

Variabilidade genética de 12 loci de microssatélites em galinhas crioulas Canela-Preta

[Genetic variability of twelve microsatellite loci in native Canela-Preta chickens]

D.A. Carvalho¹, C.M. Bonafé², M.D.P. Rodriguez-Rodriguez³, M.J.O. Almeida⁴,
J.L.R. Sarmiento⁵, F.B. Britto⁶, M.A. Silva⁷

¹Aluna de pós-graduação – CCA-UFPI – Teresina, PI

²UFVM – Diamantina, MG

³Aluna de pós-graduação – UFVM – Diamantina, MG

⁴Embrapa Meio-Norte – Teresina, PI

⁵UFPI – Teresina, PI

⁶CCN/UFPI – Teresina, PI

⁷UFV e UFMG – Viçosa e Belo Horizonte, MG

RESUMO

Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de se conhecer a variabilidade genética de 12 loci de microssatélites em galinhas crioulas Canela-Preta. Foram coletadas amostras de sangue de 118 galinhas crioulas Canela-Preta, provenientes de três municípios do estado do Piauí (Oeiras, Queimada Nova e Teresina). Após extração do DNA, foram utilizados marcadores para 12 loci de microssatélites: LEI0192, LEI0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0234, LEI0237, LEI0248, LEI0258, MCW0081, MCW0183 e MCW0213, que foram amplificados pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foram obtidos 408 alelos (somando os alelos dos 12 loci), com os fragmentos variando entre 50 e 460 pares de bases. O número de alelos variou de 15 (MCW0081) a 52 (LEI0212), com média de 31,5 alelos por locus. A média de heterozigosidade esperada e o conteúdo de informações polimórficas foram, respectivamente, 0,887 e 0,909. Foram observados desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg e valores positivos do índice de fixação com excesso de homozigotos. Os microssatélites utilizados mostraram-se polimórficos e podem ser usados para investigações genéticas em galinhas Canela-Preta. As galinhas dos plantéis avaliados apresentam grande variabilidade gênica, o que as qualifica como importante fonte de recursos genéticos e, conseqüentemente, faculta a utilização delas em programas de melhoramento genético animal.

Palavras-chave: alelos, crioula, *Gallus gallus*, polimorfismo, *Simple Sequence Repeats* - SSR

ABSTRACT

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

Keywords: allele, crioula, *Gallus gallus*, Polymorphism, *Simple Sequence Repeats* – SSR

Recebido em 16 de dezembro de 2016

Aceito em 22 de novembro de 2017

E-mail: deborabie@hotmail.com

INTRODUÇÃO

As galinhas domésticas do Brasil foram introduzidas pelos portugueses no período da colonização, por volta do ano 1500. Aqui, essas aves foram criadas soltas em quintais e fazendas o que propiciou cruzamentos aleatórios, passaram por um processo de adaptação e seleção natural, durante décadas e, dessa maneira, surgiram as raças de galinhas crioulas brasileiras. Acredita-se que essas aves são bem adaptadas ao clima, resistentes a parasitas e doenças, sendo consideradas de elevada rusticidade e detentoras de alta variabilidade genética. No entanto, apesar de todas essas qualidades, muitas dessas populações de galinhas crioulas encontram-se em risco de extinção (Fonteque et al., 2014).

Pouco se conhece sobre a variabilidade genética das galinhas crioulas, porém estudos científicos recentes apontam alta variabilidade genética nesse tipo de aves (Fonteque et al., 2014; Kumar et al., 2015; Possamai et al., 2015). O conhecimento da variabilidade genética das galinhas crioulas é fundamental para programas de conservação de recursos genéticos e melhoramento animal, o que viabiliza estabelecer programas de seleção dessas aves. Esta pesquisa foi realizada com o objetivo de avaliar a variabilidade genética de doze *loci* de microssatélites em galinhas caipiras crioulas Canela-Preta.

MATERIAL E MÉTODOS

A investigação da variabilidade genética das galinhas caipiras crioulas Canela-Preta foi realizada no Laboratório de Genética Molecular Aplicada do Departamento de Zootecnia da UFVJM, no município de Diamantina-MG. Foram utilizadas amostras de sangue de 118 galinhas crioulas da raça Canela-Preta, de plantéis pertencentes ao Projeto Produtores do Futuro, no Piauí, o qual ocorre em três municípios desse estado: Teresina, localizado a 05° 05' 20" S 42° 48' 07" O (38 amostras); Oeiras, localizado a 07° 01' 30" S 42° 07' 51" O (37 amostras); e Queimada Nova, localizado a 08° 34' 44" S 41° 25' 08" O (43 amostras). Coletou-se sangue da veia ulnar de cada ave, em papel-filtro, o qual foi seco à temperatura ambiente e colocado em envelope devidamente identificado. Este estudo conta com o registro

Nº04412014 do Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal Dos Vales de Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM.

Para a extração do DNA genômico, utilizou-se um fragmento de 0,5cm do papel-filtro, conforme o protocolo de extração salina estabelecido por Lopera-Barrero et al. (2008). A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria, com amplitude de onda 260nm, sendo as amostras diluídas para uma concentração de 10ng/μL. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese horizontal, sendo usado um gel de agarose a 1%, a 70V, por 70 minutos. Posteriormente, capturou-se a imagem no sistema fotográfico UV-312.

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada pela técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), conforme descrita por McConnell et al. (1999), a partir do DNA total. Foram utilizados 12 *loci* de microssatélites, desenhados para a espécie *Gallus gallus domesticus*: LEI0192, LEI0234, LEI0248, MCW0081, MCW0183 (Guidelines..., 2004), LEI0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0237, LEI0258 (McConnell et al., 1999) e MCW0213 (Crooijmans et al., 1997).

O DNA foi amplificado em volume de reação de 16μL, e cada reação continha 50ng de DNA, 2,5μL de tampão 10x (100mM Tris-HCl, pH 8,3, 500mM KCl), 1-2,5μL (20-50mM) de MgCl₂, 2μL da mistura de dNTP (0,2mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,8μM de cada iniciador e 0,5 unidade de Taq DNA polimerase (Ludwig Biotec). A reação em PCR foi realizada por 1min de desnaturação inicial a 94°C, em 30 ciclos de 30s de desnaturação a 94°C, 30s de anelamento a 49-64°C, dependendo do par de iniciadores (Tab. 1), 50s de extensão a 72°C e uma extensão final de 5min a 72°C.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante a 10% (acrilamida:bisacrilamida - 29:1), ureia 6mol L⁻¹, e foram corados com nitrato de prata, conforme Bassam et al. (1991). Para auxiliar na determinação do tamanho dos fragmentos, foi utilizado um marcador de DNA com fragmentos espaçados de 50 pares de bases (pb) (Invitrogen).

Para cálculo da frequência alélica em cada *locus* e estimativas das heterozigosidades esperada

(He) e observada (Ho), foi utilizado o *software* GenAEx 6.5 (Peakall e Smouse, 2012). 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 1000 *steps* de memorização, 100 *batches* e 1000 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 (HWE) em cada *locus*, foi utilizado o *software* GENEPOP, v.4.0.10 (Rousset, 2008), e, para avaliar a presença de alelos nulos, foi

utilizado o *software* Micro-checker (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os 12 *loci* microssatélites utilizados se mostram eficientes na genotipagem do DNA das 118 galinhas estudadas (Fig. 1). O número de alelos em cada *locus* variou de 15 (MCW0081) a 52 (LEI0258). A amplificação das amostras gerou um total de 408 alelos, somando-se os alelos de cada *locus*, com tamanhos de alelos variando entre 50 e 460 pares de bases (Tab. 1). O número de alelos por *locus* de microssatélite por população de galinhas pode variar muito, podendo ir de um (monomórfico) a vários (polimórfico) (Fontequ *et al.*, 2014).

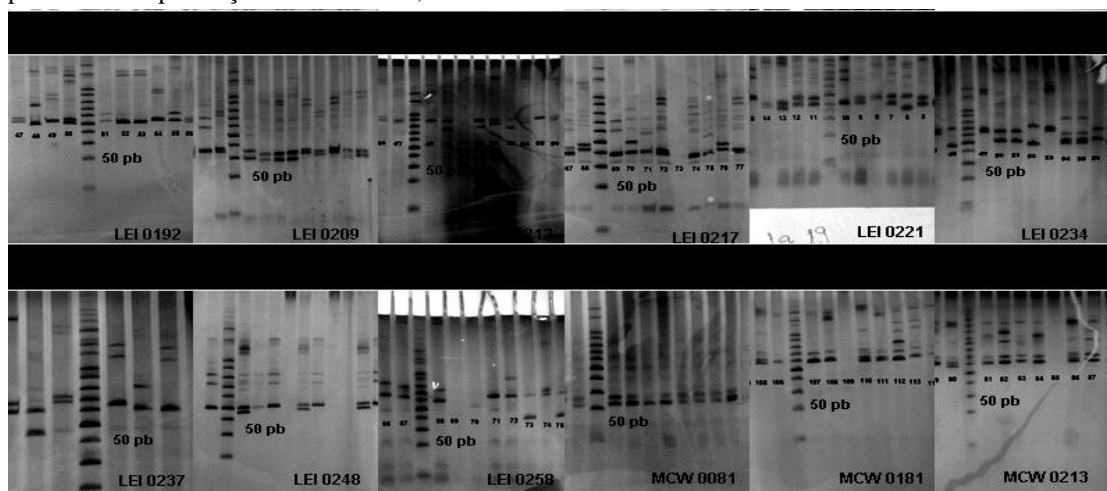


Figura 1. Perfil eletroforético em gel de poliácridamida mostrando os 12 marcadores microssatélites otimizados para galinhas Canela-Preta (50pb= marcador de 50pb).

Nas galinhas crioulas Canela-Preta, obtiveram-se 52 alelos para o *locus* LEI0258, 45 para LEI0212, 44 para LEI0217, 40 para LEI0234, 37 para LEI0192, 36 para LEI0237, 29 para MCW0183, 21 para LEI0221, 20 para LEI0209, 19 alelos para os *loci* LEI0248 e MCW0213, e 15 alelos para o *locus* MCW0081. O elevado polimorfismo das amostras em todos os *loci* analisados também foi observado por Fontequ *et al.* (2014), ao analisarem 100 amostras de galinhas caipiras brasileiras de ovos azuis, com o uso de oito desses microssatélites, com 28 alelos para o *locus* LEI0212, 23 para LEI0217, 22 para LEI0192, 21 para LEI0221, 13 para LEI0248, 12 para LEI0234, oito para MCW0183 e cinco para MCW0081, e por Clementino *et al.* (2010), com o uso de oito microssatélites em ecotipos de

galinhas da região Meio-Norte do Brasil, com 13 alelos para o *locus* LEI0258, 17 para LEI0192, 17 para LEI0237, 15 para LEI0217, 13 para MCW0213, 14 para LEI0234, 13 para LEI0209 e nove para LEI0221.

Para o marcador LEI0258, foi detectado um máximo de 52 alelos. Essa ampla variação pode sugerir que esse *locus* se encontra em uma região de elevada taxa de mutação ou de seleção positiva à mutação, o que também pode estar ocorrendo com os demais marcadores, pois todos os *loci* apresentaram elevado número de alelos. Observou-se média de 31,5 alelos, notoriamente superior à maioria dos trabalhos que têm relatado variabilidade de microssatélites em galinhas. O

número médio de alelos para aves crioulas tem apresentado médias de 3,4 a 19 alelos por *loci* (Kaya e Yildiz, 2008; Clementino *et al.*, 2010; Fonteque *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2015),

enquanto para linhagens de galinhas comerciais (corte ou postura) tem variado de 1,3 a 8,1, conforme análises de Crooijmans *et al.* (1997), Liu *et al.* (2008) e Dávila *et al.* (2009).

Tabela 1. Descrição dos *loci* de microssatélites utilizados para caracterização genética de galinhas Canela-Preta

Nome dos <i>Loc</i> i	Nº alelos*	Tamanho Alelos Observado(pb)	Sequência Forward	Sequência Reverse	Ta (°C)	MgCl ² (Mm) (µL)	Localização no Mapa	Referência
LEI0192	37	160–355	TGCCAGAGCTTCAG TCTGT	GTCATTACTGTTATGT TTATTGC	55	1	Cromossomo 6	FAO (2004)
LEI0209	20	80–164	AATTTGGTGTTCATA CCTCTCC	GACTTTCCAGTGTCTC GTTTAG	49	1,5	Cromossomo 1	McConnel 1 <i>et al.</i> (1999)
LEI0212	45	280–460	TTTGCCAATCCCTA TTGAGC	TTTTCATATTTGTGGC GTGC	58	2,5	X	McConnel 1 <i>et al.</i> (1999)
LEI0217	44	104–376	GATGACTGAGAGA AATAACTTG	AAATTACTGAGGCACA GGAG	55	1,5	Cromossomo 1	McConnel 1 <i>et al.</i> (1999)
LEI0221	21	136–376	CCTTTATCCACTCT TCATGCAC	TGCATAAATCCATGG GTAAGC	58	1,5	Cromossomo 1	McConnel 1 <i>et al.</i> (1999)
LEI0234	40	148–420	ATGCATCAGATTGG TATTCAA	CGTGGCTGTGAACAAA TATG	57	1,5	Cromossomo 2	FAO (2004)
LEI0237	36	176–448	GTTAAGTGTTCCT GATGTAGC	CTTCAACTATAAAGCA TAGCTG	57	1,5	Cromossomo 2	McConnel 1 <i>et al.</i> (1999)
LEI0248	19	156–264	TTTGAAAGTGACCA TGATTCTG	AAGCAGTTTCCAAGCT AAGAAC	61	1,5	Cromossomo 2	FAO (2004)
LEI0258	52	125–450	CACGCAGCAGAAC TTGGTAAGG	AGCTGTGCTCAGTCCT CAGTGC	58	1,5	Cromossomo 16	McConnel 1 <i>et al.</i> (1999)
MCW081	15	50–112	GTTGCTGAGAGCCT GGTGCAG	CCTGTATGTGGAATTA CTTCTC	60	2	Cromossomo 5	FAO (2004)
MCW083	29	220–420	ATCCCAGTGTGCGAG TATCCGA	TGAGATTTACTGGAGC CTGCC	64	1	Cromossomo 7	FAO (2004)
MCW013	19	150–352	CTGTTCACTTTAAG GACATGG	GACAAGTCAACAACCTT GCCAG	55	1,5	Cromossomo 13	Crooijmans <i>et al.</i> (1997)

X - Cromossomo não informado; *Numero de alelos encontrados na pesquisa; Ta - Temperatura anelamento.

Pesquisas têm sido feitas no Brasil e no exterior utilizando microssatélites para caracterizar geneticamente galinhas crioulas. No Brasil, Clementino *et al.* (2010) encontraram variação de três a 18 alelos por *locus* e Fonteque *et al.* (2014) obtiveram variação de dois a 28 alelos por *locus*. No entanto, corroborando os resultados desta pesquisa, na China, Qu *et al.* (2006) e, na Índia, Kumar *et al.* (2015) obtiveram variação de seis a 51 e de cinco a 43 alelos por *locus*, respectivamente.

As aves comerciais sofrem forte pressão de seleção e apresentam, em geral, menor número de alelos por *loci* que as aves crioulas (Blackburn, 2006). Nas populações aqui analisadas, os valores foram ainda superiores aos obtidos em pesquisas com galinhas crioulas no Brasil, o que demonstra elevada variabilidade

genética das galinhas caipiras brasileiras Canela-Preta e as qualifica como fonte de variabilidade genética, que devem ser conservadas visando ao estabelecimento de programas de conservação e melhoramento genético dessa raça.

O valor médio do conteúdo de informações polimórficas (PIC) foi de 0,909, variando de 0,745 (MCW0081) a 0,967 (LEI0258), resultado que indica elevada variabilidade e polimorfismo nas populações avaliadas, além de sugerir que mais informações genéticas podem ser fornecidas por esses *loci* de marcadores “Simple Sequence Repeats” (SSR), considerando-se que marcadores que apresentam valores de PIC acima de 0,5 são apontados como muito informativos (Costa e Lorenzo, 2009) (Tab.2).

Variabilidade genética...

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

LOCUS	N _A ¹	H _O ²	H _E ³	T(PB) ⁴	PIC ⁵	AN ⁶	Valor de P ⁷
LEI0192	21,333	0,650	0,916	160-355	0,941	0,1827	0,0124
LEI0209	14,000	0,695	0,889	80-164	0,902	0,1412	0,0000
LEI0212	27,66	0,550	0,936	280-460	0,957	0,2714	0,0000
LEI0217	23,333	0,692	0,918	104-376	0,936	0,1567	0,0000
LEI0221	14,333	0,550	0,880	136-296	0,892	0,2403	0,0000
LEI0234	23,667	0,567	0,925	148-420	0,952	0,2651	0,0000
LEI0237	24,333	0,720	0,925	176-448	0,942	0,1369	0,0000
LEI0248	12,000	0,243	0,807	156-264	0,854	0,5582	0,0000
LEI0258	30,000	0,721	0,941	125-450	0,967	0,1508	0,0000
MCW0081	7,667	0,939	0,721	50-112	0,745	-0,1221	0,0000
MCW0183	20,667	0,829	0,928	220-420	0,940	0,0635	0,0000
MCW0213	12,333	0,926	0,860	150-352	0,886	-0,0202	0,0000
MÉDIA	19,278	0,674	0,887	-	0,909	-	-

¹Frequência de alelos por *locus*; ²heterozigiosidade observada; ³heterozigiosidade esperada; ⁴tamanho de alelos em pares de base; ⁵conteúdo de informação polimórfica; ⁶alelos nulos; ⁷*locus* em desequilíbrio (P<0,05).

As médias de heterozigiosidade esperada (He) e observada (Ho) foram 0,887 e 0,674, respectivamente, o que reflete adequação dos marcadores SSR para medir a variação genética das galinhas Canela-Preta (Tab. 2).

Heterozigiosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no *locus* marcador e depende do número de alelos e de sua frequência na população, podendo ser considerada uma medida de diversidade genética. Para galinhas crioulas, os valores ficam em torno de 0,56 a 0,86 para He, e entre 0,38 a 0,63 para Ho (Kaya e Yildiz, 2008; Fontequé *et al.*, 2014). Os dados desta pesquisa são compatíveis com os valores encontrados em aves crioulas. Para aves comerciais (linhagens), a He média tem variado entre 0,00 (para linhagens altamente endogâmicas) e 0,74, e a Ho média entre 0,00 e 0,67 (Dávila *et al.*, 2009; Tadano *et al.*, 2009).

Marcador molecular é considerado polimorficamente informativo, sendo eficiente para medir a variação genética quando sua heterozigiosidade é maior que 70%. A Ho é considerada elevada quando apresenta média maior que 0,7, e reduzida quando menor que 0,5. Quanto à He, médias superiores a 0,5 indicam elevada diversidade genética dos marcadores (Menezes *et al.*, 2006).

A He média por *loci* variou de 0,721 a 0,941, e a Ho média de 0,243 a 0,939. A maior He foi

obtida para o *locus* LEI0258, e a maior Ho para o *locus* MCW0081, sendo as menores He e Ho observadas para os *loci* MCW0081e LEI0248, respectivamente. A Ho foi menor que a He para todos os *loci* avaliados, exceto para os *loci* MCW0081 e MCW0213. Os marcadores LEI0237, LEI0258, MCW0081, MCW0183 e MCW0213 apresentaram elevado grau de Ho, com média superior a 0,7. Os marcadores LEI0192, LEI0209, LEI0212, LEI0217, LEI0221, LEI0234 apresentaram Ho média intermediária, entre 0,5 e 0,7. Apenas o marcador LEI0248 apresentou baixa Ho, com média menor que 0,5.

Verificou-se elevada diversidade genética dos marcadores SSR analisados, tendo 92% dos marcadores apresentado Ho superior a 0,5, enquanto todos os *loci* apresentaram He superior a 0,5.

Os 12 *loci* estudados apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para as populações em estudo (Tab. 2). Segundo 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. Uma característica em comum das galinhas caipiras é o sistema de criação extensivo, em que pequenas populações são criadas livres a campo.

Essas pequenas populações geralmente apresentam reduzido número de indivíduos com alto grau de parentesco e pouca utilização de reprodutores, que geralmente são selecionados pela beleza ou pelo porte físico, o que predispõe a altas taxas de endogamia. As galinhas brasileiras Canela-Preta apresentam esse sistema de criação comum das aves caipiras, logo são populações pequenas e são submetidas tanto à seleção natural sobre as fêmeas, como artificial sobre os machos, que correspondem a 50% da genética do plantel. Observou-se a presença de alelos nulos nas populações estudadas (Tab. 2). A ocorrência de desvios quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg também foi verificada em diversos trabalhos com aves (Dávila et al., 2009; Fonteque et al., 2014; Kumar et al., 2015).

As médias dos alelos e de heterozigosidades sugerem elevada variabilidade genética em galinhas crioulas Canela-Preta, o que torna importante a conservação desses animais como fonte de recursos genéticos, os quais poderão ser utilizados, no futuro, em programas de melhoramento genético de galinhas.

CONCLUSÃO

As galinhas crioulas Canela-Preta apresentaram elevada variabilidade genética para os *loci* analisados, o que sugere a conservação desse material genético, que deve ser mais estudado. Todos os *loci* de microssatélites utilizados nas análises foram significativamente polimórficos, o que demonstra alta variação entre as amostras. Portanto, eles podem ser utilizados em análises de variabilidade genética populacional e caracterização das galinhas Canela-Preta.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro da Fapemig, à Capes, à UFVJM, ao Projeto “Produtores do Futuro” e à Embrapa Meio-Norte.

REFERENCIAS

BASSAM, B.J.; CAETANO, A.G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, v.196, p.80-83, 1991.

BLACKBURN, H.D. The National Animal Germplasm Program: challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult. Sci.*, v.85, p.210-215, 2006.

CLEMENTINO, C.S.; BARBOSA, F.J.V.; CARVALHO, A.M.F. et al. Microsatellite DNA loci for population studies in Brazilian chicken ecotypes. *Int. J. Poult. Sci.*, v.9, p.1100-1106, 2010.

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

CROOIJMANS, R.P.M.A.; DIJKHOF, R.J.M.; VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. New microsatellite markers in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. *Anim. Genet.*, v.28, p.427-437, 1997.

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

FONTEQUE, G.V.; BATTILANA, J.; PALUDO, E.; LIMA-ROSA, C.A.V. Genetic polymorphism of fifteen microsatellite loci in Brazilian (blue-egg Caipira) chickens. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.34, p.98-102, 2014.

GUIDELINES for development of national management of farm animal genetic resources plans: Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): recommended microsatellite markers. Rome, Italy: FAO, 2004. 58p.

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

KUMAR, V.; SHUKLA, S.K.; MATHEW, J.; SHARMA, D. Genetic diversity and population structure analysis between Indian red jungle fowl and domestic chicken using microsatellite markers. *Anim. Biotechnol.*, v.26, p.201-210, 2015.

LIU, G.Q.; JIANG, X.P.; WANG, J.Y. et al. Analysis of genetic diversity of Yangzhou Chicken by microsatellite markers. *Int. J. Poult. Sci.*, v.7, p.1237-1241, 2008.

Variabilidade genética...

- LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. *et al.* Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cienc. Invest. Agrar.*, v.35, p.77-86, 2008.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUK, L.E.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, v.7, p.639-655, 1998.
- McCONNELL, S.K.J.; DAWSON, D.A.; WARDLE, A.; BURKE, T. The isolation and mapping of 19 tetranucleotide microsatellite markers in the chicken. *Anim. Genet.*, v.30, p.183-189, 1999.
- MENEZES, M.P.C.; MARTINEZ, A.M.; RIBEIRO, M.N. *et al.* Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microsatélites. *Rev. Bras. Zootec.*, v.35, p.1336-1341, 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.
- POSSAMAI, M.H.P.; BATTILANA, J.; PALUDO, E. *et al.* Genotypic characterization of ten microsatellite loci in two Brazilian free range (Caipira) chicken lines. *Ciênc. Rural*, v.45, p.877-883, 2015.
- QU, L.; LI, X.; XU, G. *et al.* Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Sci. China. S. C, Life Sci.*, v.49, p.332-341, 2006.
- RICE, W.R. Analyzing tabelas of statistical tests. *Evolution*, v.43, p.223-225, 1989.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol. Ecol.*, v.8, p.103-106, 2008.
- TADANO, R.; NISHIBORI, M.; TSUDZUKI, M. Genetic structure and differentiation of the Japanese extremely long-tailed chicken breed (Onagadori), associated with plumage colour variation: suggestions for its management and conservation. *Anim. Genet.*, v.40, p.989-992, 2009.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol.*, v.4, p.535-538, 2004.