóctone”. Estas aves também são conhecidas como “galinhas caipiras”, “galinhas de terreiro”, “galinhas pé seco” e “galinhas capoeira”. O termo “exótica” é utilizado para denominar as raças comerciais que foram importadas a partir do século XX.

As raças nativas de galinhas são importantes para a conservação de recursos genéticos de cada país. Portugal, principal colonizador do Brasil, tem suas raças de galinhas em programas de conservação. A Espanha, por sua vez, também possui conhecimento e estudos de suas raças nativas de galinhas: estas são catalogadas e, em sua maioria, reconhecidas pelo Ministério de Agricultura Pesca e Alimentação (MAPA) da Espanha. No Brasil, existem programas de conservação de algumas raças de diferentes espécies e tem-se discutido bastante essa temática, mas ainda há muito a ser feito. Poucas raças brasileiras estão em

conservação, dado o quantitativo histórico de raças existentes (DGAV, 2013; CARVALHO et al., 2016; CARVALHO et al., 2017; MAPA, 2019).

É importante ressaltar que o Brasil ainda não possui nenhuma raça de galinha reconhecida oficialmente pelo MAPA. Isto se dá devido à ausência de legislação brasileira específica para reconhecimento de raças de aves em geral (MAPA, 2014).

O que dá respaldo às raças no Brasil são fatores como o conceito de raça, o reconhecimento dos produtores e técnicos, e o apoio das pesquisas científicas. Logo, para reconhecimento oficial das raças de galinhas nacionais junto ao MAPA, necessita-se de mudança na legislação, que é um processo que demanda vários anos para seu ajuste. Contudo, aos poucos o Brasil vem despertando quanto à importância de suas legítimas raças nativas. Este crescente interesse e a relação histórica entre Brasil, Portugal e Espanha serviram de base para o presente estudo, cujo objetivo é fazer uma breve descrição, baseada na literatura, sobre algumas das raças de galinhas nativas brasileiras, como forma de ressaltar a importância da diversidade genética das raças de galinhas.

2. RAÇAS DE GALINHAS DO BRASIL E DA PENÍNSULA IBÉRICA

A seguir, serão brevemente descritas 16 raças de galinhas de Brasil, Portugal e Espanha incluídas nesta investigação.

2.1 Raças brasileiras

Como mencionado anteriormente, existem, historicamente, muitas raças de galinhas no Brasil: “Carijó”, “Pescoço pelado”, “Pedrês”, “Rabo de Leque”, “Sura”, “Canela-Preta”, “Barbuda”, “Peloco”, “Frisada”, “Caneluda do Catolé” “Perna curta”, dentre outras. Segundo a classificação da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO, 2013), essas aves mencionadas estão classificadas como risco desconhecido de extinção, são pouco estudadas e não são catalogadas, o que dificulta a quantificação de seu efetivo.

2.1.1 Galinhas da Raça Canela-Preta

As galinhas da raça Canela-Preta são encontradas no estado do Piauí e, possivelmente, em outros estados da região Nordeste do Brasil. Esta raça é criada, principalmente, por pequenos agricultores familiares e comunidades tradicionais (indígenas e quilombolas). As galinhas da raça Canela-Preta são conhecidas por possuírem carne de coloração diferenciada quando comparadas às demais galinhas caipiras. Essas aves têm duplo propósito (produção de carne e ovos), são animais dóceis, de fácil manejo, com plumagem de coloração predominantemente preta, podendo haver chuvilhamento na região do pescoço nas cores branca e dourado (no caso das fêmeas) e branco, prata e vermelho (no caso dos machos) (Figura 1). Esse chuvilhamento pode se estender em toda a plumagem das aves (CARVALHO et al., 2017).



Figura 1. Galinhas caipiras da raça Canela-Preta (Fonte: Marcos Jacob de O. Almeida)

2.1.2 Galinhas da raça Peloco

As aves desta raça são encontradas em pequenas propriedades rurais e são remanescentes de quilombo e criações caseiras na Chapada Diamantina e nas regiões Sudoeste, Sul e Extremo Sul da Bahia. A raça Peloco caracteriza-se pelo empenamento tardio na fase de crescimento, motivo pelo qual também são conhecidas como “Pelado”. Quando ainda jovens, apresentam penas arrepiadas. A plumagem desses animais possui cores variadas e esta raça apresenta aspecto de aves ornamentais (ALMEIDA, 2016) (Figura 2).



Figura 2. Galinhas da raça Peloco (Foto: Ronaldo Vasconcelos F. Filho)

2.1.3 Galinhas da raça Caneluda do Catolé

As galinhas da raça Caneluda do Catolé, também conhecida como Caneludas, são aves que ainda estão em processo inicial de caracterização fenotípica. Portanto, estes animais possuem pequeno número de matrizes e reprodutores e estão em um núcleo do setor de avicultura da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Esse grupo genético foi identificado, inicialmente, por um produtor local que atentou para a presença de aves robustas, pernaltas e de plumagem característica (penas negras e em tons cinza-azulado) (Figura 3) (ALMEIDA, 2016).



Figura 3. Galinhas da raça Caneluda do Catolé (Foto: Ronaldo Vasconcelos F. Filho)

2.2 Raças de galinhas de Portugal

Portugal apresenta quatro raças nativas de galinhas: Amarela, Branca, Pedrês Portuguesa e Preta Lusitânica. Todas essas raças encontram-se em risco de extinção, segundo a classificação da FAO. Essas quatro raças concentram-se, predominantemente, na região norte de Portugal. As quatro raças têm em comum

o modo de produção: em regime extensivo, com os animais em capoeiras e/ou ao ar livre, em pequenas produções familiares (DGAV, 2013; FAO, 2013).

2.2.1 Galinhas da raça Amarela

As galinhas da raça Amarela apresentam porte médio, com a plumagem de cor castanha alaranjada escura, em fundo amarelo palha; na cauda e na extremidade das asas apresentam uma cor negra, com reflexos azul-esverdeados (Figura 4). As fêmeas apresentam as mesmas características que os machos, ressaltando o dimorfismo sexual visível pelo tamanho e peso menores para a fêmea (DGAV, 2013).



Figura 4. Fêmea e Macho das Galinhas da raça Amarela

(Fonte: <http://www.galinhasalverca.pt/index.php/racas-portuguesas/amarelaportuguesa>)

2.2.2 Galinhas da raça Branca

A plumagem das galinhas da raça Branca é completamente branca (Figura 5). A cabeça é moderadamente grande, forte e robusta. O bico tem um tamanho médio a grande, ligeiramente encurvado. O peso do macho é compreendido entre 2,3-3,2 kg e da fêmea 1,5-2,3 kg. A fêmea apresenta as mesmas características que o macho, destacando o dimorfismo sexual visível pelo tamanho e peso menores para a fêmea (DGAV, 2013).



Figura 5. Galinhas da Raça Branca (Fonte: <http://www.galinhasalverca.pt/index.php/racas-portuguesas/branca-portuguesa>)

2.2.3 Galinhas da raça Preta Lusitânica

As galinhas raça Preta Lusitânica apresentam plumagem completamente preta, havendo a possibilidade de apresentar reflexos azul-esverdeados (Figura 6). As galinhas da raça Preta Lusitânica estão ligadas a tradições populares, desde práticas de bruxaria a práticas pagãs. O peso do macho é compreendido entre 2,5-2,9 kg e da fêmea 1,7-2,3 kg. Essa raça apresenta dimorfismo sexual (DGAV, 2013; CID, 2017).



Figura 6. Galinhas da raça Preta Lusitânica

(Fonte: <http://www.galinhasalverca.pt/index.php/racas-portuguesas/preta-lusitania>)

2.2.4 Galinhas da raça Pedrês Portuguesa

A plumagem das galinhas da raça Pedrês Portuguesa tem um aspecto mosqueado, matizado de cinzento-escuro em fundo branco, formando barras brancas e cinzentas descontínuas (Figura 7). O peso do macho é compreendido entre 2,6-3,0 kg e da fêmea 2,2-2,7 kg. A fêmea apresenta as mesmas

características que o macho, ressalta-se o dimorfismo sexual visível pelo tamanho e peso menores para a fêmea. A raça de galinhas Pedrês Portuguesa é muito apreciada em seu país, onde é considerada uma raça tradicional, existindo provérbios populares a comprová-lo: “Galinha Pedrês vale por três” e “Galinha Pedrês, não a mates nem a dê” (DGAV, 2013; CID, 2017).



Figura 7. Galinhas da raça Pedrês Portuguesa

(Fonte:<http://www.galinhasalverca.pt/index.php/racas-portuguesas/pedres-portuguesa>)

2.3 Raças de galinhas da Espanha

A Espanha possui várias raças de galinhas nativas, classificadas como galinhas ornamentais, de exposição ou produtivas, dentre elas: Andaluza Azul, Castellana Negra, Combatiente Español, Extremeña Azul, Ibicenca, Mallorca, Pita Pinta, Sureña e Utrerana Perdiz (MAPA, 2019).

2.3.1 Galinhas da raça Andaluza Azul

A raça Andaluza Azul encontra-se sob risco de extinção. As galinhas desta raça são encontradas na região de Andalucía, principalmente, nas cidades de Sevilla, Córdoba e núcleos importantes em Cádiz e Huelva. As aves dessa raça apresentam crista simples e orelhas brancas, e plumagem de cor cinza azulado, com bordas pretas em cada uma de suas penas (Figura 8). Os machos da raça possuem camadas de plumagem mais escura que as fêmeas. De porte médio, os machos pesam 2,9 a 3,5 kg e as fêmeas 2,2 a 2,8 kg (MAPA, 2019).



Figura 8. Galinhas da raça Andaluza Azul (Fonte: MAPA, 2019)

2.3.2 Galinhas da raça Castellana Negra

Difundida em toda Espanha, a raça Castellana Negra é rústica e se destaca pela produção de ovos com coloração da casca branca: cerca de 200 por ano, com peso médio de 60 gramas. Estas aves apresentam plumagem preta, com reflexos metálicos em algumas regiões do corpo e cauda (Figura 9). Os machos pesam em média 2,9 kg e as fêmeas 2,3 kg. Essa raça está em risco de extinção (MAPA, 2019).



Figura 9. Galinhas da raça Castellana Negra (Fonte: MAPA, 2019)

2.3.3 Galinhas da raça Combatiente Español

A galinha da raça Combatiente Español muito se assemelha fenotipicamente à *Gallus Bankiva* (galinhas selvagens, às quais se atribui maior contribuição nas aves domésticas da atualidade). A raça Combatiente Español é difundida em várias regiões da Espanha e muito utilizada para exportação. A

plumagem dessas aves é muito variada, com reflexos metálicos, cor predominantemente vermelha ou laranja forte, brilhante, que varia do preto ao branco, contendo todos os tons (Figura 10). Os machos têm o peito de cor preto brilhante e cauda larga de cor preta. Nas fêmeas predomina a cor marrom. Esta raça apresenta pequeno porte, sendo que os machos pesam entre 1,5 a 2 kg e as fêmeas 1 a 1,5 kg (MAPA, 2019).



Figura 10. Raça de galinhas Combatierte Español (Fonte: <https://gallinaselextremeno.jimdofree.com/otros-enlaces/razas-de-gallinas-esp%C3%B1olas/>)

2.3.4 Galinhas da raça Extremeña Azul

As galinhas da raça Extremeña Azul são encontradas, principalmente, na província de Bandajoz e em alguns núcleos na província de Cáceres. Os animais desta raça têm duplo potencial produtivo (carne e ovos) e apresentam plumagens que variam entre a cor azul (com borda) a branco sujo (com manchas de cor cinza ou preta) e preto (Figura 11). Os machos pesam entre 2,5 a 4,2 kg e as fêmeas 1,3 a 3,2kg. Essa raça também está em risco de extinção (MAPA, 2019).



Figura 11. Galinhas da raça Extremeña Azul (Fonte: <https://turisabor.es/content/se-reconoce-la-gallina-extreme%C3%B1a-azul-como-raza-de-ganado-de-esp%C3%B1a>)

2.3.5 Galinhas da raça Ibicenca

A área geográfica onde se encontra a raça de galinhas Ibicenca compreende a Ilha de Ibiza e, possivelmente, a Ilha de Formentera, território próximo que durante alguns anos foi dependente de Ibiza. Essas aves apresentam plumagem variada: preta prateada, preta marrom e preto barrado (Figura 12). As galinhas da raça Ibicenca possuem peso médio para machos 3,5 kg e para fêmeas 2,5 kg. Essa aves são de duplo propósito (carne e ovos) (GOIB, 2019).



Figura 12. Galinhas da raça Ibicenca (Fonte: <http://www.gallipedia.es/ibicenca/>)

2.3.6 Galinhas da raça Mallorquina

A raça de galinhas Mallorquina é originária da Ilha Mallorca e encontra-se em risco de extinção. Essas aves são muito utilizadas em exposições e possuem plumagem de coloração variada: morena com manto cor de palha, aperdizada, preta com manchas prateadas, preta barrada com machas prateadas (Figura 13). A cor do tarso e das patas é branca rosada. O peso dos machos é, em média, 2,8 kg e das fêmeas 2,0 kg. O peso dos ovos geralmente supera 53 gramas (MAPA, 2019).



Figura 13. Galinhas da raça Mallorquina (Fonte: <https://gallinaselextremeno.jimdofree.com/otros-enlaces/razas-de-gallinas-esp%C3%B1olas/>)

2.3.7 Galinhas da raça Pita Pinta

Originária da região de Astúrias, esta raça está em risco de extinção. As galinhas da raça Pita Pinta possuem variedades distintas de coloração de plumagem: preta com pontos brancos, laranja com pontos brancos, toda branca, toda preta ou preta com capa prateado ou dourado (Figura 14). O peso dos machos é, em média, 3,75 kg e das fêmeas 2,25 kg. Os ovos são de cor marrom claro (MAPA, 2019).



Figura 14. Galinhas da raça Pita Pinta (Fonte: <http://www.lapitapintaasturiana.com/patron-racial>)

2.3.8 Galinhas da raça Sureña

A raça de galinhas Sureña é originária da região de Andalucía. Esta raça também é conhecida como Andaluza Sureña. As aves apresentam colora o de plumagens distintas (Figura 15), com as seguintes variedades: Franciscana, Cinza, Preta, Branca Pura e Branca cinzenta. Essa raça possui peso médio para machos de 3,5 a 3,8 kg e para fêmeas 2,5 a 2,7 kg. Os ovos apresentam cor branca, com peso médio de 65 gramas. As fêmeas possuem cristas caídas para o lado, cobrindo o olho (JIMDO, 2019).



Figura 15. Galinhas da raça Sureña (JIMBO, 2019).

2.3.9 Galinhas da raça Utrerana

As galinhas da raça Utrerana são encontradas na região de Andalúcia, principalmente, nas cidades de Sevilla, Córdoba e, em menor quantidade, em Cádiz e Huelva. Esta raça está em risco de extinção. As aves da raça Utrerana apresentam plumagem de cores distintas (Figura 16), com quatro variedades: Utrerana Perdiz, Utrerana Preta, Utrerana Branca e Utrerana Franciscana. Essas galinhas produzem ovos com peso médio de 63 gramas (MAPA, 2019).



Figura 16. Galinhas da variedade Utrerana Perdiz (Fonte: <https://sevilla.cosasdecome.es/la-raza-la-gallina-utrerana-se-consolida-decima-feria/>)

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Brasil, Portugal e Espanha possuem diversas raças de galinhas que apontam a riqueza genética da espécie *Gallus gallus* nesses países.

Espanha e Portugal estão mais à frente quanto a projetos de conservação de suas raças nativas. O Brasil, recentemente, voltou-se para estudos com raças de galinhas nativas. Mesmo tendo obtido bons resultados, o país ainda tem muitos desafios a superar neste campo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ALBINO, L.F.T. et al. **Criação de Frango e Galinha Caipira** – Avicultura Alternativa. Viçosa - MG: Aprenda Fácil Editora, 2001.

ALMEIDA, E.C.J. **Caracterização fenotípica e produtiva de galinhas e patos no estado da Bahia**. 2016. 88p. Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador - BA, 2016.

CARVALHO, D.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de galinhas nativas canelas-preta**. 2016.71p. Dissertação (Mestrado) - Curso de Zootecnia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina - MG, 2016.

CARVALHO, D.A. et al., **Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas caipiras Canela-Preta no Estado do Piauí**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.51, n.11, p.1899-1906, 2016.

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.

CID, J.F.S. **Características físicas e químicas de ovos produzidos por galinhas de raças portuguesas**. 2017. Dissertação (Engenharia zootécnica/Produção animal), Lisboa - Portugal, 2017.

DGAV, Direção Geral da Agricultura e Veterinária. **Raças autóctones portuguesas**. Lisboa: 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Status and trends of Animal Genetics Resources**. Rome: Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture. Fourteenth Regular Session, 15-19 abr. 2013.

GOIB. **Razas autóctonas de las Illes Balears**. Disponível em: <http://www.caib.es/sites/racesautoctones/es/gallina_de_mallorca-4055/>. Acesso em: 1 de julho de 2019.

JIMDO. **Razas de gallinas Españolas**, 2019. Disponível em: <<https://gallinaselextremeno.jimdo.com/otros-enlaces/razas-de-gallinas-esp%C3%B1olas/>>. Acesso em: 2 de julho de 2020.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PESCA E ALIMENTAÇÃO – MAPA, Brasil. **Define as espécies consideradas de interesse zootécnico e econômico para efeito de registro genealógico dos animais domésticos**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/acoes-e-programas/cartas-de-servico/desenvolvimento-agropecuario-cooperativismo-e-associativismo-rural/documentos/IN2102072014.pdf/view>>. Acesso em: 06 de fevereiro de 2020.

MINISTÉRIO DE AGRICULTURA PESCA E ALIMENTAÇÃO – MAPA, Espanha. **Catálogo oficial de razas**. Disponível em: <<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razasganaderas/razas/catalogo/>>. Acesso em: 2 de julho de 2019.

SIERRA ALFRANCA, I. **El Concepto de Raza: evolución y realidad**. Archivos de Zootecnia, v.50, p.547-564, 2001.

CAPÍTULO 4

Diferenciação genética entre galinhas de raças brasileiras, exóticas e linhagem industrial

Genetic differentiation between chickens from Brazil, exotic and industrial strain

Abstract - In this study, we aimed to compare the genetic structure of three Brazilian chicken breeds to exotic genetic groups and an industrial strain, using microsatellite markers. A total of 196 samples of the following genetic groups were used for the analyses: Canela-Preta (Piauí/Brazil, n = 40); Caneluda do Catolé (Bahia/Brazil, n = 30); Peloco (Bahia/Brazil, n = 30); Pesadão (France, n = 30); Leghorn (Italy, n = 40); and Cornish (United Kingdom, n = 26). A total of 25 microsatellite markers were used. Different statistical parameters were used to estimate the genetic diversity and relationship among breeds. Our results indicate that the populations studied tend to heterozygosity and the breeds have genetic variability. Based on the Wright's F statistics, we verified that the birds in study formed genetic subgroups equivalent to their own breeds and with high genetic differentiation. The three Brazilian breeds were clustered in two distinct groups: Canela-Preta breed (group 1); and Caneluda do Catolé and Peloco (group 2). The three exotic groups have also formed two groups: Leghorn (group 3); and Cornish and Pesadão (group 4). The Brazilian breeds in study are pure, conserved, without mixture with exotic/industrial genetic materials. This demonstrates pureness of the genetic material evaluated of most of the animals of the breeds investigated and indicates the need for more valuation, as well as more studies that establish the genetic potential of these birds, as this study indicates that these genetic materials are rich and distinct. The Brazilian breeds in study are Hardy-Weinberg equilibrium and show high intra-breed genetic variability, which is a trait of genetically conserved native breeds.

Index terms: diversity, free-range, *Gallus gallus*, genetic resources, microsatellites.

Diferenciação genética entre galinhas de raças brasileiras, exóticas e linhagem industrial

Resumo - Neste estudo, objetivamos comparar a estrutura genética de três raças brasileiras de galinhas a grupos genéticos exóticos e uma linhagem industrial, com uso de marcadores microssatélites. Um total de 196 amostras dos seguintes grupos genéticos foi utilizado para execução das análises experimentais: Canela-Preta (Piauí/Brasil, n = 40); Caneluda do Catolé (Bahia/Brasil, n = 30); Peloco (Bahia/Brasil, n = 30); Pesadão (França, n = 30); Leghorn (Itália, n = 40); e Cornish (Reino Unido, n = 26). Utilizou-se um total de 25 marcadores microssatélites. Diferentes parâmetros estatísticos foram utilizados para estimar a diversidade genética e relacionamento entre as raças. Nossos resultados mostram que as populações em estudo tendem à heterozigose e que as raças possuem variabilidade genética. Com base nas estatísticas F de Wright, verificou-se que as aves estudadas formaram subgrupos genéticos com equivalência a suas respectivas raças e com elevada diferenciação genética. As três raças brasileiras se agruparam em dois grupos distintos, um formado por Canela-Preta e o outro formado por Caneluda do Catolé e Peloco. O três grupos exóticos avaliados também formaram dois grupos, um constituído por Leghorn e outro por Cornish e Pesadão. As raças brasileiras em estudo apresentam material genético puro, conservado, sem mistura com material genético exótico e/ou industrial. Isto demonstra pureza do material genético avaliado da grande maioria dos animais das raças investigadas e fortalece a necessidade de maior valorização, assim como mais estudos que estabeleçam os potenciais genéticos dessas aves, pois este estudo indica que são materiais genéticos ricos e distintos. As raças brasileiras em estudo estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e possuem elevada variabilidade genética intra-racial, o que é uma característica de raças nativas conservadas geneticamente.

Termos para indexação: caipira, diversidade, *Gallus gallus*, microssatélites, recursos genéticos.

Introdução

O Brasil possui diversos tipos de galinhas, incluindo as de raças nativas. Na região Nordeste do país, há vários grupos genéticos, como as raças nativas Canela-Preta, Caneluda do Catolé e Peloco, que são criadas, principalmente, por pequenos agricultores, com pouco ou nenhum investimento tecnológico. Estas são aves com duplo propósito (produção de carne e ovos), consideradas menos susceptíveis a doenças, tolerantes às adversas condições ambientais da região, a baixa oferta qualitativa e quantitativa de alimentos e criadas prioritariamente à campo (Almeida, 2016; Carvalho et al., 2017).

Nas primeiras décadas do século XIX, houve a introdução de linhagens industriais e raças exóticas de galinhas no Brasil, o que provocou a erosão genética das raças de galinhas brasileiras e colocou as raças nativas em risco desconhecido de extinção. Contudo, a partir da década de 1980, ascendeu uma crescente valorização por parte dos produtores quanto à produção de aves nativas, devido ao mercado estar se voltando para produção de materiais alternativos em termos de criação e produção ecológica e isso tem valorizado o retorno dessas raças (Fonteque et al., 2014; Carvalho et al., 2016).

Estudos que buscam elucidar a diferenciação genética de animais de raças nativas, como evoluíram e de que forma sua diversidade pode ser mensurada têm sido realizados por pesquisadores em todo o mundo. Neste contexto, os marcadores moleculares do tipo microssatélites têm sido amplamente utilizados para compreender a diversidade e estrutura genética de populações. De maneira geral, a realização de estudos comparativos de diversidade genética e da relação genética entre as diferentes raças existentes consolida uma base de dados ampla com aplicações para conservação, compreensão da evolução e uso em programas de seleção (Egito, 2007; Zucchi et al., 2011; Carvalho et al., 2018).

As raças nativas são relevantes, pois representam um patrimônio genético de cada país e, portanto, devem ser conservadas e utilizadas. Contudo, no Brasil, ainda são poucos os estudos que buscam elucidar a sua diferenciação e estrutura genética. O conhecimento da organização genética fomenta a valorização e reconhecimento das raças nativas de galinhas, bem como propicia informações relevantes que auxiliam no manejo genético. Dado o exposto, o objetivo com esta pesquisa foi comparar a estrutura genética de três raças brasileiras de galinhas a grupos genéticos exóticos e linhagens industriais, com uso de marcadores microssatélites.

Materiais e Métodos

Amostragem e áreas de coleta

Esta pesquisa foi realizada pela Universidade Federal do Piauí - Brasil (UFPI) em parceria com a Universidade de Córdoba – Espanha (UCO). O projeto de pesquisa foi cadastrado no comitê de ética em experimentação animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) N° 399/17.

Para a realização desta pesquisa, foram utilizados seis grupos genéticos de galinhas, sendo três grupos crioulos do Nordeste do Brasil e três exóticos. Um total de 196 amostras foi utilizado para execução das análises experimentais: 40 amostras da raça Canela-Preta (Estado Piauí/BR); 30 da raça Caneluda do Catolé (Estado da Bahia/BRA); 30 da raça Peloco (Estado da Bahia/BRA); e, para fins de averiguação de possível mistura das raças nativas brasileiras com material genético industrial e/ou exótico e também como grupo controle, foram utilizadas 30 amostras da linhagem industrial Pesadão - Francesa (muito difundida na região Nordeste do Brasil entre produtores); 40 amostras da raça Leghorn – Italiana (que contribuiu para formação das linhagens comerciais de postura); e 26 amostras da raça Cornish - Inglesa (que contribuiu para formação das linhagens comerciais de corte).

A coleta do material biológico (sangue) nos núcleos de conservação das raças brasileiras foi realizada nos municípios de Teresina/PI (Canela-Preta) e Itapetinga/BA (Caneluda do Catolé e Peloco). O material biológico da linhagem Pesadão foi adquirido num sítio de produção comercial deste grupo genético em Teresina/PI. As amostras de sangue foram retiradas da veia ulnar das aves e postas sobre papel filtro. Após a secagem do sangue sobre o papel, em ambiente natural, este foi colocado dentro de envelope, de modo que o envelope correspondente a cada amostra foi identificado com as informações de cada ave e armazenado no banco de germoplasma do Laboratório de Genética Animal do Departamento de Zootecnia da UFPI. Os materiais biológicos das raças Leghorn e Cornish foram adquiridos do banco de germoplasma da Universidade de Córdoba, Espanha. A localização geográfica das cidades e estados em estudo é ilustrada na Figura 1.

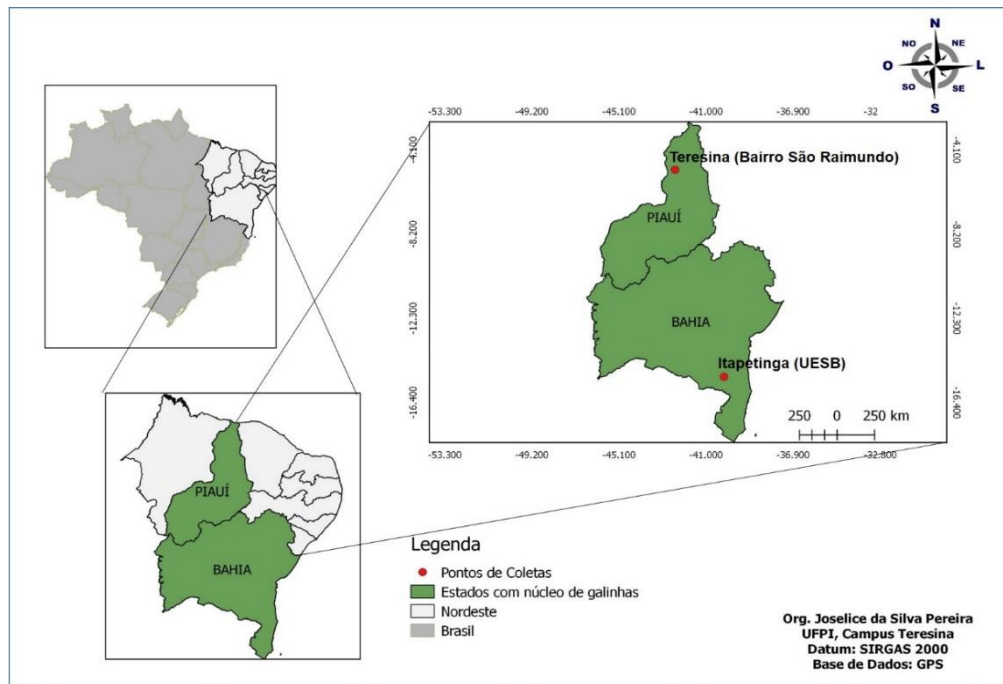


Figura 1. Mapa da localização dos estados e municípios onde amostras de galinhas de cada uma das raças brasileiras foram coletadas dentro da região Nordeste do Brasil.

Análises laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Genética Molecular Aplicada do Departamento de Genética da Universidade de Córdoba (UCO), Espanha. Fragmentos de cada amostra foram utilizados para o procedimento de extração de DNA genômico. Os procedimentos de extração do DNA foram realizados seguindo metodologia descrita por Walsh et al. (1992), com algumas modificações. Três círculos foram cortados dos papéis filtros expostos a uma superfície plana, usando um perfurador Harris Micro de 2 mm (*GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido*), que foi limpo com solução de alvejante a 1% entre cada amostra. Os círculos foram colocados em uma placa de PCR e incubados com 100 µL de uma solução de resina *Chelex* a 5% (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA); em seguida, círculos de papel foram incubados em termociclador a 95°C por 15 minutos, 60°C por 15 minutos e, finalmente, 99°C por 3 min. Então, o lisado foi removido e congelado a -20°C até o uso.

Utilizou-se um total de 25 marcadores microssatélites do projeto AVIANDIV (<http://aviandiv.tzv.fal.de>), todos recomendados pela FAO (2011) (Tabela 1). A amplificação dos fragmentos de DNA desejados realizada pela técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) multiplex e as condições de eletroforese foram conduzidas

conforme descrito por Ceccobelli et al. (2013). Os genótipos foram lidos com o ABI PRISM GeneScan 3.1.2 (*Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA*) e interpretados com o ABI PRISM Genotyper 3.7 NT (*Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA*).

Tabela 1. Descrição dos *loci* de microssatélites utilizados para estudo genético das raças de galinhas brasileiras, exóticas e linhagem industrial.

<i>Locus</i>	Primer <i>Forward</i> e <i>Reverse</i>	Tamanho do alelo (pb*)
ADL0268	CTCCACCCCTCTCAGAACTA CAACTTCCCATCTACCTACT	102-116
MCW0206	ACATCTAGAATTGACTGTTCAC CTTGACAGTGATGCATTAAATG	221-249
LEI0166	CTCCTGCCCTTAGCTACGCA TATCCCCTGGCTGGGAGTTT	354-370
MCW0295	ATCACTACAGAACACCCTCTC TATGTATGCACGCAGATATCC	88-106
MCW0081	GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG CCTGTATGTGGAATTACTTCTC	112-135
MCW0183	ATCCAGTGTGCGAGTATCCGA TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	296-326
ADL0278	CCAGCAGTCTACCTTCCTAT TGTCATCCAAGAACAGTGTG	114-126
MCW0067	GCACTACTGTGTGCTGCAGTTT GAGATGTAGTTGCCACATTCCGAC	176-186
MCW0104	TAGCACAACCTCAAGCTGTGAG AGACTTGCACAGCTGTGTACC	190-234
MCW0123	CCACTAGAAAAGAACATCCTC GGCTGATGTAAGAAGGGATGA	76-100
MCW0330	TGGACCTCATCAGTCTGACAG AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	256-300
MCW0165	CAGACATGCATGCCAGATGA GATCCAGTCCTGCAGGCTGC	114-118
MCW0069	GCACTCGAGAAAACCTTCCTGCG ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA	158-176
MCW0248	GTTGTTCAAAGAAGATGCATG TTGCATTAACCTGGGCACTTTC	205-225
MCW0111	GCTCCATGTGAAGTGGTTTA ATGTCCACTTGTCAATGATG	96-120
MCW0020	TCTTCTTTGACATGAATTGGCA GCAAGGAAGATTTTGTACAAAATC	179-185
MCW0034	TGCACGCACTTACATACTTAGAGA TGTCCTTCCAATTACATTCATGGG	212-246
MCW0103	AACTGCGTTGAGAGTGAATGC TTTCCTAACTGGATGCTTCTG	266-270
MCW0222	GCAGTTACATTGAAATGATTCC TTCTCAAACACCTAGAAGAC	220-226
MCW0016	ATGGCGCAGAAGGCAAAGCGATAT TGGCTTCTGAAGCAGTTGCTATGG	162-206
MCW0037	ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA	154-160

Continua

LEI0094	GAAAGCTCACATGACACTGCGAAA GATCTCACCAGTATGAGCTGC TCTCACACTGTAACACAGTGC	247-287
MCW0078	CCACACGGAGAGGAGAAGGTCT TAGCATATGAGTGTACTGAGCTTC	135-147
ADL0112	GGCTTAAGCTGACCCATTAT ATCTCAAATGTAATGCGTGC	120-134
MCW0216	GGGTTTTACAGGATGGGACG AGTTTCACTCCCAGGGCTCG	139-149

*pb, pares de bases.

Análises estatísticas

O programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi usado para estimar as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o), que representam a proporção média de indivíduos heterozigóticos por *locus* em uma população.

As estimativas F de Wright (Fis, Fst, Fit), bem como a matriz de distância genética de Nei, a matriz de dissimilaridade, os componentes principais (PCoA) e o gráfico de dispersão também foram calculados com o 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 probabilidade de um indivíduo qualquer na subpopulação possuir alelos idênticos nas descendências. O coeficiente de endogamia dos indivíduos com relação ao total (Fit) 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 o aumento da probabilidade de identidade por descendência em função da subdivisão da população total (Oliveira et al., 2006).

A variância genética global entre as raças, estimada por Análise de Variância Molecular – AMOVA (Excoffier et al., 1992), foi analisada pelo programa *GenAlEx 6.5*, com utilização de 10.000 permutações para os cálculos. Esta análise levou em consideração o agrupamento das amostras *a priori*, as quais foram organizadas por raça. Para verificação da condição do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cada *locus* e em cada população, foi utilizado o *software* GENEPOP v.4.0.10 (Rousset, 2008).

A rede de vizinhos (*Neighbor-net*) foi construída conforme implementada no *software SplitsTree4* (Huson & Bryant, 2005), a fim de representar graficamente as relações entre raças e representar possíveis evidências de mistura.

O programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para definir o número mais provável de grupos (K) nas amostras coletadas, por meio de métodos Bayesianos sem informações *a priori* sobre a origem das amostras. Foram utilizadas 400.000 simulações com base no método Cadeia de Markov Monte Carlo, com *burn in* de 200.000, modelo de ancestralidade *admixture*, sem informações *a priori*, e foram testados valores de K variando de 1 a 8, com 10 iterações para análises das três raças brasileiras e incluindo os três grupos genéticos exóticos. Com auxílio do software on-line StructureHarvester (Earl & VonHoldt, 2012), a determinação de K em relação aos propostos foi realizada utilizando valores de ΔK (Evanno et al., 2005). O programa CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) foi utilizado para analisar a estabilidade entre as 10 simulações para o valor de K.

Resultados e Discussão

Neste estudo, foi encontrado valor do número médio de alelos por raça de 4,40, variando de 2,88 (Leghorn) a 5,04 (Caneluda do Catolé), como pode ser observado na Tabela 2. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Ceccobelli et al. (2013), em estudo envolvendo cinco raças nativas de galinhas italianas (2,63 a 3,67 alelos por raça) utilizando o mesmo painel de marcadores utilizado no presente estudo. Os autores supracitados encontraram valor da média de alelos de 3,67 estudando 16 raças de galinhas nativas de países da região mediterrânea europeia. Portanto, nossos resultados mostram que a diversidade genética das raças em estudo é comparável à encontrada em outras raças de galinhas nativas.

Tabela 2. Média e desvio padrão para diversas estimativas ao longo de cada *locus* para as três raças brasileiras e três raças exóticas.

G. Gen.		N	Na	Ho	He	UHe	F	HW (p-valor)
CP	Média	39,8	4,960	0,617	0,618	0,626	-0,001	0,842
	Desvio		0,291	0,030	0,029	0,029	0,019	
CAN	Média	29,6	5,040	0,642	0,634	0,645	-0,025	0,176
	Desvio		0,426	0,031	0,027	0,028	0,042	
PEL	Média	29,6	4,960	0,646	0,620	0,630	-0,049	0,105
	Desvio		0,344	0,030	0,027	0,028	0,027	

Continua

LEGH	Média	40,0	2,880	0,414	0,343	0,347	-0,037	*
	Desvio		0,233	0,067	0,046	0,047	0,089	
CORN	Média	25,8	4,480	0,503	0,552	0,563	0,096	*
	Desvio		0,337	0,036	0,034	0,035	0,040	
PES	Média	29,4	4,080	0,647	0,607	0,617	-0,060	*
	Desvio		0,270	0,039	0,024	0,025	0,043	
Total	Média	32,4	4,400	0,578	0,562	0,571	-0,012	-
	Desvio		0,144	0,018	0,015	0,016	0,020	

G. Gen., grupo genético; N, número de amostras; Na, número de alelos; Ho, heterozigidade observada; He, heterozigidade esperada; UHe, heterozigidade esperada com fator de correção para tamanho amostral; F, índice de fixação de Wright [$1 - (Ho/He)$]; EHW, teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg; CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; LEGH, Leghorn; CORN, Cornish; PES, Pesadão. *Desequilíbrio de Hardy-Weinberg altamente significativo (significância: $p < 0.05$).

As médias dos valores de Ho para as raças brasileiras avaliadas neste estudo foram 0,617 (CP), 0,642 (CAN) e 0,646 (PEL); enquanto as estimativas de He foram 0,618, 0,634 e 0,630 para CP, CAN e PEL, respectivamente (Tabela 2). Os valores de He indicam que existe um equilíbrio de homozigotos. Isto pode ser justificado pelo fato de que as três populações estudadas são de núcleos de conservação, onde se tem como primícias manter o máximo de variabilidade existente dentro das raças. Quanto à diferenciação genética, com exceção da raça Cornish, todas as demais raças apresentaram valores negativos para índice de fixação ou endogamia (F). Isto é passível de pressuposição que as populações tendem à heterozigose e indica que as raças em estudo possuem variabilidade genética.

Os dados observados nos 25 marcadores microssatélites indicaram valores médios de Ho de 0,578 e de He de 0,562. Os valores de Ho e He variaram pouco entre as três raças nativas brasileiras (Tabela 2). A heterozigidade é considerada uma medida de variabilidade genética. Pesquisas com galinhas mostram a importância dos marcadores microssatélites em análises de diferenciação genética e estrutura populacional. As informações oriundas desses marcadores possibilitam diversas aplicações diretas em benefício do manejo genético dessas aves, bem como aplicação na conservação e melhoramento das raças (Wimmers et al., 2000; López-Zavala et al., 2013; Abebe et al., 2015).

As três raças de galinhas brasileiras apresentaram valores de probabilidade não significativa para desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2). Por isto, pressupõe-se que sejam populações grandes e que acasalamentos dentro delas ocorrem ao acaso. Quanto às populações de variedades comerciais e linhagem industrial, todas apresentaram

estimativas altamente significativas para desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Sabe-se que estas são populações submetidas a forte pressão de seleção artificial, pois são variedades e linhagens especializadas. Isto justifica o resultado encontrado para essas raças e ressalta a qualidade das raças nativas, que são materiais genéticos diferenciados e com riqueza genética agregada.

A análise de variância molecular (AMOVA) indica que maior variabilidade genética está distribuída dentro das raças/indivíduos (84%) (Tabela 3). Isto é relevante por se tratar de raças nativas que ainda não participam de algum programa de seleção e melhoramento genético. Além disso, esse resultado indica que essas raças têm riqueza genética elevada, potencializando-as como futuras doadoras de genes para desenvolvimento de novas linhagens comerciais; e ainda aponta para potencial melhoramento intra-raça.

A riqueza genética que esses animais possuem os direciona a muitas opções para futuras pesquisas pontuais, por isso a importância desse tipo de estudos populacionais. A variância entre populações/raça representou 16% da variação total (Tabela 3), o que sugere similaridade, pois pertencem à mesma subespécie (*Gallus gallus domesticus*). Contudo, esse valor pode ser considerado alto quando comparado a outras pesquisas realizadas com raças de galinhas brasileiras (Clementino, 2010; Carvalho et al., 2016). O resultado encontrado nesta pesquisa pode indicar maior percentual de diferenciação entre as raças devido à presença de raças exóticas nas análises e que estas podem estar se distanciando das raças brasileiras e provocando esse percentual de distância. Os estudos mencionados acima relataram menor percentual (6,97% e 3,0%, respectivamente) considerando apenas raças brasileiras, não fazendo uso de grupos genéticos exóticos.

Tabela 3. Estatística da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 25 loci de microssatélites em três raças de galinhas nativas brasileiras e três raças exóticas.

F. Var.	GL	SQ	QM	C. Var.	%T	F (p-valor)
Entre Populações	5	465,300	93,060	1,323	16%	Fst = 0,157 (0,001)
Entre Indivíduos	190	1346,521	7,087	0,000	0%	Fit = 0,157 (0,001)
Dentro Indivíduos	196	1391,000	7,097	7,097	84%	Fis = -0,001 (0,524)
Total	391	3202,821		8,420	100%	

F.Var., fonte de variação; GL, graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; C. Var., componentes de variação; %T, porcentagem da variância total contribuída por cada componente; ¹ Índice de fixação entre núcleos; ² Índice de fixação entre indivíduos; ³ Índice de fixação dentro de indivíduos.

Fez-se uso das estatísticas F de Wright, consideradas análises de estrutura populacional, e verificou-se no geral, que as aves estudadas formaram subgrupos genéticos com equivalência a suas respectivas raças e com elevada diferenciação genética ($< 0,05$), como observado no valor de F_{st} (0,157) (Tabela 3). De acordo com Wright (1978), o valor de F_{st} , que mede o grau de diferenciação genética entre populações, presume que um valor obtido na faixa entre 0 a 0,05 indica uma diferenciação genética pequena; entre 0,05 e 0,15 indica diferenciação moderada; entre 0,15 e 0,25 indica um grau de diferenciação elevado; e valores acima de 0,25 uma diferenciação muito grande. Investigações comparativas em aves que fizeram uso de marcadores moleculares microssatélites mostraram valores baixos de F_{st} (0,029) em uma raça de galinhas nativas brasileiras e elevado em cinco raças de galinhas locais italianas F_{st} (0,225) (Ceccobelli et al., 2013; Carvalho et al., 2016).

Quanto à estimativa de F_{is} (-0,001), o valor encontrado indica variabilidade genética dentro das raças, percentual de homozigose controlada dentro das populações e a ocorrência de associação de alelos ao acaso. De acordo com Liu et al. (2008), F_{is} pode apresentar valores que variam de -1 a 1, em que -1 indica que todos os indivíduos são heterozigotos, 0 indica associação de alelos ao acaso e 1 significa que todos os indivíduos são homozigotos. Em nosso estudo, a estimativa F_{it} (consanguinidade global da população) apresentou valor de 0,157, o que pode indicar o favorecimento de genes derivados de um ancestral comum.

O gráfico de componentes principais (PC), estabelecido a partir da matriz de dissimilaridade, onde inclui informações dos seis materiais estudados, sugere formação de quatro grupos genéticos (Figura 2). O primeiro grupo foi formado pela raça LEGH; segundo grupo formado pela raça CP; terceiro grupo formado, principalmente, pelas raças CAN e PEL; e quarto grupo formado, predominantemente, pelas linhagens CORN e PES. O terceiro e quarto grupos são os mais próximos geneticamente, quando comparados aos demais grupos.

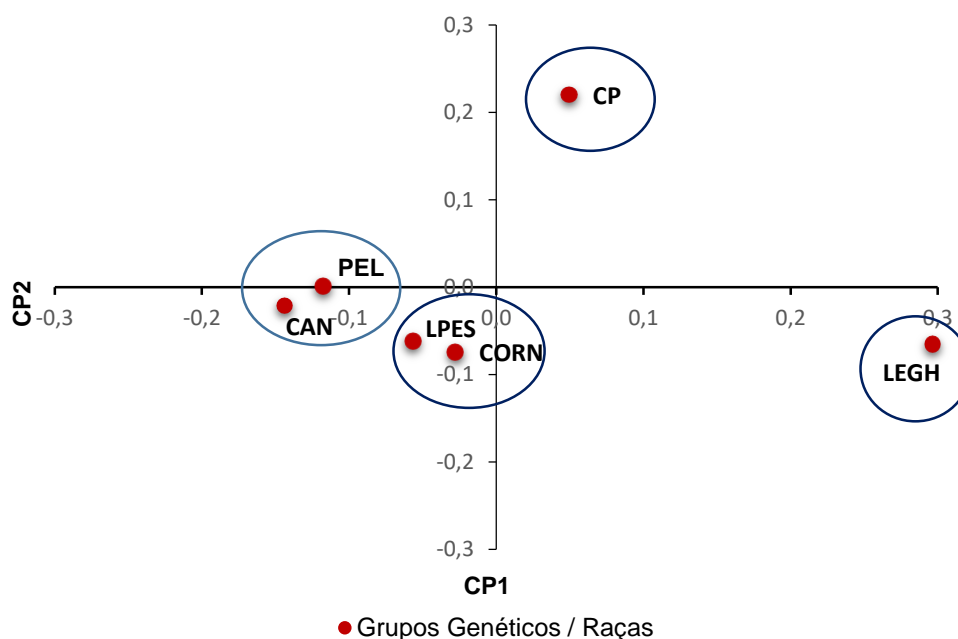


Figura 2. Dispersão gráfica das distâncias interpopulacionais dos seis grupos genéticos de galinhas (CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; PES, Pesadão; LEGH, Leghorn; CORN, Cornish) em relação aos eixos cartesianos estabelecidos pelos componentes principais (PC_1 e PC_2) com base na matriz de dissimilaridade.

A linhagem LEGH se mostrou distante de todas as demais raças, inclusive das nativas brasileiras (Figura 2). A raça LEGH é nativa da Itália e, a partir desta raça, selecionou-se para criar a linhagem de postura plumagem branca que é bastante difundida em granjas industriais de postura em vários países. A linhagem CORN é nativa inglesa e, devido a seu potencial para produção de carne, foi muito utilizada em cruzamentos para formação de linhagens de corte, o que leva a justificar seu agrupamento com a linhagem PES. Esta última, por sua vez, é uma linhagem industrial francesa especializada para corte, formada a partir de cruzamentos de várias raças (Figueiredo et al., 2003; Murad & Silva, 2014). As raças CAN e PEL são nativas do estado da Bahia/Brasil e fazem parte da mesma região geográfica, o que respalda seu agrupamento em um único *cluster*, defendendo a teoria do agrupamento geográfico. A raça CP é nativa do Brasil, encontrada principalmente no estado do Piauí. Todos os indivíduos desta raça agruparam-se em único *cluster*, o que sugere diferenciação genética desta raça em relação às demais estudadas.

A relação filogenética das populações estudadas baseada na distância de Nei está apresentada na Figura 3. A árvore mostra resultados que confirmam o resultado encontrado na análise de PCoA. Galinhas das raças da Bahia (PEL e CAN) têm relação mais próxima entre si; as galinhas da raça CP agrupam-se isoladamente; a linhagem LEGH aparece como

a mais distante das demais; as galinhas CORN e PES apresentaram-se mais próximas geneticamente.

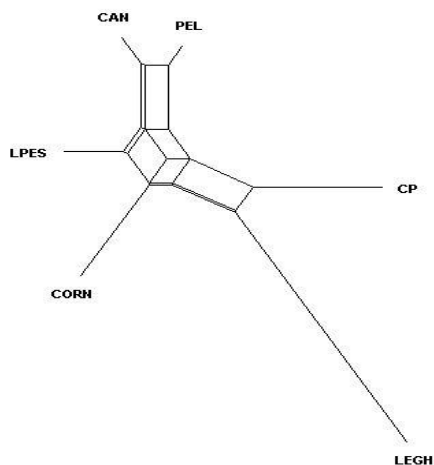


Figura 3. Dendrograma de *Neighbor-net* construído utilizando a distância de Nei entre os seis grupos genéticos avaliados (três raças nativas e três grupos comerciais). CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; PES, Pesadão; LEGH, Leghorn; CORN, Cornish.

A abordagem Bayesiana implementada no software STRUCTURE foi utilizada para estabelecer a estrutura populacional dos seis grupos genéticos estudados, com base na associação das frequências alélicas e proposição de mistura entre os indivíduos dos grupos genéticos avaliados sem informação *a priori* sobre ancestralidade. A estrutura de populações, fomentada pelo método Bayesiano, apresentou o maior valor médio de ΔK ($K = 4$) (Figura 4).

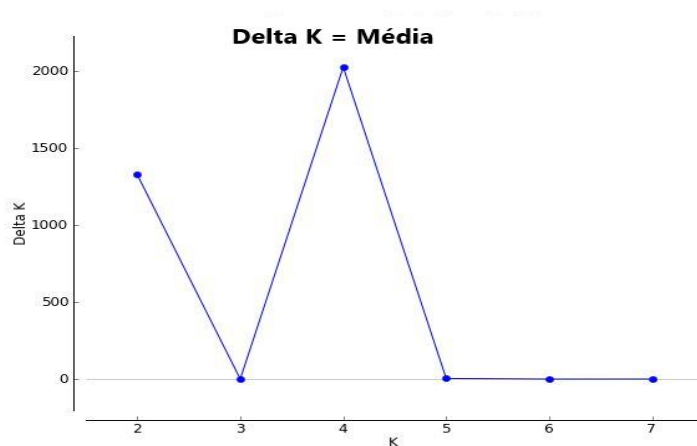


Figura 4. Representação gráfica do valor de K para a formação de grupos de galinhas das raças brasileiras e exóticas.

As três raças brasileiras se agruparam em dois grupos distintos, um formado por CP e o outro formado por CAN e PEL. Os três grupos exóticos avaliados também formaram dois grupos, um constituído por LEGH e outro por CORN e PES (Figura 5).

Esses resultados indicam que a análise populacional realizada no programa STRUCTURE pode proporcionar precisas representações das relações genéticas existentes entre as raças, o que sugere que existem quatro sub-grupos genéticos distintos, corroborando com a PCoA. Estudos recentes também têm usado inferência Bayesiana para analisar estruturas de populações de galinhas (Ceccobelli et al., 2015; Kumar et al., 2015, Carvalho et al., 2016), apresentando esta técnica como eficiente para estrutura de populações.

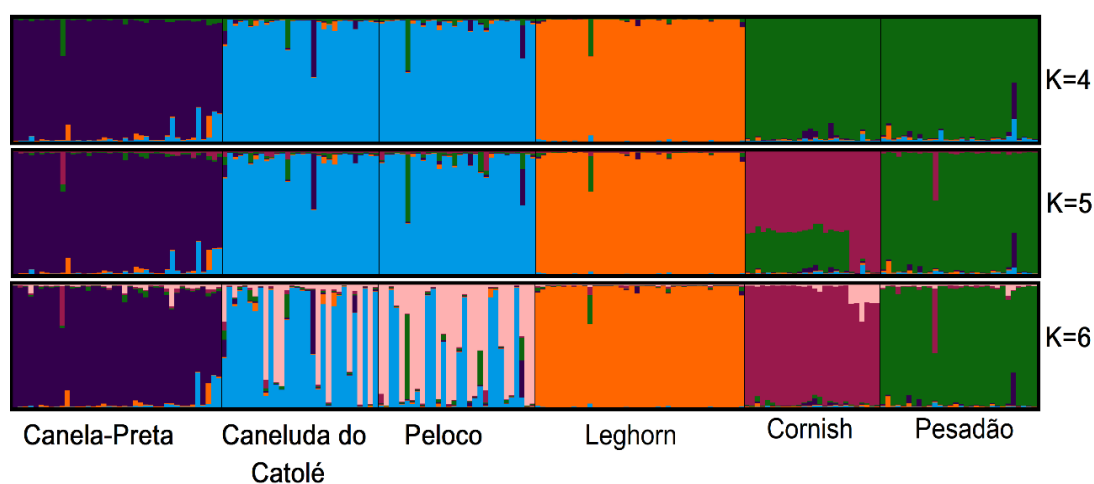


Figura 5. Análise de estrutura populacional de 196 indivíduos de seis raças de galinhas representando a formação de quatro a seis grupos com base em 25 marcadores microsatélites. Cada grupo está representado por uma cor específica. O eixo y exibe a ascendência estimada de cada indivíduo em um determinado grupo ou sub-população usando o modelo de mistura.

Observa-se na Figura 5, que para $K = 4$ (cor roxa), a raça Canela-preta, do estado do Piauí, apresenta um material genético diferenciado, com estrutura única, com pouco compartilhamento de combinações gênicas com outras populações. Na cor azul claro, observa-se o agrupamento das duas raças do estado da Bahia (CAN e PEL). Acredita-se que estes resultados podem estar relacionados com a localização geográfica dessas raças, bem como suas origens. Ressalta-se que, em nenhum momento, as raças brasileiras se agrupam com as raças exóticas (cores verde, laranja e rosa) e nem com a linhagem

comercial Pesadão (cor verde). Isto demonstra pureza do material genético avaliado da grande maioria dos animais das raças investigadas e fortalece a necessidade de maior valorização, assim como mais estudos que estabeleçam os potenciais genéticos dessas aves, pois este estudo indica que são materiais genéticos ricos e distintos.

Considerando $K = 5$ (Figura 5), não houve alterações nas formações de grupos para as raças brasileiras e LEGH em relação a $K = 4$, contudo houve separação dos grupos genéticos CORN e PES. Considerando $K = 6$ (mesmo quantitativo de grupos genéticos estudados), observa-se que há alterações na composição dos grupos das raças brasileiras CAN e PEL, que se separam em grupos distintos, porém mostrando que compartilham combinações gênicas. Essas raças são originárias da mesma região (Sudoeste do estado da Bahia), o que sugere que, possivelmente, no passado existia uma troca de genes entre esses animais, pois os acasalamentos eram descontrolados, permitindo uma maior similaridade genética entre essas populações. É importante ressaltar que o programa STRUCTURE agrupa os animais por similaridade genética, não necessariamente por raça. Caneluda do Catolé e Peloco são raças com fenótipos, comportamentos e potenciais produtivos distintos e, por serem da mesma região, compartilham combinações gênicas.

Estes resultados fortalecerão a valorização e reconhecimento dessas raças no meio científico, bem como na área rural com produtores. Estimular a produção, bem como a comercialização desses materiais genéticos brasileiros se faz primordial, pois dessa forma estaremos promovendo a conservação e utilização desses patrimônios genéticos, que também devem ser mais estudados, a fim de elucidar o real potencial genético dessas aves que se mostram promissoras.

Conclusões

1. As três raças brasileiras de galinhas avaliadas pertencem a três grupos genéticos distintos. A raça Canela-Preta apresentou características genéticas próprias e as raças Caneluda do Catolé e Peloco compartilham combinações gênicas.

2. As raças brasileiras em estudo apresentam material genético puro, conservado, sem mistura com material genético exótico e/ou industrial. Estas raças estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, possuem elevada variabilidade genética intra-racial, o que é uma característica de raças nativas conservadas geneticamente.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro da CAPES, UFPI, UESB e UCO.

Referências

ABEBE, A.S.; MIKKO, S.; JOHANSSON, A. M. Genetic diversity of five local Swedish chicken breeds detected by microsatellite markers. **PLoS One**, v.10, n. 4, e0120580, 2015.

ALMEIDA, E.C. **Caracterização fenotípica e produtiva de galinhas e patos no estado da Bahia**. 88p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal da Bahia. Salvador, BA, 2016.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; ALMEIDA, M.J.O.; SARMENTO, J.L.R.; BRITTO, F.B.; SILVA, M.A. Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas nativas Canela-Preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.11, p.1899-1906, 2016.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; ALMEIDA, M.J.O.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; SARMENTO, J.L.R.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, M.B.; SOUSA, P.R.; CARVALHO, A.A. Padrão racial fenotípico de galinhas brasileiras da raça Canela-Preta. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.254, p.195-202, 2017.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; ALMEIDA, M.J.O.; SARMENTO, J.L.R.; BRITTO, F.B.; SILVA, M.A. Genetic variability of twelve microsatellite loci in native Canela-Preta chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1275-1281, 2018.

CECCOBELLI, S.; LORENZO, P.D.; LANCIONI, H.; CASTELLINI, C.; IBÁÑEZ, L.V.M.; SABBIONI, A.; SARTI, F.M.; WEIGEND, S.; LASAGNA, E. Phylogeny, genetic relationships and population structure of five Italian local chicken breeds. **Italian Journal of Animal Science**, v.12, n.3, e66, 2013.

CECCOBELLI, S.; LORENZO, P.D.; LANCIONI, H.; IBÁÑEZ, L.V.M.; TEJEDOR, M.T.; CASTELLINI, C.; LANDI, V.; MARTÍNEZ MARTÍNEZ, A.; DELGADO BERMEJO, J.V.; VEGA PLA, J.L.; LEON JURADO, J.M.; GARCÍA, N.; ATTARD, G.; GRIMAL, A.; STOJANOVIC, S.; KUME, K.; PANELLA, F.; WEIGEND, S.; LASAGNA, E. Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. **Livestock Science**, v.175, p.27-36, 2015.

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

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2012.

EGITO, A.A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. Tese de doutoramento. UnB. 232p, 2007.

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**, v.131, p.479-491, 1992.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Molecular genetic characterization of animal genetic resources**. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome, 2011.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C.; AVILA, V.S. **Raças e linhagens de galinhas para criações comerciais e alternativas no Brasil**. Comunicado técnico EMBRAPA-CNPSA, 2003.

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**, v.34, n.1, p.98-102, 2014.

HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v.23, p.254-267, 2005.

KOPELMAN, N.M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A.; MAYROSE, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v.15, n.5, p.1179-1191, 2015.

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**, v.26, n.3, p.201-210, 2015.

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. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.12, p.1237-1241, 2008.

LÓPEZ-ZAVALA, R.; CANO-CAMACHO, H.; CHASSIN-NORIA, O.; OYAMA, K.; VÁZQUEZ-MARRUFO, G.; ZAVALA-PÁRAMO, M.G. Diversidad genética y estructura de poblaciones de pavos domésticos mexicanos. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v.4, n.4, p.417-434, 2013.

MURAD, J.C.B.; SILVA, B.C. *Avicultura / Júlio César Bertolucci Murad; Bruno Ceolin da Silva – 1. ed. – Brasília: NT Editora, 2014. 242 p. il.*

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, ROLAND.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294–307, 2006.

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

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

ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete reimplement of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology**, v.8, p.103-106, 2008.

WALSH, P.S.; VARLARO, J.; REYNOLDS, R. A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.5061–5065, 1992.

WIMMERS, K.; PONSUKSILI, S.; HARDGE, T.; VALLE-ZARATE, A.; MATHUR, P.K.; HORST, P. Genetic distinctness of African, Asian and South American local chickens. **Animal Genetics**, v.31, n.3, p.159-165, 2000.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population**. v.4. Variability Within and Among Natural Populations. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.

ZUCCHI, M.I.; CAVALLARI, M.M.; SIQUEIRA, M.V.B.M. A importância do conhecimento sobre a diversidade e estrutura genética de populações e sua utilidade para a conservação e manejo de espécies vegetais. **Pesquisa & Tecnologia**, v.8, n.2, 2011.

CAPÍTULO 5

Diversidade genética de dezesseis raças nativas de galinhas do Brasil, Portugal e Espanha

Genetic diversity of sixteen native chicken breeds from Brazil, Portugal and Spain

Abstract - In this study, we aimed to investigate the genetic diversity, genetic relationship, and population structure of sixteen native chicken breeds from Brazil, Portugal, and Spain. A total of 816 individuals of 19 genetic groups (16 Creole breeds and three commercial strains) were used. We used a total of 25 microsatellite markers. Different statistical parameters were used to estimate the genetic diversity and relationship among breeds, as well as the population structure of these breeds. Our results indicate high variability and polymorphism in the populations. The Wright's F statistics calculated for all loci show excess of homozygous. The global deficit of heterozygosity of individuals in the total population (0.225) was significantly high ($p < 0.001$). The breeds from the three countries have intra-breed variability. The populations of the Brazilian breeds show a trend of heterozygosity and are in Hardy-Weinberg equilibrium. The breeds from Portugal and some Spanish breeds tend to homozygosity and have significant values for Hardy-Weinberg disequilibrium. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed genetic variability between and within the sampled groups; however, the difference within populations (75%) was higher than between populations (25%). The analysis of population structure indicates the existence of 17 genetic subgroups. The native breeds included in this study have defined genetic structure. These results will strengthen the programs of conservation of genetic resources of each country investigated, demonstrate the genetic relevance of native chickens, and reinforce the need for their de conservation. The Brazilian breeds have genetic relationship, especially, with the Portuguese breeds and a negligible relationship with the Spanish breeds. The native breeds from the countries in study did not clustered with commercial strains. The breeds from each country have unique genetic structures, which demonstrate the genetic richness of the species *Gallus gallus* in these countries.

Index terms: diversity, free-range, *Gallus gallus*, genetic resources, microsatellites.

Diversidade genética de dezesseis raças nativas de galinhas do Brasil, Portugal e Espanha

Resumo - Neste estudo, objetivamos objetivou-se investigar a diversidade genética, a relação genética e a estrutura populacional de dezesseis raças nativas de galinhas dos países Brasil, Portugal e Espanha. No total, 816 indivíduos, pertencentes a 19 grupos genéticos de galinhas (16 raças de galinhas nativas e três linhagens comerciais) foram utilizados. Utilizou-se um total de 25 marcadores microssatélites. Diferentes parâmetros estatísticos foram utilizados para estimar a diversidade genética e relacionamento entre as raças, assim como a estrutura populacional destas raças. Nossos resultados indicam elevada variabilidade e polimorfismo nas populações avaliadas. A estatística F calculada para todos os *loci* mostra que há excesso de homozigotos. O déficit global de heterozigosidade de indivíduos na população total (0,225) foi significativamente alto ($p < 0,001$). As raças dos três países possuem variabilidade intra-racial. As populações das raças brasileiras apresentam tendência a heterozigose e estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. As raças de galinhas de Portugal e algumas raças espanholas tendem a homozigose e apresentaram valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise de variância molecular (AMOVA) revelou variabilidade genética entre e dentro dos grupos amostrados, porém, com maior diferença dentro das populações (75%) do que entre (25%). A análise de estrutura de populações sugere a existência de 17 subgrupos genéticos. As raças nativas incluídas nesta investigação possuem estrutura genética definida. Estes resultados fortalecerão os programas de conservação de recursos genéticos de cada país envolvido no estudo, demonstram a relevância genética das aves nativas e reforça a necessidade de conservá-las. As raças brasileiras têm relação genética, principalmente, com as raças portuguesas e singela relação com as raças espanholas. As raças nativas dos países investigados não se agrupam com matérias comerciais. As raças de cada país contêm estruturas genéticas únicas, o que demonstra a riqueza genética da espécie *Gallus gallus* nesses países.

Termos para indexação: caipira, diversidade, *Gallus gallus*, microssatélites, recursos genéticos.

Introdução

O desenvolvimento de linhagens de galinhas mais produtivas, baseado no cruzamento entre raças, é praticado há muito tempo em nível mundial. Neste contexto, essas linhagens são as que dominam o comércio industrial de aves. Por isto, essas linhagens são dependentes de alta qualidade de ração e de alto investimento tecnológico. Em paralelo, existe outro sistema de produção avícola que é praticado em todo o mundo, a produção de aves em sistema tradicional ou familiar, onde se faz uso, prioritariamente, de raças nativas de galinhas. Estes animais, que são bem adaptados aos extensos sistemas de criação, são adequados para os avicultores com poucos recursos e dotados de meios tecnológicos limitados. Estes produtores têm essas aves como opção de produção para consumo e venda do excedente (FAO, 2007; Abebe et al., 2015).

A criação tradicional de galinhas tem promovido a conservação das raças nativas. Nos países em desenvolvimento, as raças nacionais de galinhas representam até 95% do total de aves da população e são responsáveis pela maior contribuição da diversidade genética de aves do mundo (Besbes et al., 2007).

O estímulo à introdução de aves industriais, na perspectiva de animais mais produtivos em pequenos criatórios da agricultura familiar, provocou a redução do tamanho populacional das raças nativas e tem promovido erosão genética destas. Evidências apontam que as galinhas nativas possuem potencial considerável de desempenho produtivo e reprodutivo, bastando para isso, melhorar seu uso, promover o melhoramento intra-raça dentro do ambiente tradicional de criação (Besbes et al., 2007; FAO, 2007; Carvalho et al., 2018).

Apesar da importância e do potencial das galinhas nativas, estas aves são frequentemente ignoradas e recebem menos atenção quanto à necessidade de conservação genética, quando comparadas a outras espécies de animais como bovinos, caprinos e ovinos. As raças de galinhas nativas são primordiais para o desenvolvimento da produção avícola mundial e de subsistência; contudo, a maioria dessas raças está em extinção ou risco desconhecido de extinção. Apenas 25% das raças de galinhas nativas (*Gallus gallus*) do mundo estão em algum tipo de programa de conservação (Hoffmann, 2009; Abebe et al., 2015).

Com exceção de alguns países que possuem vários estudos com galinhas nativas, os demais, que são maioria, possuem informações genéticas limitadas sobre este tipo de aves. Neste contexto, o estímulo ao estudo da caracterização genética, relação e diversidade

genética se torna imprescindível para a promoção e valorização de programas de conservação, bem como para organizar associações de criadores de raças de galinhas nativas. Neste sentido, os marcadores autossômicos do tipo microssatélites são eficientemente utilizados para estudos de diversidade entre e dentro de populações. Estes marcadores são altamente polimórficos, mostram herança co-dominante e são distribuídos uniformemente por todo o genoma (Abebe et al., 2015; Ceccobelli et al., 2015; Carvalho et al., 2016; Toalombo Vargas et al., 2019).

Portugal e Espanha têm uma relação histórica atrelada à colonização do Brasil, por volta do século XV, logo podem possuir troncos formadores de raças de animais relacionados. Esses países da Península Ibérica possuem maior conhecimento sobre quantitativo de suas raças nativas de galinhas, bem como sua classificação segundo a FAO. O Brasil, por sua vez, ainda tem conhecimento limitado sobre as possíveis raças de galinhas que possui, realidade que gradativamente está sendo mudada (DGAV, 2013; Carvalho et al., 2018; MAPA, 2019).

Neste contexto, com intuito de obter informações moleculares que poderão apoiar os programas de conservação e utilização dessas raças, auxiliando no delineamento de projetos e fornecendo informações relevantes sobre os recursos genéticos desses países, objetivou-se conhecer a diversidade genética, a relação genética e a estrutura populacional de dezesseis raças nativas de galinhas dos países Brasil, Portugal e Espanha.

Materiais e Métodos

Declaração de Ética

Esta pesquisa foi aprovada pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Federal do Piauí, Brasil sob o N° 399/17.

Amostragem e áreas de coleta

Este estudo foi realizado em parceria da Universidade Federal do Piauí - Brasil (UFPI), Universidade de Córdoba – Espanha (UCO) e do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Portugal (INIAV). No total, 816 indivíduos, pertencentes a 19 grupos genéticos de galinhas, foram utilizados para a execução das análises experimentais, sendo dezesseis raças de galinhas nativas e três linhagens

comerciais. Destas, três raças nativas do Brasil (Canela-Preta (40), Peloco (30) e Caneluda do Catolé (30)); nove nativas da Espanha (Andaluza Azul (50), Castellana Negra (50), Combatiente Español (50), Extremeña Azul (50), Ibicenca (50), Mallorca (50), Pita Pinta (50), Sureña (30), Utrerana Perdiz (50)); e quatro nativas de Portugal (Amarela (50), Branca (69), Preta Lusitânica (19) e Pedrês Portuguesa (52)).

Para fins de averiguação de possível mistura das raças nativas com material genético industrial e também como grupo controle, foram utilizadas duas variedades comerciais: Leghorn - italiana (40), que contribuiu para formação das linhagens comerciais de postura; e Cornsih - inglesa (26), que contribuiu para a formação das linhagens comerciais de corte. Estas duas variedades foram adquiridas do banco de germoplasma da UCO, Espanha. Além destas, foi utilizada a linhagem industrial Pesadão - francesa (30), adquirida em sitio de produção comercial deste grupo genético no estado do Piauí. A localização geográfica dos países selecionados para a realização da pesquisa é ilustrada na Figura 1.

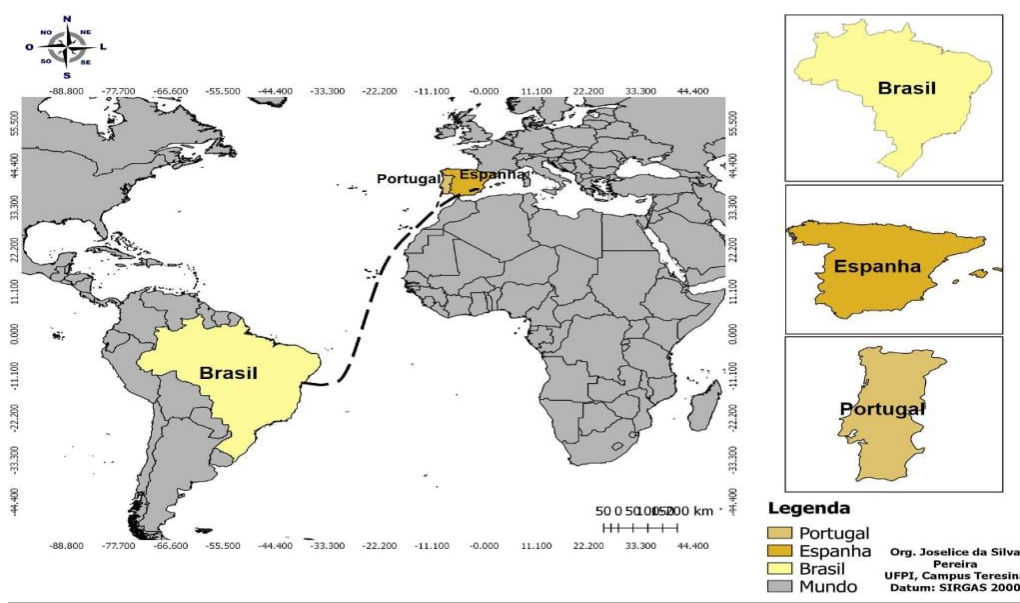


Figura 1. Mapa da localização dos países onde foram amostradas as raças de galinhas (Brasil, Espanha e Portugal).

Análises Laboratoriais

Os procedimentos laboratoriais para as raças do Brasil e Espanha foram realizados no laboratório de Genética Molecular Aplicada da Universidade de Córdoba – Espanha. Para as raças de Portugal, os procedimentos foram realizados no laboratório de Genética

Molecular do INIAV - Fonte Boa. Os materiais biológicos das aves (sangue) foram armazenados em papéis filtros.

Fragmentos de cada amostra foram utilizados para o procedimento de extração de DNA genômico. Os procedimentos de extração de DNA foram realizados seguindo a metodologia de Walsh et al. (1992), com algumas modificações. Três círculos foram cortados dos papéis filtros expostos a uma superfície plana, usando um perfurador Harris Micro de 2 mm (*GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido*), que foi limpo com solução de alvejante a 1% entre cada amostra. Os círculos foram colocados em uma placa de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e incubados com 100 µL de uma solução de resina *Chelex* a 5% (*Bio-Rad, Hercules, CA, EUA*); em seguida foram incubados em termociclador a 95°C por 15 minutos, 60°C por 15 minutos e, finalmente, 99°C por 3 min. O lisado foi removido e congelado a -20°C até o uso.

Marcadores Microssatélites

Utilizou-se um total de 25 marcadores microssatélites do projeto AVIANDIV (<http://aviandiv.tzv.fal.de>), todos recomendados pela FAO (2011): ADL112, ADL268, ADL278, LEIO094, LEIO166, MCW016, MCW020, MCW034, MCW037, MCW067, MCW069, MCW078, MCW081, MCW103, MCW104, MCW111, MCW123, MCW165, MCW183, MCW206, MCW216, MCW222, MCW248, MCW295, MCW330. A amplificação dos fragmentos de DNA desejados pela técnica de PCR e as condições de eletroforese, foram realizadas conforme descrito por Ceccobelli et al. (2013). Os genótipos foram lidos com o ABI PRISM *GeneScan* 3.1.2 (*Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA*) e interpretados com o ABI PRISM *Genotyper* 3.7 NT (*Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA*).

Análises estatísticas e genéticas

O programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) foi usado para estimar as heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o), que representam a proporção média de indivíduos heterozigóticos por *locus* de uma população.

As estimativas F de Wright (F_{is} , F_{st} e F_{it}), bem como a matriz de distância genética de Nei, 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. F_{is} é o coeficiente de endogamia ou índice de fixação dentro dos indivíduos relacionados à população, que mensura a probabilidade de um indivíduo qualquer na subpopulação possuir alelos idênticos nas descendências. O coeficiente de endogamia dos indivíduos com relação ao total (F_{it}) 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 (F_{st}) fornece o aumento da probabilidade de identidade por descendência em função da subdivisão da população total (Oliveira et al., 2006).

A variância genética global entre as raças foi estimada por Análise de Variância Molecular – AMOVA (Excoffier et al., 1992), com uso do programa GenAlEx 6.5, com 10.000 permutações para os cálculos. Esta análise levou em consideração o agrupamento das amostras *a priori*, que foram organizadas por raça.

O conteúdo de informações polimórficas (PIC) foi calculado utilizando-se o *software* Cervus v.3.0.3 (Marshall et al., 1998) (www.fieldgenetics.com). Os testes de probabilidade seguiram o método da cadeia de Markov, adotando-se 1.000 *steps* de memorização, 100 *batches* e 1.000 interações por *branches*. A correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989) foi adotada para corrigir o efeito de múltiplas comparações, evitando-se a possibilidade de resultados erroneamente significantes (erro tipo I). Para as correlações, adotou-se nível de significância 0,05. Para se verificar a condição do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em cada *locus* e em cada população, foi utilizado o *software* GENEPOP v.4.0.10 (Rousset, 2008).

A rede de vizinhos (*Neighbor-net*) foi construída conforme implementada no *software* SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2005), a fim de representar graficamente as relações entre raças e possíveis evidências de mistura.

O programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para definir o número mais provável de grupos (K) nas amostras coletadas, por meio de métodos Bayesianos com informações *a priori* sobre a origem das amostras. Foram utilizadas 1.200.000 simulações de Cadeias de Markov Monte Carlo, com *burn in* de 400.000, sob modelo de ancestralidade *admixture*, com informações *a priori* e testados valores de K variando de 2 a 22, com 10 interações para análises dos 19 grupos genéticos (16 raças nativas e três linhagens comerciais). Com auxílio do aplicativo on-line Structure Harvester (Earl & VonHoldt, 2012), a determinação de K em relação aos propostos foi realizada utilizando valores de ΔK (Evanno et al., 2005).

O programa CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) foi usado para analisar a estabilidade entre as dez simulações para o valor de K.

A análise discriminante dos componentes principais (DAPC) foi realizada para atribuir indivíduos aos *clusters* (grupos) identificados pela função *find.cluster*, baseado na estrutura populacional. Para a função *find.cluster*, o número ideal de *clusters* foi escolhido com base no critério de informação Bayesiano (BIC), como descrito por Jombart et al. (2010). As análises de DAPC foram realizadas usando o pacote ADEGENET do programa R (R Core Team, 2012).

Resultados e Discussão

Diversidade genética dentro e entre raças

Na Tabela 1, são apresentados os valores médios para os parâmetros populacionais. Nesta investigação, encontrou-se um total de 119 alelos nas 16 populações estudadas, em 25 *loci* microssatélites investigados. O número médio de alelos por *locus* variou de 2 (MCW103) a 8 (LEIO094 e MCW034). Estes valores são similares aos encontrados por Zanetti et al. (2010), em um estudo envolvendo seis raças de galinhas do norte da Itália, e por Abebe et al. (2015), em estudo com galinhas de cinco raças da Suécia, ambos usando o mesmo painel de marcadores incluso no presente estudo. Nossos resultados mostram que a diversidade genética é comparável à encontrada em outras raças nativas de galinhas europeias, as quais têm em comum o sistema de criação, que ocorre em pequenas propriedades rurais.

Tabela 1. Valores médios para os parâmetros populacionais calculados para cada *locus* nas populações de raças de galinhas estudadas do Brasil, Portugal e Espanha.

<i>Locus</i>	NA	PIC	Ho	He	FIS	FIT	FST
ADL112	4	0,829	0,596	0,603	0,011	0,141	0,131
ADL268	5	0,853	0,595	0,631	0,057	0,213	0,166
ADL278	5	0,832	0,534	0,568	0,061	0,261	0,213
LEIO094	8	0,872	0,652	0,707	0,079	0,194	0,125
LEIO166	4	0,807	0,508	0,529	0,039	0,226	0,195
MCW016	6	0,850	0,638	0,627	-0,018	0,133	0,148
MCW020	4	0,824	0,538	0,589	0,087	0,237	0,165
MCW034	8	0,910	0,730	0,746	0,022	0,138	0,119
MCW037	3	0,796	0,482	0,516	0,067	0,247	0,193
MCW067	4	0,802	0,549	0,566	0,029	0,185	0,161
MCW069	5	0,813	0,563	0,566	0,006	0,183	0,178

Continua

Continuação da Tabela 1

MCW078	4	0,764	0,477	0,474	-0,006	0,160	0,166
MCW081	4	0,819	0,538	0,546	0,014	0,204	0,193
MCW103	2	0,662	0,276	0,304	0,093	0,231	0,152
MCW104	7	0,883	0,616	0,684	0,101	0,226	0,139
MCW111	4	0,821	0,523	0,554	0,055	0,231	0,186
MCW123	4	0,802	0,459	0,489	0,062	0,277	0,230
MCW165	3	0,808	0,397	0,547	0,275	0,388	0,156
MCW183	7	0,898	0,652	0,719	0,094	0,224	0,144
MCW206	5	0,858	0,617	0,649	0,048	0,182	0,140
MCW216	4	0,785	0,443	0,524	0,154	0,266	0,133
MCW222	4	0,746	0,324	0,390	0,168	0,355	0,224
MCW248	3	0,650	0,265	0,284	0,067	0,223	0,167
MCW295	6	0,831	0,600	0,651	0,079	0,193	0,124
MCW330	6	0,847	0,515	0,576	0,106	0,298	0,215
Média	4,76	0,790	0,523	0,561	0,070	0,225	0,166

NA, número de alelos; PIC, conteúdo de informações polimórficas; Ho, heterozigosidade observada; He, heterozigosidade esperada; FIT, FST e FIS, índices de fixação calculados para cada *locus*. *Desequilíbrio de Hardy-Weinberg altamente significativo ($p < 0,05$).

O conteúdo médio de informações polimórficas dos *loci* foi de 0,790 (Tabela 1), variando de 0,650 (MCW248) a 0,910 (MCW034). Segundo Costa e Lorenzo (2009), valores de PIC acima de 0,5 são apontados como muito informativos. Nossos resultados indicam elevada variabilidade e polimorfismo nas populações avaliadas, além de sugerirem que mais informações genéticas podem ser fornecidas por esses *loci* de marcadores microsatélites. Os valores médios de Ho e He para os 25 *loci* foram de 0,523 (Ho) e 0,561 (He). Os valores de Ho variaram de 0,265 (MCW248) a 0,730 (MCW034); enquanto os valores de He variaram de 0,284 (MCW248) a 0,746 (MCW034). Supõe-se que os valores de heterozigosidade observada e esperada variaram entre os *loci* em decorrência da ação das forças evolutivas, como mutação, podendo afetar os *loci* de maneira diferente, de modo que, eventualmente, mude a quantidade de heterozigosidade (Abebe et al., 2015).

A estatística F calculada para todos os *loci* mostra valores de FIS maiores que 0,1 em cinco *loci* (MCW104, MCW165, MCW216, MCW222 e MCW330), o que sugere excesso de homozigotos. Fis pode apresentar valores que variam de -1 a 1, em que -1 indica que todos os indivíduos são heterozigotos, 0 indica associação de alelos ao acaso e 1 significa que todos os indivíduos são homozigotos (Liu et al., 2008). O valor médio de FST obtido foi de 0,166, indicando diferenciação genética elevada, segundo as definições de Hartl & Clarck (1997) e Wright (1978). Com um valor médio de 0,225, o déficit global de

heterozigidade de indivíduos na população total (FIT) foi significativamente alto ($p < 0,001$).

Para as populações de galinhas nativas pesquisadas, as raças Amarela (6,32) e Pedrês Portuguesa (6,24) apresentaram as maiores médias de alelos. Por outro lado, a raça Mallorca apresentou a menor média de alelos (3,40). Os maiores valores de H_o foram encontrados nas raças Canela-Preta (0,616), Caneluda do Catolé (0,633) e Peloco (0,641), enquanto o menor valor de H_o foi observado para a raça Andaluza Azul (0,388) (Tabela 2). Quanto a H_e , as raças brasileiras, raças portuguesas e Extremeña Azul da Espanha apresentaram as maiores médias, enquanto as raças Mallorca e Andaluza Azul apresentaram as menores médias. Apenas as três raças brasileiras e a raça Mallorca apresentaram equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 2. Número médio de alelos (MNA), heterozigidade observada (H_o), heterozigidade esperada (H_e), teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e índice de fixação de Wright [$1 - (H_o/H_e)$] para as populações estudadas.

População	MNA	H_o	H_e	F	EHW
CP	4,96 ± 0,291	0,616 ± 0,030	0,618 ± 0,029	-0,001 ± 0,019	0,842
CAN	5,04 ± 0,426	0,633 ± 0,029	0,638 ± 0,027	-0,005 ± 0,038	0,176
PEL	4,96 ± 0,344	0,641 ± 0,029	0,625 ± 0,028	-0,032 ± 0,021	0,105
AAZ	4,28 ± 0,398	0,388 ± 0,042	0,425 ± 0,043	0,088 ± 0,032	0,010
CASN	4,80 ± 0,490	0,485 ± 0,037	0,535 ± 0,035	0,110 ± 0,029	0,000
CES	4,80 ± 0,412	0,401 ± 0,046	0,449 ± 0,046	0,122 ± 0,038	0,000
EAZ	5,04 ± 0,398	0,520 ± 0,032	0,601 ± 0,033	0,119 ± 0,031	0,000
IB	4,76 ± 0,401	0,527 ± 0,039	0,590 ± 0,033	0,117 ± 0,035	0,002
MLL	3,40 ± 0,294	0,471 ± 0,054	0,463 ± 0,048	0,007 ± 0,034	0,205
PPA	4,76 ± 0,312	0,462 ± 0,039	0,535 ± 0,040	0,142 ± 0,026	0,000
SUR	4,92 ± 0,378	0,547 ± 0,031	0,588 ± 0,029	0,066 ± 0,028	0,002
UP	4,04 ± 0,308	0,513 ± 0,044	0,517 ± 0,041	0,003 ± 0,030	0,003
AM	6,32 ± 0,594	0,561 ± 0,027	0,672 ± 0,022	0,166 ± 0,030	0,000
BR	5,16 ± 0,438	0,545 ± 0,030	0,617 ± 0,026	0,118 ± 0,033	0,000
PLU	5,08 ± 0,432	0,561 ± 0,034	0,642 ± 0,021	0,126 ± 0,050	0,000
PP	6,24 ± 0,542	0,526 ± 0,035	0,639 ± 0,639	0,176 ± 0,042	0,000

CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorquina; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa.

Numa visão global sobre as raças investigadas, as raças do Brasil, Portugal e Espanha possuem variabilidade intra-racial, com valores médios de H_o e H_e proporcionais e similares. Todas as raças brasileiras apresentaram valores do índice de fixação negativos. Com isto, é apontado que as populações apresentam tendência a heterozigose e estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Assim, pressupõe-se que os acasalamentos estão ocorrendo

ao acaso, uma vez que essas raças pertencem a núcleos de conservação que têm a aleatoriedade dos acasalamentos como primícias da gestão genética das populações.

As raças de galinhas de Portugal apresentaram valores de índice de fixação maiores que 0,1, que tendem a homozigose e apresentaram valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Resultados similares ocorreram para as galinhas das raças espanholas CASN, CES, EAZ, IB e PPA. De acordo com Carvalho et al. (2018) e Fontequé et al. (2014), os desvios de EHW podem ser devido 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. As raças de Portugal e algumas espanholas estão declaradamente em risco de extinção, logo são populações que possuem pequeno número efetivo de animais. Este fator interfere diretamente na estrutura populacional da raça. Essas informações são valiosas para direcionar o manejo genético das populações de galinhas, contribuindo diretamente para sua conservação.

Ceccobelli et al. (2015) encontraram valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg em algumas populações de galinhas nativas da região do mediterrâneo. Abebe et al. (2015) e Fontequé et al. (2014) também encontraram valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg em algumas raças de galinhas da Suécia e em uma população de galinhas que põe ovos azuis do Brasil, respectivamente. As populações de raças nativas têm como característica comum o sistema de criação a campo, em que pequenas criações são mantidas soltas em sistema extensivo. Pode ocorrer que nessas populações se tem pequenos números de indivíduos com algum grau de parentesco.

A raça espanhola Mallorca, apesar de apresentar menores valores de MNA, apresentou valor de H_o (0,471) superior ao valor de H_e (0,463). Isto demonstrando que, apesar da elevada variabilidade genética, não houve diferenças significativas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, o valor de FIS foi baixo (0,007). As raças Andaluza Azul, Sureña e Utrerana Perdiz apresentaram valores significativos para desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

Entender a composição genética dessas populações de galinhas permitirá a elaboração de programas de conservação e melhoramento genético dessas raças. Além disto, será possível realizar o direcionamento apropriado quanto ao manejo genético produtivo e reprodutivo dessas populações, fortalecendo com isso a rede de conservação de raças nativas.

Relações filogenéticas

A matriz de distância de Nei (Tabela 4 - ANEXO) mostra que a raça brasileira CP é mais próxima geneticamente da raça AM de Portugal (0,216) e da raça IB (0,222) da Espanha do que das demais raças brasileiras. A raça brasileira CAN é mais próxima geneticamente da raça brasileira PEL (0,063), seguida da linhagem PES (0,147) e posteriormente das raças portuguesas. A raça PEL, por sua vez, é mais próxima geneticamente da raça PLU (0,156) de Portugal, seguida da linhagem PES (0,159) e, posteriormente, das demais raças portuguesas (Tabela 4 e Figura 2).

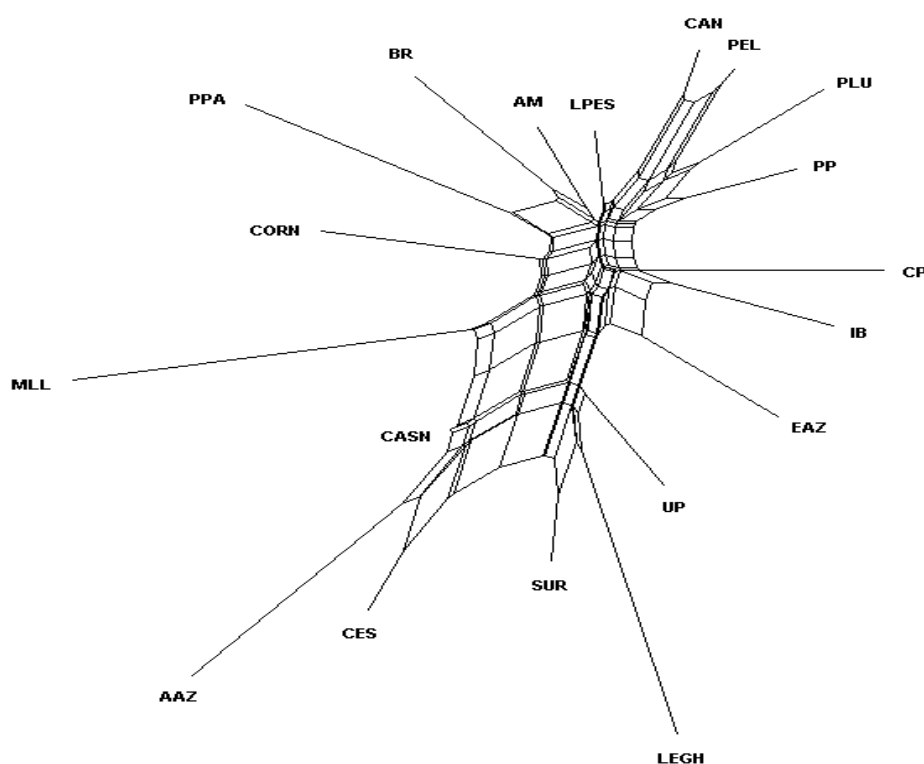


Figura 2. Neighbor-net construído utilizando a distância de Nei entre as 19 raças estudadas. CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorca; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa; LEGH, Leghorn; CORN, Cornsih; LPES, Linhagem Pesadão.

As galinhas CP se assemelham às galinhas de Portugal e Espanha. As raças CAN e PEL tiveram formação na mesma região do estado brasileiro da Bahia, por isso são tão próximas geneticamente. Ambas (CAN e PEL) têm em comum a proximidade com a linhagem PES, que é de origem francesa. A proximidade das raças nativas do Brasil com PES mostra que o tronco formador da linhagem comercial pode ser comum ao das raças brasileiras. As raças do estado da Bahia têm forte proximidade genética com as raças de

Portugal. Isto reforça a teoria de que aves da Península Ibérica podem ter contribuído para a formação das raças brasileiras (Carvalho et al., 2016).

As raças de Portugal e Espanha se agrupam separadamente, com exceção da raça Ibicenca da Espanha, que é mais similar geneticamente à raça Pedrês portuguesa (0,170) do que às demais raças espanholas. Estas relações filogenéticas são demonstradas na Figura 2.

Diferenciação genética entre raças e indivíduos

A estatística F calculada para todos os *loci* apresentou valores médios de Fis igual a 0,097 e Fit igual a 0,245, o que demonstra tendência a homozigose nas populações estudadas. Estes resultados podem ser justificados pelo fato de que parte desses grupos genéticos está incluída em núcleos de conservação, com origem em uma população com poucos fundadores. O valor médio de Fst foi 0,165, o que indica diferenciação genética elevada entre as raças (Tabela 3).

Tabela 3. Estatística da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando 25 loci de microssatélites nos 19 grupos genéticos estudados.

F. Var.	GL	SQ	QM	C. Var.	%T	F (p-valor)
EP	18	2292,088	127,338	1,398	16%	Fst=0,165 ¹ (0,010)
EI	797	6190,593	7,767	0,684	9%	Fit=0,245 ² (0,010)
DI	816	5222,000	6,400	6,400	75%	Fis=0,097 ³ (0,010)
Total	1631	13704,680	-	8,482	100%	-

F.Var., fonte de variação; GL, graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; QM, quadrado médio; C. Var., componentes de variação; %T, porcentagem da variância total contribuída por cada componente; EP, entre populações; EI, entre indivíduos; DI, dentro de indivíduos; ¹ Índice de fixação entre núcleos; ² Índice de fixação entre indivíduos; ³ Índice de fixação dentro de indivíduos.

A análise de variância molecular (AMOVA) revelou variabilidade genética entre e dentro dos grupos amostrados, porém, com maior diferença dentro das populações (75%) do que entre (25%) (Tabela 3). Estes resultados são similares aos verificados em grande parte dos estudos de diversidade disponíveis na literatura, onde a variabilidade genética dentro das populações é, geralmente, maior que entre populações. Em um estudo de comparação de 65 populações de galinhas com uso de marcadores moleculares microssatélites, Granevitze et al. (2007) mostraram valores de 34% de variação entre raças e 66% dentro de raças. Em um estudo do mesmo tipo, com cinco raças de galinhas nativas italianas, Ceccobelli et al. (2013) obtiveram 32,17% de variação entre raças e 67,83% dentro de raças.

As variações genéticas dentro da população são relevantes para qualquer espécie, pois favorecem o processo de especialização, e também representam um dos pilares para elaboração de programas de conservação, utilização e melhoramento genético das raças. As raças de galinhas dos países estudados possuem diferenciação genética classificada como elevada, o que demonstra a riqueza genética da sub-espécie *Gallus gallus domesticus* nestes países.

Estrutura genética das raças

A estrutura de populações, embasada pelo método Bayesiano, sugeriu o maior valor médio ΔK , em que $K = 17$ (Figura 3). Esses resultados indicam que a análise de agrupamento do programa STRUCTURE pode proporcionar representações precisas das relações genéticas existentes entre as raças de galinhas do Brasil, Portugal, Espanha e variedades comerciais, o que sugere que existem 17 subgrupos genéticos. As três raças brasileiras se agrupam em dois grupos, um formado pela raça CP e outro pelas raças CAN e PEL. As quatro raças de Portugal compartilham combinações gênicas entre elas, mas se agrupam conforme cada raça. Todas as nove raças da Espanha apresentam padrão genético definido e se agrupam por raça. As variedades comerciais CORN e LEGH apresentam-se como grupos definidos, já a linhagem industrial PES não se define como grupo, pois compartilha combinações gênicas com várias raças, o que é compreensível por essa ser uma linhagem formada a partir do cruzamento de distintos materiais genéticos europeus.

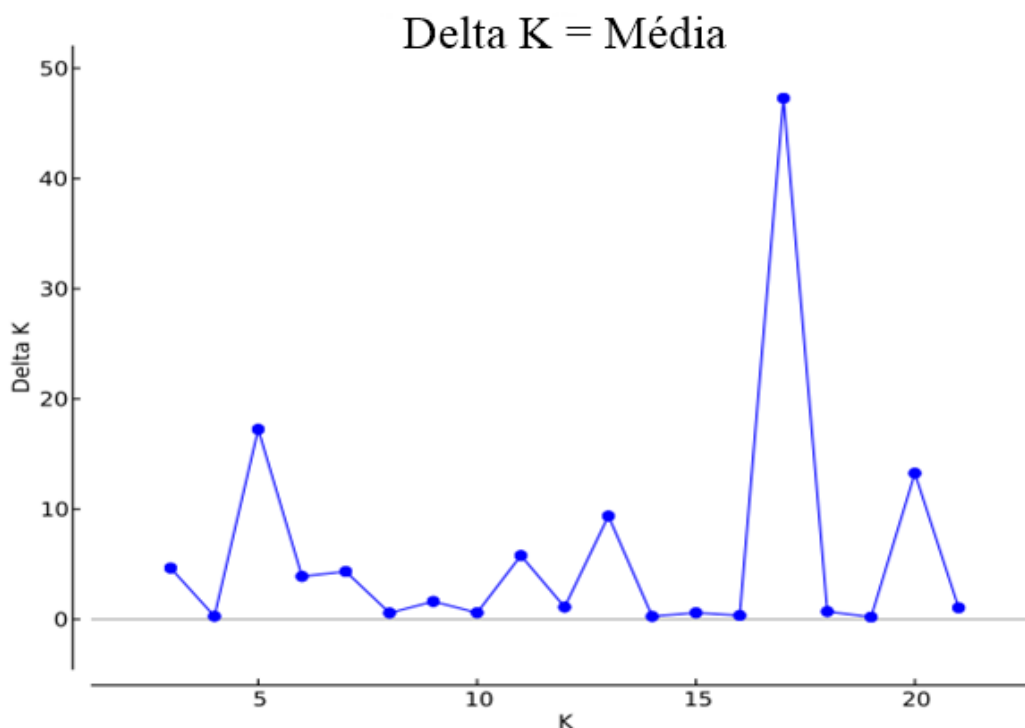


Figura 3. Representação gráfica do valor de K ótimo para a formação dos grupos de galinhas estudados, baseado na análise do programa STRUCTURE.

Outros autores têm usado inferência Bayesiana para analisar estruturas de populações de galinhas (Abebe et al., 2015; Ceccobelli et al., 2015; Kumar et al., 2015; Carvalho et al., 2016) e têm apresentado esta como uma técnica eficiente.

As raças nativas incluídas neste estudo têm estrutura genética definida. Isto mostra a riqueza genética dessas aves, que são tão importantes para os programas de conservação de recursos genéticos mundiais. Para $K = 19$ (quantidade de grupos genéticos em estudo), observa-se que as raças mantêm tendência similar a $K = 17$, com ligeiras alterações na composição genética apenas das raças CASN, PPA, PLU, PP e LPES. Para $K = 22$ (maior K testado) não ocorrem muitas alterações e as aves continuam a se agrupar de forma similar aos demais K, com algumas alterações gênicas dentro de alguns grupos genéticos já citados acima e em relação às raças EAZ e UP (Figura 4).

A análise discriminante de componentes principais corrobora com os resultados do STRUCTURE, em que também sugere a formação de 17 grupos genéticos (Figuras 5 e 6). Estes resultados fortalecerão os programas de conservação de recursos genéticos de cada país envolvido nesta pesquisa. Isto também demonstra a relevância genética das aves nativas e reforça a necessidade de conservá-las, pois estas constituem verdadeiros patrimônios genéticos.

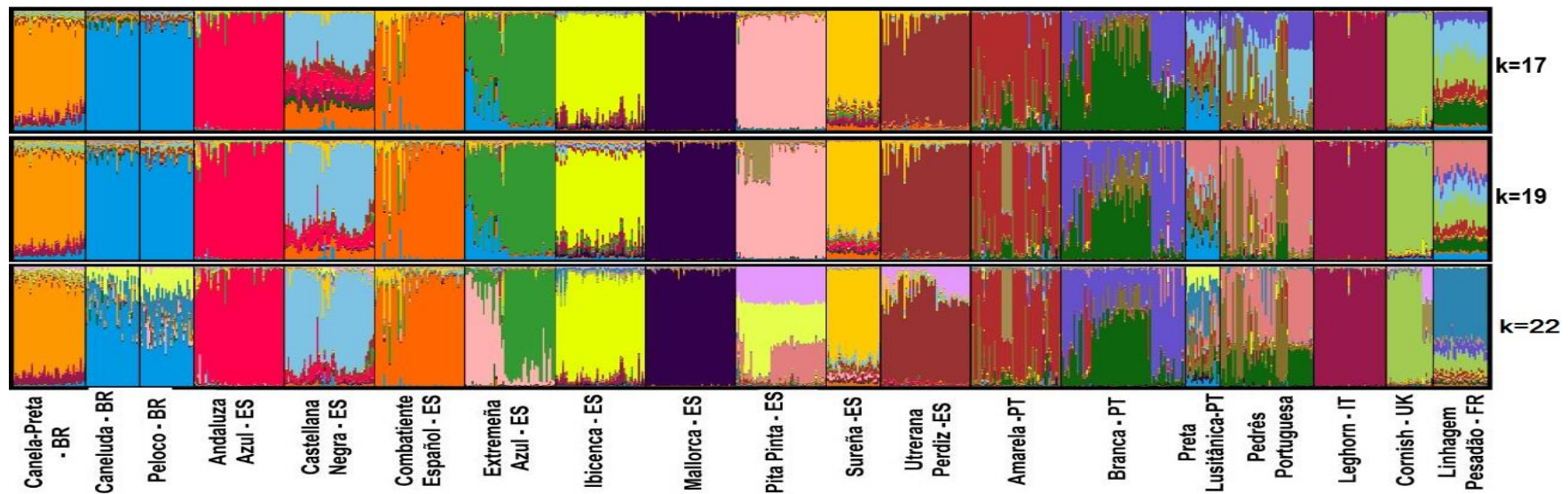


Figura 4. Análise de estrutura populacional realizado no software STRUCTURE com 816 indivíduos, representando os 19 grupos de galinhas investigados (16 raças nativas e 3 grupos controles) com base em 25 marcadores microssatélites.

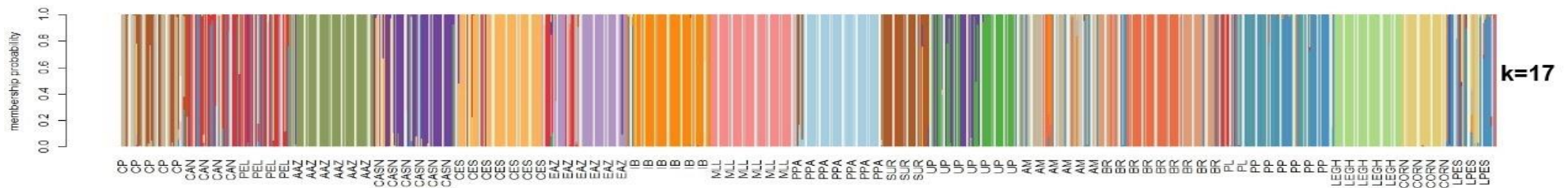


Figura 5. Análise discriminante de componentes principais realizada no programa R com 816 indivíduos, representando os 19 grupos de galinhas investigados (16 raças nativas e 3 grupos controles) com base em 25 marcadores de microssatélites. CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorca; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa; LEGH, Leghorn; CORN, Cornish; LPES, Linhagem Pesadão.

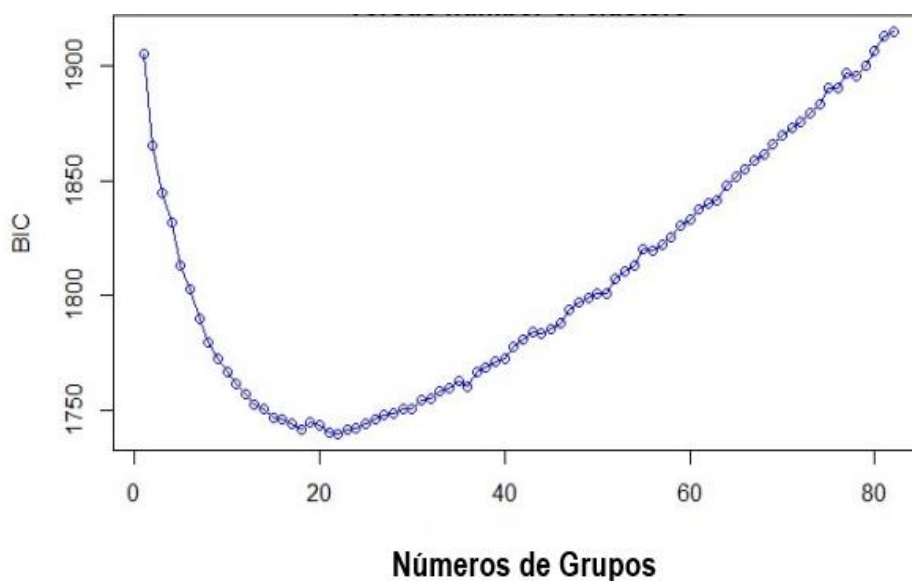


Figura 6. Representação gráfica do melhor número de *clusters* para a formação dos grupos de galinhas estudados, baseado na análise de componentes principais.

Conclusões

1. As raças de galinhas nativas dos países Brasil, Portugal e Espanha apresentam elevada variabilidade genética.
2. As raças brasileiras têm relação genética, principalmente, com as raças portuguesas e singela relação com as raças espanholas.
3. As raças nativas dos países investigados não se agrupam com matérias comerciais.
4. As raças de cada país contêm estruturas genéticas únicas, o que demonstra a riqueza genética da espécie *Gallus gallus* nesses países.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro da CAPES, UFPI, UESB, INIAV e UCO.

Referências

ABEBE, A.S.; MIKKO, S.; JOHANSSON, A.M. Genetic diversity of five local Swedish chicken breeds detected by microsatellite markers. **PLoS One**, v.10, n.4, e0120580, 2015.

BESBES, B.; TIXIER-BOICHARD, M.; HOFFMANN, I.; JAIN, G.L. **Future trends for poultry genetic resources**. In: Proceedings of the International Conference of Poultry in the 21st Century: Avian Influenza and Beyond (pp. 5-7). 2007.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; ALMEIDA, M.J.O.; SARMENTO, J.L.R.; BRITTO, F.B.; SILVA, M.A. Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas nativas Canela-Preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.11, p.1899-1906, 2016.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; ALMEIDA, M.J.O.; SARMENTO, J.L.R.; BRITTO, F.B.; SILVA, M.A. Genetic variability of twelve microsatellite loci in native Canela-Preta chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1275-1281, 2018.

CECCOBELLI, S.; LORENZO, P.D.; LANCIONI, H.; CASTELLINI, C.; IBÁÑEZ, L.V.M.; SABBIONI, A.; SARTI, F.M.; WEIGEND, S.; LASAGNA, E. Phylogeny, genetic relationships and population structure of five Italian local chicken breeds. **Italian Journal of Animal Science**, v.12, n.3, e66, 2013.

CECCOBELLI, S.; LORENZO, P.D.; LANCIONI, H.; IBÁÑEZ, L.V.M.; TEJEDOR, M.T.; CASTELLINI, C.; LANDI, V.; MARTÍNEZ MARTÍNEZ, A.; DELGADO BERMEJO, J.V.; VEGA PLA, J.L.; LEON JURADO, J.M.; GARCÍA, N.; ATTARD, G.; GRIMAL, A.; STOJANOVIC, S.; KUME, K.; PANELLA, F.; WEIGEND, S.; LASAGNA, E. Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. **Livestock Science**, v.175, p.27-36, 2015.

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, Supl.1, p.46-51, 2009.

DGAV. Direção Geral da Agricultura e Veterinária. **Raças autóctones portuguesas**. Lisboa: ISSN: 978-972-99044-4-8. 2013.

EARL, D.; VONHOLDT, B.M. Structure harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v.4, n.2, p.359-361, 2012.

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**, v.131, p.479-491, 1992.

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**, v.34, n.1, p.98-102, 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture**. Edi: Barbara Risch Kowsky & Dafydd Pilling. Rome. Italy, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a1250e/a1250e.pdf>>. Acessado em: 10 Out. 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -FAO. **Molecular genetic characterization of animal genetic resources**. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome. 2011.

GRANEVITZE, Z.; HILLEL, J.; CHEN, G.H.; CUC, N.T.K.; FELDMAN, M.; EDING, H.; WEIGEND, S. Genetic diversity within chicken populations from different continents and management histories. **Animal Genetics**, v.38, p.576-583, 2007.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. 3rd edition. Sinauer Associates, Sunderland, 481pp. 1997.

HOFFMANN, I. The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources. **World's Poultry Science Journal**, v.65, n.2, p.286-297, 2009.

HUSON, D.H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular Biology and Evolution**, v.23, p.254-267, 2005.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v.11, n.94, 2010.

KOPELMAN, N.M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A.; MAYROSE, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v.15, n.5, p.1179-1191, 2015.

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**, v.26, n.3, p.201-210, 2015.

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. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.12, p.1237-1241, 2008.

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

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Alimentação, Espanha. **Catálogo oficial de razas**. Disponível em: <<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/zootecnia/razas-ganaderas/razas/catalogo/>. 2019>. Acesso em: 2 de Nov. 2019.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, ROLAND.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294–307, 2006.

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

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

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Version 3.0.2. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. 2012.

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

ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete reimplementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology**, v.8, p.103-106, 2008.

TOALOMBO VARGAS, P.A.; LEÓN, J.M.; ORTEGA, L.R.F.; MARTINEZ, A.; GAVILANES, A.A.V.; DELGADO, J.V.; LANDI, V. Deciphering the patterns of genetic admixture and diversity in the Ecuadorian Creole chicken. **Animals**, v.9, n.9, 670, 2019.

WALSH, P.S.; VARLARO, J.; REYNOLDS, R. A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.5061–5065, 1992.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population**. v.4. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.

ZANETTI, E.; MARCHI, M.D.; DALVIT, C.; CASSANDRO, M. Genetic characterisation of Italian chickens undergoing in situ conservation. **Poultry Science**, v.89, p.420-427, 2010.

ANEXOS

Tabela 4. Matriz de distância de Nei, representando os 19 grupos de galinhas investigados (16 raças nativas e 3 grupos controles) com base em 25 marcadores microssatélites.

G. G.	CP	CAN	PEL	AAZ	CASN	CES	EAZ	IB	MLL	PPA	SUR	UP	AM	BR	PLU	PP	LEGH	CORN	LPES
CAN	0,268	-																	
PEL	0,244	0,063	-																
AAZ	0,423	0,490	0,542	-															
CASN	0,263	0,263	0,270	0,175	-														
CES	0,336	0,412	0,410	0,225	0,113	-													
EAZ	0,293	0,271	0,259	0,370	0,196	0,313	-												
IB	0,222	0,233	0,233	0,412	0,262	0,393	0,199	-											
MLL	0,419	0,396	0,407	0,399	0,269	0,405	0,386	0,362	-										
PPA	0,314	0,295	0,294	0,358	0,327	0,388	0,345	0,301	0,435	-									
SUR	0,256	0,336	0,340	0,351	0,189	0,197	0,252	0,275	0,460	0,439	-								
UP	0,289	0,291	0,246	0,313	0,131	0,216	0,213	0,311	0,327	0,363	0,239	-							
AM	0,216	0,209	0,192	0,414	0,216	0,316	0,229	0,198	0,313	0,248	0,238	0,269							
BR	0,334	0,222	0,229	0,506	0,285	0,369	0,273	0,269	0,430	0,257	0,278	0,299	0,162	-					
PLU	0,276	0,198	0,156	0,540	0,266	0,429	0,251	0,296	0,384	0,317	0,325	0,283	0,197	0,251	-				
PP	0,242	0,198	0,174	0,501	0,250	0,428	0,249	0,170	0,376	0,287	0,286	0,292	0,153	0,200	0,163	-			
LEGH	0,356	0,457	0,420	0,437	0,280	0,377	0,381	0,402	0,540	0,581	0,256	0,278	0,388	0,480	0,457	0,348	-		
CORN	0,271	0,224	0,240	0,457	0,237	0,367	0,303	0,249	0,343	0,308	0,308	0,258	0,234	0,278	0,269	0,241	0,397	-	
LPES	0,250	0,147	0,159	0,433	0,171	0,306	0,212	0,176	0,363	0,257	0,269	0,229	0,152	0,158	0,202	0,156	0,370	0,178	-

CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorca; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa; LEGH, Leghorn; CORN, Cornsih; LPES, Linhagem Pesadão.

CAPÍTULO 6

Decifrando a origem e diversidade genética de três raças nativas de galinhas do Nordeste do Brasil

Deciphering the origin and genetic diversity of three native chicken breeds from northeastern Brazil

Abstract - This study aimed to decipher the possible phylogenetic origins of three chicken breeds from northeastern Brazil and estimate their genetic structure and variability. A total of 100 samples of the following breeds were used: Canela-Preta (Piauí, n = 40); Caneluda do Catolé (Bahia, n = 30); and Peloco (Bahia, n = 30). For the markers analyses, we used information of the D-Loop region of the mitochondrial DNA (mtDNA) and 25 microsatellites. The evolutionary relationships of the sequences were assessed using the median junction network including the three Brazilian breeds; nine haplotypes of China and Eurasia; two sequences of chickens native from Egypt; and four sequences of the subspecies *Gallus gallus murghi*, *Gallus gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus*, and *Gallus gallus bankiva* as reference. For the statistic analysis of microsatellites we constructed a dataset considering 20 chicken breeds (including breeds from Spain, Portugal, Nigeria, Chile, and commercial strains) for evaluation of population relationship and gene flow. The three populations of Brazilian chickens are polymorphic. The results based on polymorphism of the mtDNA sequence indicate that the genetic variation among individuals in the breeds was 74.53%, whereas the genetic variation among breeds was 25.47% ($p < 0.001$), which suggests categorical particularization among the three Brazilian breeds. The subspecies closest to the Brazilian chickens are *Gallus gallus murghi* and *Gallus gallus gallus*. The values of population parameters suggest that there is genetic variability in the Brazilian breeds and that these chickens are close to which could be expected under random mating. The results of microsatellite and mtDNA analyses indicate multiple origins for the chicken breeds from Brazil. At the level of nuclear DNA, the Brazilian breeds have high genetic variability. The three Brazilian populations are genetically structured and have multiple genetic relationships.

Index terms: D-Loop, free-range chicken, *Gallus gallus*, genetic resources, microsatellites, mtDNA.

Decifrando a origem e diversidade genética de três raças nativas de galinhas do Nordeste do Brasil

Resumo - Este estudo teve como objetivo decifrar as possíveis origens filogenéticas de três raças de galinhas do Nordeste do Brasil e estimar a estrutura e variabilidade genética destas. Um total de 100 amostras das seguintes raças foi utilizado para a execução das análises experimentais: Canela-Preta (Piauí, n = 40); Caneluda do Catolé (Bahia, n = 30); e Peloco (Bahia, n = 30). Para as análises de marcadores, foram utilizadas informações da região D-Loop do DNA mitocondrial (mtDNA) e de 25 microssatélites. As relações evolutivas das sequências foram avaliadas por meio da rede de junção mediana incluindo as três raças brasileiras de galinhas; nove haplótipos da região chinesa e da Eurásia; duas sequências de galinhas nativas do Egito; e quatro sequências das subespécies *Gallus gallus murghi*, *Gallus gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus* e *Gallus gallus bankiva* como referências. Para análise estatística de microssatélites, foi construído um conjunto de dados considerando 20 raças de galinhas (incluindo raças da Espanha, Portugal, Nigéria, Chile e variedades comerciais) para avaliação da relação populacional e do fluxo gênico. As três populações de galinhas brasileiras apresentaram-se polimórficas. Os resultados baseados no polimorfismo da sequência do mtDNA apontam que a variação genética entre os indivíduos nas raças foi de 74,53%, enquanto a variação genética entre as raças foi de 25,47% ($p < 0,001$), o que sugere uma particularização categórica entre as três raças de galinhas do Brasil. As subespécies mais próximas das galinhas brasileiras são *Gallus gallus murghi* e *Gallus gallus gallus*. Os valores de parâmetros populacionais sugerem que há variabilidade genética nas raças brasileiras e que estas estão próximas do que pode ser esperado sob acasalamento aleatório. Os resultados de análises de microssatélites e DNA mitocondrial apontam múltiplas origens para as raças de galinhas do Brasil. Em nível de DNA nuclear, as raças brasileiras apresentam-se com elevada variabilidade genética. As três populações brasileiras estão geneticamente estruturadas e têm múltiplas relações genéticas.

Termos para indexação: *D-Loop*, galinha caipira, *Gallus gallus*, microssatélites, mtDNA, recursos genéticos.

Introdução

As raças de galinhas brasileiras têm importância histórica, cultural, genética e econômica, além de representarem um patrimônio genético do Brasil. Essas raças nativas são criadas, principalmente, por pequenos agricultores e têm papel relevante na alimentação tradicional das famílias, bem como fonte de renda para esses agricultores. A produção desse tipo de aves está distribuída em todo o território nacional. Seus produtos (carne e ovos) são muito apreciados pela população local. Essas aves são caracterizadas, principalmente, por serem menos susceptíveis a doenças e tolerantes às condições ambientais do Brasil (Fonteque et al., 2014; Carvalho et al., 2016).

A introdução indiscriminada de raças de galinhas exóticas nos quintais dos pequenos agricultores tem causado a erosão genética das raças nativas, o que reforça a necessidade de estudos de caracterização das galinhas brasileiras. Acredita-se que as raças brasileiras são oriundas de galinhas dos países da Península Ibérica trazidas em meados do ano de 1500, no advento da colonização do Brasil (Carvalho et al., 2017). Contudo, a origem das galinhas nativas (*Gallus gallus*) no continente americano ainda é incerta (Toalombo Vargas et al., 2019).

Apesar da importante contribuição dos europeus na formação das raças de galinhas de países da América, no século XV, alguns grupos de pesquisadores entendem que as galinhas já existiam na América ainda na civilização pré-Colombiana. De acordo com alguns autores, essa teoria é respaldada pelo documento em que o colonizador Francisco Pizarro descreve a presença de galinhas que produzem ovos azuis em comunidades indígenas da América do Sul. Em relação às galinhas Araucanas, no caso do Chile, a relativa proximidade geográfica entre este país e os arquipélagos do Pacífico poderia justificar algum tipo de comércio com a Polinésia, antes mesmo da colonização da América (Gongora et al., 2008; Dancause et al., 2011; Toalombo Vargas et al., 2019).

Assim, o que se pode inferir é que as raças nativas de galinhas atuais foram formadas, provavelmente, da contribuição genética de diferentes regiões do mundo. Isto pode ser observado pela elevada variabilidade genética que essas raças possuem e pela adaptação dessas raças a condições edafoclimáticas adversas, o que as potencializa para uso sustentável no sistema de criação tradicional a campo. Além disso, essas raças detêm uma riqueza genética que poderá contribuir na agropecuária no futuro na formação de novas linhagens menos susceptíveis às condições adversas de clima. Contudo, ainda há poucos estudos sobre o potencial e caracterização genética dessas aves. No Brasil, a

maioria das raças nativas de galinhas está em risco desconhecido de extinção. A ausência de políticas públicas em favor desse tipo de aves e a introdução atual de raças exóticas têm ameaçado as raças nativas, realidade descrita em vários países na América (Gongora et al., 2008; Carvalho et al., 2018; Toalombo Vargas et al., 2019).

Dado o exposto, esta pesquisa teve o intuito de decifrar as possíveis origens filogenéticas de três raças de galinhas do Nordeste do Brasil e estimar a estrutura e variabilidade genética destas, para desenvolver a estrutura genética básica para a conservação, avaliação e reconhecimento geral dessas raças.

Materiais e Métodos

Declaração de ética

O projeto proposto foi cadastrado no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, Brasil Nº 399/17.

Amostragem e áreas de coleta

Esta pesquisa foi realizada na Universidade Federal do Piauí - Brasil (UFPI), em parceria com a Universidade Estadual do Maranhão - Brasil (UEMA), Universidade de Córdoba – Espanha (UCO) e do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária – Portugal (INIAV). Um total de 100 amostras foi utilizado para execução das análises experimentais, sendo 40 da raça Canela-Preta (Piauí/BRA), 30 da raça Caneluda do Catolé (Bahia/BRA) e 30 da raça Peloco (Bahia/BRA). Os estados brasileiros selecionados para realização da pesquisa encontram-se descritos na Figura 1.

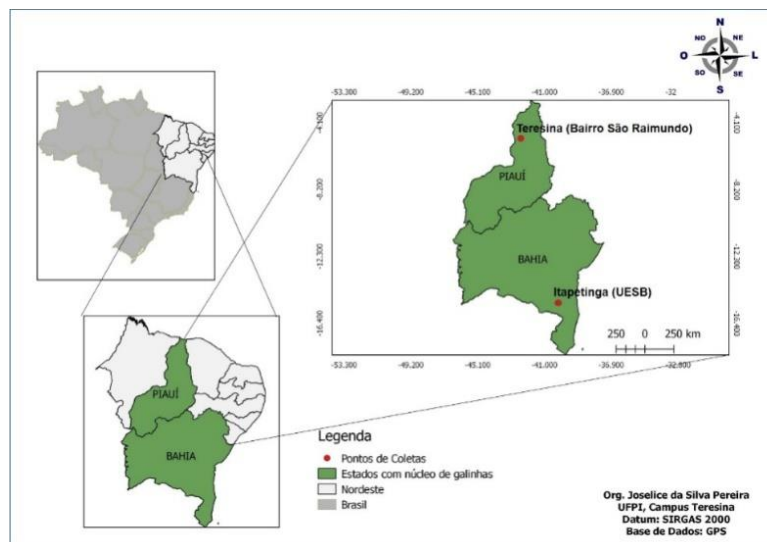


Figura 1. Mapa da localização dos estados onde cada amostra de galinha das raças brasileiras foi coletada dentro da região Nordeste.

A coleta de material biológico (sangue) foi realizada nos núcleos de conservação das raças brasileiras nos municípios de Teresina/PI (Canela-Preta) e Itapetinga/BA (Caneluda do Catolé e Peloco). As amostras de sangue foram retiradas da veia ulnar das aves e postas sobre papel filtro. Após a secagem do sangue sobre os papéis em ambiente natural, estes foram colocados dentro de envelope, identificados com as informações de cada ave e armazenados no banco de germoplasma do laboratório de genética do Departamento de Zootecnia da UFPI.

Análises dos marcadores

Análise da região D-Loop do mtDNA

Os procedimentos laboratoriais foram realizados no Laboratório de Genética Animal do Departamento de Zootecnia da UFPI e laboratório de Genética e Biologia Molecular da UEMA, Campus Caxias. No total, 47 amostras das três raças de galinhas brasileiras (16 Canela-Preta, 16 Caneluda do Catolé e 15 Peloco) foram escolhidas aleatoriamente. Para a extração do DNA, foi utilizado o Kit DNEASY *Blood and Tissue* da QIAGEN®. O procedimento para extração foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

Para amplificação das sequências, foi desenhado um par de primers a partir da posição nucleotídica 16,750 a 506 pb (pares de base), localizada na região controladora

D-loop do mtDNA, envolvendo uma parte hipervariável desta região (Número de acesso no Genbank: NC007236.1 (Nishibori et al., 2005)). A escolha por esta região do mtDNA, foi devido ao fato desta ter sido utilizada em diferentes trabalhos envolvendo algumas raças de galinhas, o que permitiria a imediata comparação das sequências geradas neste trabalho. Para desenho do par de primers, foi utilizado o software Gene Runner 5.1, tendo a sequência **F:** GCCATTGTTGTTCTCAACTACG e **R:** TACGGTGGGAAGGCAAGTAGG, gerando um fragmento de 522 pb.

Amplificações via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi empregada para procedimento de amplificação dos fragmentos. As reações de PCR seguiram o seguinte perfil: em um volume final de 16,0 µL, cada reação continha 3,0 µL de DNA, 1,0µL de tampão 10X (100 mMTrisHCl, pH 8,3, 500 mMKCl), 3,0 µL (50 mM) de MgCl₂, 2,0 µL da mistura de dNTP (0,2 mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,96µL de cada iniciador, 0,2 µL unidade de *Taq* DNA polimerase e água ultra-pura para completar o volume das reações.

A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para desnaturação, 45 segundos a 62°C para hibridização e 50 segundos a 72°C para extensão. Ao final, foi realizada uma etapa de extensão de 7 minutos a 72°C. A amplificação dos fragmentos de DNA foi confirmada pela corrida em gel de agarose a 2,0%, corado com brometo de etídio, com posterior visualização em transluminador UV.

Purificação das amostras amplificadas

Após a amplificação e corrida das amostras em gel de agarose, os produtos da PCR foram purificados com o kit “*ExoSap-IT*” (*USB Corporation*), conforme recomendações do fabricante.

Reação de sequenciamento

Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento de DNA, segundo o método de Sanger, Nicklen e Coulson (1977), realizada com o Kit “Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (*Applied Biosystems*). A reação consistiu de um volume final de 10µl: 1,5µl do produto amplificado, 2µl de primer (Forward ou Reverse, 0,8 pmol/µl), 1µl de Big Dye, 1,5µl de Tampão 5X para

sequenciamento (kit Big Dye) e 4µl de água de injeção para completar o volume da reação. As reações de sequenciamento foram realizadas em uma placa com 96 poços, utilizando-se um termociclador e um programa com os seguintes ciclos: 35 ciclos de 96°C por 60 segundos, 96°C por 15 segundos e 60°C por quatro minutos. Os primers utilizados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação de PCR para amplificação dos produtos. Ambas as direções (5' e 3') foram sequenciadas.

Precipitação em EDTA/etanol

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas para retirar o excesso de reagentes não incorporados. O protocolo para precipitação da reação de sequência compreendeu as seguintes etapas: submeter a placa a um *spin* (centrífuga de placa); adicionar 2,5µl de EDTA (125 mM); vedar a placa e submeter a um *spin*; adicionar 30µl de etanol 100%; vedar a placa e misturar invertendo 4-5x; envolver a placa em papel alumínio e deixar em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos (centrífuga refrigerada 4° C); centrifugar a 4.000 rpm por 30 minutos; inverter bruscamente a placa para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente; centrifugar a placa invertida por 15 segundos a 1.150 rpm; adicionar 30µl de etanol a 70%; vedar a placa; centrifugar a 3.440 rpm por 15 segundos (centrífuga refrigerada 4° C); inverter bruscamente para descartar o álcool e secar sobre o papel absorvente; centrifugar a placa invertida por 1 minuto a 1.150 rpm; e deixar a placa na estufa a 37°C por aproximadamente 10 minutos para evaporar o excesso de álcool.

Sequenciamento

Após a precipitação em cada amostra, foram adicionados 10µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), seguido de uma etapa de desnaturação das amostras a 95°C por dois minutos. Em seguida, as amostras foram analisadas em sequenciador de DNA automático (modelo ABI 3500/Life Technologies). As sequências foram alinhadas no programa CLUSTALW (Thompson et al., 1994) do programa BIOEDIT, versão 7.0.5.2 (Hall, 1999), e editadas manualmente.

Análises estatísticas e genéticas do mtDNA

Índices como número de haplótipos, diversidade de haplotípica (Hd), diversidade de nucleotídeos (π) e número de sítios segregantes por raça foram estimados pelo *software* DnaSP 5.10.01 (Librado & Rozas, 2009). O *software* ARLEQUIN 3.1 foi aplicado para

realizar uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA), a fim de analisar a partição da diversidade genética dentro e entre as três raças brasileiras de galinhas (Excoffier et al., 1992). Os cálculos foram realizados com base em 1.000 permutações.

As relações evolutivas das sequências foram avaliadas por meio da rede de junção mediana construída usando o software Network 4.6 (www.fluxus-engineering.com). A rede também incluiu nove haplótipos representando os principais clados (clados A a I) da região chinesa e da Eurásia (Liu et al., 2006), duas sequências de galinhas nativas do Egito – África do Norte (Osman et al., 2016) e quatro sequências, sendo uma de cada subespécie (*Gallus gallus murghi*, *Gallus gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus* e *Gallus gallus bankiva*) da espécie *Gallus gallus*, antecessoras da subespécie *Gallus gallus domesticus* (Kanginakudru et al., 2008), como referências. Os haplótipos do *GenBank* foram alinhados com os haplótipos observados neste estudo.

Marcador molecular microssatélite

Foram utilizados, no total, 100 indivíduos das três raças brasileiras para o estudo com microssatélites. Utilizou-se fragmentos de cada amostra para o procedimento de extração de DNA genômico. Os procedimentos de extração do DNA foram realizados seguindo a metodologia de Walsh et al. (1992), com algumas modificações. Três círculos foram cortados dos papéis filtros expostos a uma superfície plana, usando um perfurador Harris Micro de 2 mm (GE Healthcare Life Science, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido), que foi limpo com solução de alvejante a 1% entre cada amostra. Os círculos foram colocados em uma placa de PCR e incubados com 100 µL de uma solução de resina *Chelex* a 5% (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Em seguida, os círculos foram incubados em termociclador a 95°C por 15 minutos, 60°C por 15 minutos e, finalmente, 99°C por 3 min. O lisado foi removido e congelado a -20°C até o uso.

Utilizou-se um total de 25 marcadores microssatélites do projeto AVIANDIV (<http://aviandiv.tzv.fal.de>), todos recomendados pela FAO (2011): ADL112, ADL268, ADL278, LEIO094, LEIO166, MCW016, MCW020, MCW034, MCW037, MCW067, MCW069, MCW078, MCW081, MCW103, MCW104, MCW111, MCW123, MCW165, MCW183, MCW206, MCW216, MCW222, MCW248, MCW295 e MCW330. A amplificação dos fragmentos de DNA desejados realizada pela técnica de PCR, bem como as condições de eletroforese foram realizadas conforme descrito por Ceccobelli et al. (2013). Os genótipos foram lidos com o ABI PRISM GeneScan 3.1.2 (Applied

Biosystems, Forster City, CA, EUA) e interpretados com o ABI PRISM Genotyper 3.7 NT (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA).

Análises estatísticas e genéticas dos microssatélites

Para análise estatística de microssatélites, foi construído um conjunto de dados considerando 20 raças de galinhas para avaliação da relação populacional e do fluxo gênico, incluindo como grupos externos nove raças da Espanha (incluindo o arquipélago das Baleares), quatro de Portugal, uma da Nigéria, uma raça nativa do Chile e, finalmente, duas variedades comerciais (Tabela 1). As siglas das raças utilizadas são as seguintes: CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorca; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; ARAU, Araucana; NIG, galinhas da Nigéria; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa; LEGH, Leghorn; e CORN, Cornish. Também foi realizada análise de estrutura genética das galinhas brasileiras, considerando cada raça a fim de estudar a diversidade e possíveis fluxos gênicos dessas populações dentro do Brasil.

Tabela 1. Informações de raças por países e quantidade de indivíduos utilizados por raça estudada.

Raça	Abreviatura	País	Tamanho amostral
Canela-Preta	CP	Brasil	51
Caneluda do Catolé	CAN	Brasil	31
Peloco	PEL	Brasil	30
Andaluza Azul	AAZ	Espanha	50
Castellana Negra	CASN	Espanha	50
Combatiente Español	CES	Espanha	50
Extremeña Azul	EAZ	Espanha	50
Ibicenca	IB	Espanha	50
Mallorquina	MLL	Espanha	50
Pita Pinta	PPA	Espanha	50
Sureña	SUR	Espanha	30
Utrerana Perdiz	UP	Espanha	50
Leghorn	LEGH	Itália	49
Cornish	CORN	Reino Unido	26
Araucana	ARAU	Chile	50
Galinhas nigerianas	NIG	Nigéria	50
Amarela	AM	Portugal	50
Branca	BR	Portugal	69
Preta Lusitânica	PL	Portugal	19
Pedrês Portuguesa	PP	Portugal	52

As estimativas de número de alelos (N_a), número de alelos efetivos (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade esperada com fator de correção para tamanho amostral (U_{He}), F - índice de fixação de Wright [$1 - (H_o/H_e)$] e matriz de distância genética de Nei foram realizadas no programa GenAlEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2012).

A rede de vizinhos (*Neighbor-net*) foi construída conforme implementada no software *SplitsTree4* (Huson & Bryant, 2005), a fim de representar graficamente as relações entre raças e representar possíveis evidências de mistura.

O programa STRUCTURE versão 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para definir o número de grupos mais provável (K) nas amostras referentes às raças do Brasil, por meio de métodos Bayesianos com informações *a priori* sobre a origem das amostras. Foram utilizadas 350.000 simulações de Cadeias de Markov Monte Carlo com *burn in* de 150.000, modelo de ancestralidade *admixture*, sem informações *a priori* e testados valores de K variando de 1 a 5, com 10 iterações para análises das três raças brasileiras.

O programa CLUMPAK (Kopelman et al., 2015) foi usado para analisar a estabilidade entre as 10 simulações para o valor de K .

Resultados e Discussão

Filogenia das raças a partir do DNA Mitocondrial

Este é o primeiro estudo que aborda a filogenia de três raças de galinhas nativas do Nordeste do Brasil deduzidas a partir da região *D-Loop* do mtDNA. As três populações de galinhas estudadas apresentaram-se polimórficas, com quantitativo de haplótipos (nh) por raça variando de 2 (Canela-Preta) a 6 (Peloco) (Tabela 2).

Tabela 2. Diversidade mtDNA de três raças de galinhas brasileiras.

	N	π	nh	Hd	S
CP	16	0,00048 ± 0,00041	2	0,125 ± 0,106	2
CAN	16	0,00048 ± 0,00028	3	0,242 ± 0,135	2
PEL	15	0,00806 ± 0,00140	4	0,743 ± 0,064	9
Total	47	0,00357 ± 0,00104	6	0,487 ± 0,081	11

N, número de sequências utilizadas; π , diversidade nucleotídica; nh , número de haplótipos; Hd, diversidade haplotípica; S, número de sítios segregantes por raça; CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco.

A maior diversidade de haplótipos (Hd) foi encontrada na raça Peloco (0,743 ± 0,064), enquanto o menor valor foi observado para a raça Canela-Preta (0,125 ± 0,106)

(Tabela 2). As estimativas de diversidade de haplótipos das raças investigadas neste estudo foram semelhantes às observadas em raças de galinhas italianas por Ceccobelli et al. (2013).

O parâmetro diversidade de nucleotídeos (π) estima a diversidade genética na população e aborda tanto a frequência de haplótipos quanto as diferenças de nucleotídeos entre os haplótipos. A diversidade média de nucleotídeos das raças de galinhas brasileiras foi de $0,00357 \pm 0,00104$, e variou de 0,00048 para CP e CAN a $0,00806 \pm 0,00140$ para Peloco. Estes valores são semelhantes aos estimados por Ceccobelli et al. (2015), que investigaram dezesseis raças de galinhas do mediterrâneo, e por Liu et al. (2006), que estudaram galinhas da Europa, Oriente Médio, Sudeste e Leste da Ásia.

Na Tabela 3, pode-se observar que comparando os sítios segregantes das raças brasileiras com a sequência da população de referência do *GenBank*, as galinhas do Brasil apresentam SNPs específicos nas posições 296, 306 e 522. Neste estudo, um total de 11 substituições nucleotídicas diferentes foi observado, formando um total de seis haplótipos.

Tabela 3. Polimorfismos de nucleotídeos observados na região D-loop do mtDNA de 47 sequências de galinhas, nas três diferentes raças nativas avaliadas.

	199	217	242	261	266	281	296	298	306	342	363	367	446	522	
Ref.	N	T	T	G	T	T	G	T	C	C	G	C	T	C	C
CP	15	.	C	.	.	.	A	C	.	T	A	.	.	T	A
CP	1	.	C	.	.	C	A	C	T	T	A	.	.	T	A
CAN	14	.	C	.	.	.	A	C	.	T	A	.	.	T	A
CAN	1	C	C	.	.	.	A	C	.	T	A	.	.	T	A
CAN	1	.	C	.	.	.	A	C	.	T	A	.	.	.	A
PEL	06	.	C	.	.	.	A	C	.	T	A	.	.	T	A
PEL	04	C	C	.	.	.	A	C	.	T	A	.	.	T	A
PEL	04	.	.	A	C	.	.	C	.	T	A	.	C	.	A
PEL	01	.	.	A	C	.	.	C	.	T	.	T	C	.	A

Ref., referência; CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; N, Número de sequências; Somente *loci* mutados são relatados na tabela; Pontos (.) indicam identidade com a sequência de referência (GenBank número de acesso NC 007236.1; Nishibori et al., 2005).

Os resultados da AMOVA (Tabela 4), baseados no polimorfismo da sequência do mtDNA, apontam que a variação genética entre os indivíduos nas raças foi de 74,53%, enquanto a variação genética entre as raças (FST) foi de 25,47% ($p < 0,001$), o que sugere uma particularização categórica entre as três raças de galinhas do Brasil. O valor de FST mede o grau de diferenciação genética entre populações. De acordo com Wright (1978),

valores de F_{ST} de 0 e 0,05 indicam diferenciação genética pequena, entre 0,05 e 0,15 indicam diferenciação moderada, entre 0,15 e 0,25 indicam grau de diferenciação elevado, e valores acima de 0,25 apontam para diferenciação muito grande.

Tabela 4. Estatísticas da análise de variância molecular (AMOVA) nas três raças de galinhas brasileiras, obtidos a partir dos dados de mtDNA.

F. Var.	GL	SQ	C. Var.	% Var	FST	p-valor
EP	2	9,592	0,25805	25,47	0,25475	0,00000
DP	44	33,217	0,75492	74,53	-	-
Total	46	42,809	1,01298	100	-	-

F. Var., fontes de variação; GL, graus de liberdade; SQ, soma de quadrados; C. Var., Componente de Variação; %Var, percentual de variação; FST, índice de fixação entre populações; EP, entre populações; DP, dentro de populações.

A análise da rede de junção mediana, juntamente com os haplótipos de referência, revelou que as raças brasileiras se agrupam em dois haplogrupos principais derivados de linhagens diferentes (E e C) originários de diferentes regiões (Figura 2).

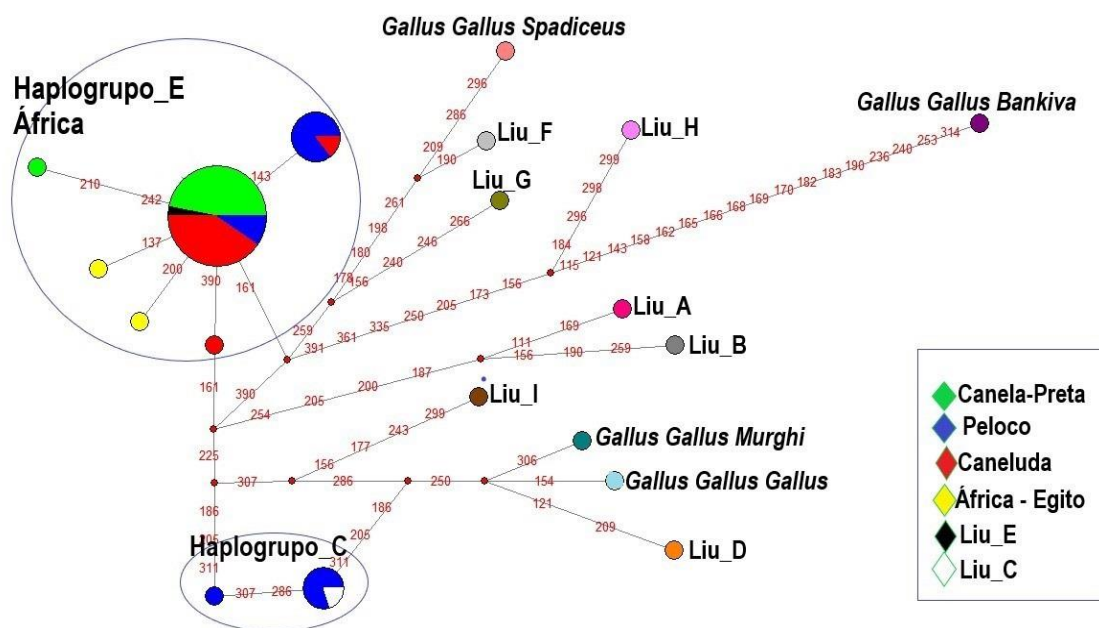


Figura 2. Rede de junção mediana dos seis haplótipos referentes às raças brasileiras, nove sequências de referência de Liu et al. (2006), duas sequências de galinhas do Egito (África) e uma sequência para cada uma das subespécies *Gallus gallus murghi*, *Gallus gallus gallus*, *Gallus gallus spadiceus* e *Gallus gallus bankiva*.

Noventa e um por cento dos animais das três raças brasileiras e as galinhas africanas se agruparam no haplótipo derivado da linhagem E LIU_E, enquanto outros animais se agruparam com sequências de referência LIU_C (9%). Observa-se que, dos

seis haplótipos agrupados no haplogrupo E, quatro foram separados do principal haplótipo E por apenas uma mutação; e entre esses quatro haplótipos, dois pertencem a galinhas do Egito (Norte da África). Compreende-se com isso, que as galinhas do Brasil têm relação genética com aves africanas, além dos ancestrais que compõem o haplogrupo E relatado por Liu et al. (2006), que pertencem a galinhas espalhadas na Europa, Oriente Médio e Índia. Enquanto isso, o haplogrupo C foi distribuído principalmente no Japão e no sudeste da China (Liu et al., 2006). Apenas galinhas da raça Peloco agrupam no haplogrupo C, compartilhando o haplótipo com LIU_C.

A relação genética de galinhas de raças brasileiras com aves da Europa é justificada pela colonização do Brasil, realizada por colonizadores da Península Ibérica. A relação com aves da Índia e China pode ser atrelada à prática da briga de galos, que era comum no Brasil, até recentemente, em que muitos materiais genéticos desses países eram utilizados em cruzamentos para formação de galos para esse propósito. As aves da raça Peloco, por sua vez, foram as primeiras adquiridas para a formação dos núcleos de conservação em regiões onde essa prática (briga de galo) era comum. Assim, pode ser que em algum momento ocorreu a mistura desses materiais genéticos.

Não foram encontradas referências científicas sobre possíveis influências genéticas de galinhas africanas sobre raças brasileiras. No entanto, a chegada dessas aves ao Brasil como resultado das atividades dos portugueses, que historicamente na época da Colonização do Brasil tinham estreita relação comercial com Norte da África, não pode ser desconsiderada. Múltiplas origens para galinhas da América também foram encontrados por Gongora et al. (2008) e Toalombo Vargas et al. (2019), ao estudarem galinhas do Chile e Equador, respectivamente.

Nesta pesquisa, as subespécies mais próximas das galinhas brasileiras (*Gallus gallus domesticus*) são *Gallus gallus murghi* e *Gallus gallus gallus*, com distância de apenas sete pontos mutacionais para ambas (Figura 2). Estes primeiros resultados sobre filogenia das raças de galinhas do Nordeste do Brasil subsidiarão a valorização desse importante patrimônio genético nacional.

Marcadores Microssatélites

A expansão das galinhas domésticas se deu em momentos distintos em cada região geográfica do mundo. No Brasil, essa expansão se deu, principalmente, a partir do advento da colonização no ano de 1500 (Carvalho et al., 2016). A disseminação de

determinada espécie em uma região específica, com passar das gerações, pode causar alterações nas frequências alélicas dessas populações. Isto ocorre, geralmente, devido aos fatores evolutivos e adaptativos como: isolamento populacional; seleção natural e seleção artificial; e deriva genética. Estes fatores têm efeitos importantes nas frequências alélicas de uma população e podem causar reduções drásticas na variabilidade genética e níveis elevados de endogamia (Henson, 1992).

Neste contexto, se faz necessário avaliar a estrutura genética das atuais populações de galinhas nativas antes de iniciar os programas de conservação ou seleção destas. Neste estudo, utilizando 25 marcadores microssatélites, foi encontrado número médio de alelos por raça de 4,960 (CP), 5,040 (CAN) e 4,960 (PEL) (Tabela 5). Toalombo Vargas et al. (2019), investigando galinhas nativas do Equador, e Ceccobeli et al. (2013), estudando cinco raças de galinhas nativas da Itália, encontraram valores semelhantes a este estudo, utilizando o mesmo painel de marcadores.

O número de alelos efetivos para as raças brasileiras foram 2,873 para CP, 3,175 para CAN e 2,985 para PEL (Tabela 5). O número de alelos efetivos é um indicador da variabilidade genética que é essencial para estabelecer o potencial evolutivo da população em longo prazo, porque a resposta à seleção é determinada pelo número inicial de alelos.

Tabela 5. Média para diversas estimativas ao longo de cada locus para as três raças de galinhas estudadas.

Raça	N	Na	Ne	Ho	He	UHe	F
CP	40	4,960	2,873	0,617	0,618	0,626	-0,001
CAN	30	5,040	3,175	0,634	0,639	0,650	-0,005
PEL	30	4,960	2,985	0,642	0,625	0,636	-0,032
Média	33,3	4,986	3,011	0,631	0,627	0,637	-0,012

N, número de amostras; Na, número de alelos; Ne, número de alelos efetivos; Ho, heterozigiosidade observada; He, heterozigiosidade esperada; UHe, heterozigiosidade esperada com fator de correção para tamanho amostral; F, índice de fixação de Wright [$1 - (Ho/He)$]; CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco.

Os valores de Ho e He foram similares para as três raças brasileiras (Tabela 5), o que sugere variabilidade genética nestas raças. Foram encontrados valores negativos de índice de fixação de Wright (F) para todas as três raças investigadas. As frequências observadas de heterozigotos foram semelhantes às esperadas e as estimativas F não foram significativamente diferentes de zero, sugerindo que essas três raças estão próximas do que pode ser esperado sob acasalamento aleatório. Portanto, entende-se que as três raças brasileiras são bem gerenciadas em um programa de conservação.

Uma matriz de distância com as raças brasileiras, incluindo raças da Espanha, Portugal, Nigéria, Chile e linhagens comerciais, totalizando 20 grupos genéticos foi gerada a partir da distância de Nei (Tabela 6 – ANEXO). Os dados apontam que as galinhas que mais se aproximam geneticamente das galinhas Canela-Preta do estado do Piauí são as galinhas da Nigéria (0,208). As raças Caneluda do Catolé e Peloco, do estado da Bahia, são semelhantes entre si (0,063), sendo que a Caneluda do Catolé se aproxima das galinhas Araucanas do Chile (0,170) e a Peloco (0,156) tem proximidade com as galinhas Preta Lusitânica de Portugal. Estes resultados, assim como os de DNA mitocondrial, apontam múltiplas origens para as raças de galinhas do Brasil estudadas.

As relações filogenéticas baseadas na distância genética de Nei entre as populações foram visualizadas através da rede de vizinhos (Figura 3). É possível observar que as raças brasileiras não se agrupam com linhagens comerciais utilizadas como grupo controle. Também é possível observar que as três raças do Brasil se agrupam com aves do Chile, África e Portugal. Ressalta-se que, das aves do Brasil, apenas a raça Canela-Preta se agrupou com aves espanholas, aproximando-se da raça Ibicenca. Nota-se que as raças brasileiras têm múltiplas origens genéticas; contudo, alguns ancestrais são compartilhados entre elas, mas com percentuais de contribuição diferentes.

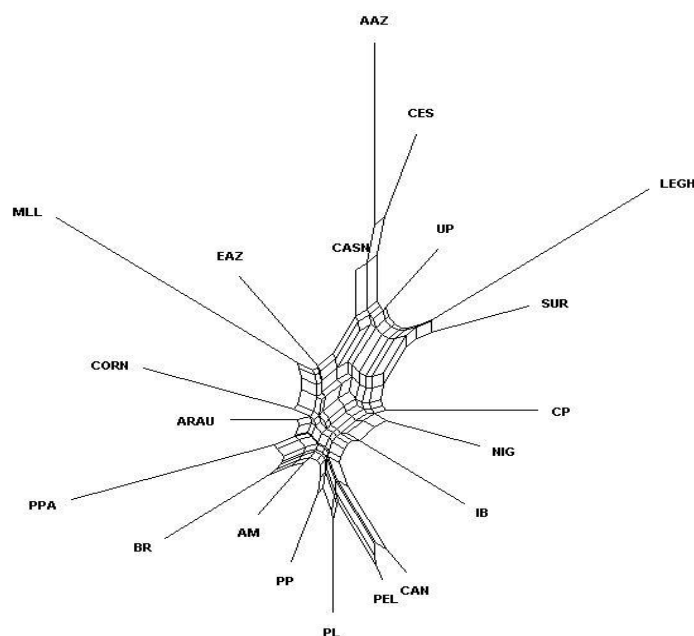


Figura 3. Neighbor-net construído utilizando a distância de Nei entre as 20 raças estudadas. CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorca; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; ARAU, Araucana; NIG, galinhas da Nigéria; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa; LEGH, Leghorn; CORN, Cornsuh.

Os resultados da análise do STRUCTURE são apresentados na Figura 4. A análise foi realizada para detectar a presença potencial de subestruturas nas raças. Observa-se que as raças da Bahia são similares geneticamente e compartilham combinações gênicas, o que corrobora com os resultados encontrados da análise filogenética, que mostram essas raças bem próximas. Apesar dessa proximidade, as raças CAN e PEL apresentam-se com estruturas diferentes quando $K = 3$. Ambas as raças têm ancestrais genéticos em comum, mas com proporções genéticas distintas, separando-as em duas raças. A raça CP, assim como nas demais análises, se apresenta como um grupo distinto.

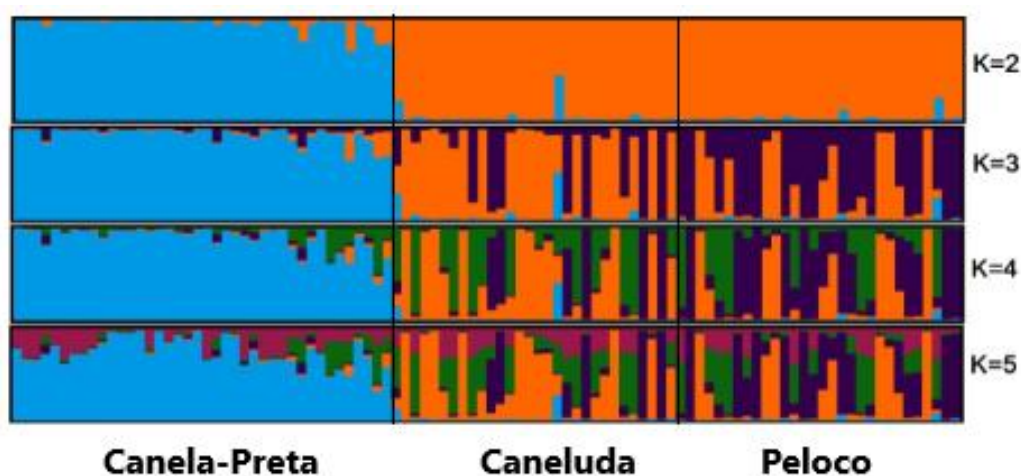


Figura 4. Análise de estrutura populacional realizada no software STRUCTURE com 100 indivíduos de três raças de galinhas brasileiras (Canela-Preta, Caneluda e Peloco), com base em 25 marcadores microssatélites. Representações gráficas de $k = 1$ a $k = 5$.

Conhecer a composição genética das raças nativas é imprescindível para a elaboração de programas de conservação e melhoramento genético dessas raças. Este é primeiro trabalho sobre origem e diferenciação genética dessas três raças de galinhas nativas do Nordeste do Brasil e contribuirá diretamente para a conservação dessas raças e para incentivar a promoção de novas pesquisas genéticas em outros estados do Brasil.

Conclusões

1. As três raças de galinhas nativas do Nordeste do Brasil têm múltiplas origens mitocondriais. Estas raças ascendem de galinhas europeias, africanas e indianas, e alguns indivíduos da raça Peloco têm ascendência chinesa. As subespécies ancestrais mais

próximas das galinhas domésticas brasileiras são *Gallus gallus gallus* e *Gallus gallus murghi*.

2. Em nível de DNA nuclear, as raças brasileiras apresentam-se com elevada variabilidade genética. As três populações estão geneticamente estruturadas e têm múltiplas relações genéticas, assemelhando-se a aves de raças da Nigéria, Chile, Portugal e, particularmente, a raça Canela-Preta, com uma raça espanhola. As raças brasileiras não se agruparam com materiais genéticos comerciais.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro da CAPES, UFPI, UESB, UEMA, INIAV e UCO.

Referências

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; ALMEIDA, M.J.O.; SARMENTO, J.L.R.; BRITTO, F.B.; SILVA, M.A. Caracterização genética e estrutura populacional de galinhas nativas Canela-Preta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.11, p.1899-1906, 2016.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; ALMEIDA, M.J.O.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; SARMENTO, J.L.R.; SILVA, M.A.; OLIVEIRA, M.B.; SOUSA, P.R.; CARVALHO, A.A. Padrão racial fenotípico de galinhas brasileiras da raça Canela-Preta. **Archivos de Zootecnia**, v.66, n.254, p.195-202, 2017.

CARVALHO, D.A.; BONAFÉ, C.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; ALMEIDA, M.J.O.; SARMENTO, J.L.R.; BRITTO, F.B.; SILVA, M.A. Genetic variability of twelve microsatellite loci in native Canela-Preta chickens. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.4, p.1275-1281, 2018.

CECCOBELLI, S.; LORENZO, P.D.; LANCIONI, H.; CASTELLINI, C.; IBÁÑEZ, L.V.M.; SABBIONI, A.; SARTI, F.M.; WEIGEND, S.; LASAGNA, E. Phylogeny, genetic relationships and population structure of five Italian local chicken breeds. **Italian Journal of Animal Science**, v.12, n.3, e66, 2013.

CECCOBELLI, S.; LORENZO, P.D.; LANCIONI, H.; IBÁÑEZ, L.V.M.; TEJEDOR, M.T.; CASTELLINI, C.; LANDI, V.; MARTÍNEZ MARTÍNEZ, A.; DELGADO BERMEJO, J.V.; VEGA PLA, J.L.; LEON JURADO, J.M.; GARCÍA, N.; ATTARD, G.; GRIMAL, A.; STOJANOVIC, S.; KUME, K.; PANELLA, F.; WEIGEND, S.

LASAGNA, E. Genetic diversity and phylogeographic structure of sixteen Mediterranean chicken breeds assessed with microsatellites and mitochondrial DNA. **Livestock Science**, v.175, p.27-36, 2015.

DANCAUSE, K.N.; VILAR, M.G.; STEFFY, R.; LUM, J.K. Characterizing genetic diversity of contemporary pacific chickens using mitochondrial DNA analyses. **PLoS One**, v.6, n.2, e16843, 2011.

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**, v.131, p.479-491, 1992.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Molecular genetic characterization of animal genetic resources**. FAO Animal Production and Health Guidelines. No. 9. Rome. 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**, v.34, n.1, p.98-102, 2014.

GONGORA, J.; RAWLENCE, N.J.; MOBEGI, V.A.; JIANLIN, H.; ALCALDE, J.A.; MATUS, J.T.; HANOTTE, O.; MORAN, C.; AUSTIN, J.J.; ULM, S.; ANDERSON, A.J.; LARSON, G.; COOPER, A. Indo-European and Asian origins for Chilean and Pacific chickens revealed by mtDNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, n.30, p.10308-10313, 2008.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, v.41, p.95-98, 1999.

HENSON, E.L. **In situ conservation of livestock and poultry**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/004/T0559E/T0559E00.htm#TOC>>. 1992.

KANGINAKUDRU, S.; METTA, M.; JAKATI, R.D.; NAGARAJU, J. Genetic evidence from Indian red jungle fowl corroborates multiple domestication of modern day chicken. **BMC Evolutionary Biology**, v.8, n.174, 2008.

KOPELMAN, N.M.; MAYZEL, J.; JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A.; MAYROSE, I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. **Molecular Ecology Resources**, v.15, n.5, p.1179-1191, 2015.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, p.1451-1452, 2009.

LIU, Y.; WU, G.S.; YAO, Y.G.; MIAO, Y.W.; LUIKART, G.; BAIG, M.; BEJA-PEREIRA, A.; DING, Z.L.; PALANICHAMY, M.G.; ZHANG, Y.P. Multiple maternal origins of chickens: Out of the Asian jungles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.38, n.1, p.12-19, 2006.

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

OSMAN, S.A.; YONEZAWA, T.; NISHIBORI, M. Origin and genetic diversity of Egyptian native chickens based on complete sequence of mitochondrial DNA D-loop region. **Poultry Science**, v.95, n.6, p.1248-1256, 2016.

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

PRITCHARD, J.K.; STEPCHICKENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.15, p.945-959, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain termination inhibitors. **National Academy of Sciences**, v.74, n. 12, p.5463-5468, 1977.

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

TOALOMBO VARGAS, P.A.; LEÓN, J.M.; ORTEGA, L.R.F.; MARTINEZ, A.; GAVILANES, A.A.V.; DELGADO, J.V.; LANDI, V. Deciphering the patterns of genetic admixture and diversity in the Ecuadorian Creole chicken. **Animals**, v.9, n.9, 670, 2019.

WALSH, P.S.; VARLARO, J.; REYNOLDS, R. A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.5061-5065, 1992.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population**. v.4. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.

ANEXO

Tabela 6. Matriz de distância de NEI representando os 20 grupos de galinhas investigados (18 raças nativas e dois grupos comerciais) com base em 25 marcadores de microssatélites

G. G.	CP	CAN	PEL	AAZ	CASN	CES	EAZ	IB	MLL	PPA	SUR	UP	LEGH	CORN	ARAU	NIG	AM	BR	PLU
CAN	0,268	-																	
PEL	0,244	0,063	-																
AAZ	0,423	0,490	0,542	-															
CASN	0,263	0,263	0,270	0,175	-														
CES	0,336	0,412	0,410	0,225	0,113	-													
EAZ	0,293	0,271	0,259	0,370	0,196	0,313	-												
IB	0,222	0,233	0,233	0,412	0,262	0,393	0,199	-											
MLL	0,419	0,396	0,407	0,399	0,269	0,405	0,386	0,362	-										
PPA	0,314	0,295	0,294	0,358	0,327	0,388	0,345	0,301	0,435	-									
SUR	0,256	0,336	0,340	0,351	0,189	0,197	0,252	0,275	0,460	0,439	-								
UP	0,289	0,291	0,246	0,313	0,131	0,216	0,213	0,311	0,327	0,363	0,239	-							
LEGH	0,356	0,457	0,420	0,437	0,280	0,377	0,381	0,402	0,540	0,581	0,256	0,278	-						
CORN	0,271	0,224	0,240	0,457	0,237	0,367	0,303	0,249	0,343	0,308	0,308	0,258	0,397	-					
ARAU	0,242	0,170	0,191	0,332	0,194	0,321	0,161	0,159	0,316	0,214	0,235	0,237	0,336	0,213	-				
NIG	<u>0,208</u>	0,192	0,231	0,358	0,211	0,329	0,240	0,173	0,385	0,292	0,205	0,251	0,342	0,282	0,202	-			
AM	0,216	0,209	0,192	0,414	0,216	0,316	0,229	0,198	0,313	0,248	0,238	0,269	0,388	0,234	0,156	0,215	-		
BR	0,334	0,222	0,229	0,506	0,285	0,369	0,273	0,269	0,430	0,257	0,278	0,299	0,480	0,278	0,191	0,264	0,162	-	
PLU	0,276	0,198	0,156	0,540	0,266	0,429	0,251	0,296	0,384	0,317	0,325	0,283	0,457	0,269	0,227	0,273	0,197	0,251	-
PP	0,242	0,198	0,174	0,501	0,250	0,428	0,249	0,170	0,376	0,287	0,286	0,292	0,348	0,241	0,202	0,192	0,153	0,200	0,163

G. G., grupo genético; CP, Canela-Preta; CAN, Caneluda do Catolé; PEL, Peloco; AAZ, Andaluza Azul; CASN, Castellana Negra; CES, Combatiente Español; EAZ, Extremeña Azul; IB, Ibicenca; MLL, Mallorca; PPA, Pita Pinta; SUR, Sureña; UP, Utrerana Perdiz; LEGH, Leghorn; CORN, Cornsih; ARAU, Araucana; NIG, galinhas da Nigéria; AM, Amarela; BR, Branca; PLU, Preta Lusitânica; PP, Pedrês Portuguesa.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo forneceu uma visão geral sobre a diversidade genética das raças de galinhas Ibero-Americanas. Foi ressaltado que os marcadores microssatélites e DNA mitocondrial utilizados foram eficientes nos estudos de caracterização, diferenciação e relação genética das aves.

Esta pesquisa gerou demanda de novos trabalhos, uma vez que demonstrou tratar de raças geneticamente estáveis. Os resultados encontrados podem ser utilizados em futuras estratégias de gestão genética dos rebanhos de raças nativas de galinhas, usando-os como base para programas de conservação, utilização e melhoramento das raças.