

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**MAPEAMENTO DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS  
QUANTITATIVAS ASSOCIADOS A DESEMPENHO E CARCAÇA  
NOS CROMOSSOMOS 11 E 13 DE *Gallus gallus***

CLARISSA BOSCHIERO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Fevereiro – 2006

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
CAMPUS DE BOTUCATU

**MAPEAMENTO DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS  
QUANTITATIVAS ASSOCIADOS A DESEMPENHO E CARÇAÇA  
NOS CROMOSSOMOS 11 E 13 DE *Gallus gallus***

CLARISSA BOSCHIERO  
Zootecnista

ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA SILVIA  
ALVES MEIRA TAVARES MOURA

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Zootecnia como parte das  
exigências para obtenção do título de Mestre.

BOTUCATU - SP  
Fevereiro - 2006

*CERTIFICADO DE APROVAÇÃO*

*FORNECIDO PELA*

*SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO*

*“Façamos o homem à nossa imagem e semelhança.  
Que ele reine sobre os peixes do mar, sobre as aves do céu,  
sobre os animais domésticos e sobre todos os répteis que se  
movem sobre a terra, e domine em toda a terra” (Gênesis 1, 26).*

## Dedico

*Para meus pais, Célia e Gilio pela educação, incentivo e amor incondicional.*

*A Deus pela oportunidade de aprendizado.*

*Aos animais que vivem para o progresso da ciência.*

## **AGRADECIMENTOS**

### **Agradeço especialmente**

Profa. Dra. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura pela orientação, amizade, ajuda constante e pelo grande aprendizado;  
Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pelo apoio, confiança e por ter aberto as portas do Laboratório de Biotecnologia Animal (Esalq);  
Pesquisadora Dra. Mônica Corrêa Ledur pelo incentivo, amizade e por fornecer a população experimental.

### **Agradeço às entidades**

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu (FMVZ/Unesp) pela oportunidade de realização do mestrado.  
Esalq e Embrapa Suínos e Aves pelo apoio.  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

### **Agradeço às pessoas que contribuíram diretamente**

Colegas da equipe "QTL" - Raquel, Marcel e Millor pela amizade, apoio e aprendizado.  
Todos os colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal (Esalq) pela amizade e apoio.  
Prof. Dr. José Roberto Sartori e Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira pelas sugestões, e aos demais professores do Programa de Pós Graduação em Zootecnia da FMVZ, Botucatu.  
Funcionárias da FMVZ - Carmen, Seila e Solange pelo apoio e paciência.  
Secretária Giovana do Laboratório de Biotecnologia Animal (Esalq) pela atenção e auxílio prestados.

### **Agradeço às pessoas que contribuíram indiretamente**

Célia, Gilio, Dani, Angel, André e Mônica por todo amor e incentivo.  
Amigas e amigos que de alguma forma estiveram presentes.  
Luciano pelo carinho e amor.  
Em especial, Maria do Carmo pela grande amizade e acolhimento nestes anos.

## SUMÁRIO

	Página
Lista de Siglas.....	vix
CAPÍTULO 1.....	10
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	10
1 Importância da avicultura e genoma da galinha doméstica ( <i>Gallus gallus</i> )...	10
2 Genética molecular x Melhoramento genético animal.....	12
3 Marcadores moleculares e mapas genéticos.....	13
4 Locos de características quantitativas (QTLs).....	17
4.1 Populações e delineamentos experimentais para estudos de mapeamento de QTLs.....	20
4.2 Métodos estatísticos para detecção de QTLs.....	22
4.3 Níveis de significância.....	22
4.4 Problemas e limitações no mapeamento de QTLs.....	23
4.5 Aplicações do mapeamento de QTLs e seleção assistida por marcadores (MAS).....	24
5 Trabalhos de mapeamento de QTLs em <i>Gallus gallus</i> .....	25
Referências Bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 2.....	39
MAPEAMENTO DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS ASSOCIADOS A DESEMPENHO E CARÇA NOS CROMOSSOMOS 11 E 13 DE <i>Gallus gallus</i> .....	40
Resumo .....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	44
População experimental.....	44
Colheita dos dados fenotípicos e amostras de sangue.....	45
Extração e quantificação de DNA.....	46
Amplificação dos marcadores microssatélites.....	47
Genotipagem.....	48
Mapas de ligação.....	48
Análise de Mapeamento de QTLs.....	49

Resultados.....	51
Amplificações por PCR.....	51
Seleção dos marcadores informativos e genotipagens.....	51
Mapas de ligação.....	52
Análise estatística exploratória e ajuste dos dados fenotípicos.....	52
Análise de mapeamento de QTLs.....	53
Cromossomo 11.....	53
Cromossomo 13.....	54
Discussão.....	54
Mapas de ligação.....	54
Análise de mapeamento de QTLs.....	56
Cromossomo 11.....	56
Cromossomo 13.....	58
Referências Bibliográficas.....	61
CAPÍTULO 3.....	80
IMPLICAÇÕES.....	80
Anexos.....	81



## LISTA DE SIGLAS

AFLP - *Amplified fragment length polymorphism* – Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados.

BLAD - *Bovine leukocyte adhesion deficiency* - Deficiência de adesão leucocitária bovina.

cM – centiMorgan.

DNA - *Deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucléico.

ETL - *Economic trait loci* - Locos de características econômicas.

IGF-2 - *Insulin-like growth factor 2* – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2.

KIT - *C-kit receptor tyrosine kinase* – Receptor C-Kit tirosina quinase.

LOD - *Likelihood of odds* – Chances de probabilidades.

MAS - *Marker assisted selection* - Seleção auxiliada por marcadores.

PCR - *Polymerase chain reaction* - Reação em cadeia da polimerase.

PSE - *Pale, soft e exudative* – Carne pálida, textura flácida e perde água rapidamente.

QTL - *Quantitative trait loci* – Locos controladores de características quantitativas.

RAPD - *Random amplified polymorphic DNA* - Polimorfismo de DNA amplificado randomicamente.

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* – Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição.

SNPs - *Single nucleotide polymorphisms* - Polimorfismos de base única.

SSR - *Simple sequence repeats* – Microsatélites.

VNTR - *Variable number of tandem repeats* – Número variável de repetições em tandem.

## **CAPÍTULO 1**

### **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

#### **1 Importância da avicultura e genoma da galinha doméstica (*Gallus gallus*)**

A galinha (*Gallus gallus*) é o mais importante animal de produção do mundo com rápido crescimento; produz a principal fonte de proteína animal para a maioria das populações. É muito utilizada como modelo de pesquisa para estudos de comportamento animal, câncer e viroses, pesquisas de regulação gênica e estudos evolutivos (Groenen et al., 2000; McPherson et al., 2002; Jensen, 2005; Wicker et al., 2005).

Entre os animais domésticos, a galinha é o animal ideal para a aplicação da tecnologia de mapeamento genético e para análises de locos de características quantitativas (QTL) porque possui um curto intervalo de geração, pode gerar grandes famílias de irmãos completos e possibilita a obtenção de grandes quantidades de DNA das células sanguíneas vermelhas nucleadas. Além disso, o tamanho do genoma da galinha é pequeno comparado aos mamíferos, enquanto que a taxa de recombinação é similar à dos mamíferos (Crooijmans et al., 1996; Groenen et al., 1998; McPherson et al., 2002).

No Brasil a avicultura vem se consolidando como uma das atividades mais competitivas e tecnificadas do cenário internacional. O Brasil produziu 8,4 milhões de toneladas de carne de frango em 2004, com crescimento de 13% nos últimos dois anos (Avisite, 2005). A produção de carne de frango no período de janeiro a novembro de 2005 foi um total de 8.463.080 toneladas de aves produzidas, e a variação percentual sobre o ano anterior foi de 9,05% (União Brasileira de Avicultura, 2006).

Em 1975, ano em que foram iniciadas as exportações no Brasil, a avicultura brasileira representava perto de 5% da produção mundial (Embrapa Suínos e Aves, 2005). Passados 30 anos, segundo dados divulgados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil foi o responsável em 2005 por cerca de 40% da exportação mundial de carne de frango (Avicultura Industrial, 2005). Em 2004 foram exportadas 2,4 milhões de toneladas, tornando o Brasil o maior exportador mundial de carne de frango (Avisite, 2005). Até outubro de 2005, o país exportou 2.325.104 toneladas de carne de frango (Avicultura Industrial, 2005). O USDA estimou um crescimento de 5,8% para as exportações brasileiras no ano de 2005, em relação a 2004 (Tabela 1).

Com a demanda crescente por produtos avícolas são necessárias melhorias em todos os aspectos da produção, e cada vez mais, é preciso o desenvolvimento de novas tecnologias para gerar produtos com maior qualidade e menores custos. A evolução e competitividade da indústria avícola brasileira têm impulsionado a constante busca da melhoria do material genético das linhagens (Stringhini et al., 2003). Por isso é importante melhorar a qualidade da carne, diminuir os teores de gordura, aumentar a porcentagem de carnes nobres, não esquecendo da saúde do animal, para terem um desenvolvimento sadio. Características de carcaça e composição corporal são importantes considerações da moderna produção animal (Pomp et al., 2004).

O primeiro genoma seqüenciado de um animal doméstico foi o da galinha, concluído em 2004. Foi utilizado o DNA de uma única fêmea ancestral selvagem das galinhas domésticas atuais, a *Red Jungle Fowl* (Chicken Genome, 2005). O conhecimento da seqüência do genoma é necessário para uma melhor compreensão da estrutura, evolução e arranjo dos genes, assim como a comparação com outros organismos. Como ocorre na maioria das espécies de aves, a galinha possui um genoma relativamente pequeno de  $1,1 \times 10^9$  pares de bases (pb) de DNA, ou de 39% do tamanho do genoma humano, e estudos prévios sugerem o conteúdo de aproximadamente apenas 15% de DNA repetitivo, onde as seqüências microssatélites são altamente polimórficas. Existe uma baixa quantidade de seqüências repetitivas comparadas aos genomas de mamíferos, o que facilita o seqüenciamento e a procura por genes em galinhas (Fillon, 1998; McPherson et al., 2002; Wicker et al., 2005; Jensen, 2005).

O genoma da galinha consiste de 38 pares de autossomos e dois cromossomos sexuais Z e W (Figura 1). A fêmea é o sexo heterogamético (ZW), e o macho é o sexo homogamético (ZZ). Segundo Schmid et al. (2000), o cariótipo da galinha está dividido em oito pares de grandes cromossomos citologicamente distinguíveis (macrochromossomos); 30 pares de pequenos cromossomos (microchromossomos) e os cromossomos sexuais.

Além da diferença de extensão, existem outras entre os macrochromossomos e os microchromossomos: (a) maior densidade de genes nos microchromossomos do que nos macrochromossomos; (b) os microchromossomos possuem alto conteúdo de guanina e citosina e baixo conteúdo de adenina e timina; (c) os microchromossomos representam 30% do genoma. Alguns estudos demonstraram que 75% de todos os genes da galinha estão localizados nos microchromossomos, ou seja, eles estão

associados à alta atividade genética (Fillon, 1998; Schmid et al., 2000). Fillon (1998) afirma também que existem duas possibilidades que podem explicar a origem dos microcromossomos: estes se fundiram para a formação dos macrocromossomos; ou, houve a fragmentação dos macrocromossomos que resultou nos microcromossomos.

Estudos demonstram alto nível de regiões de sintenia entre o genoma de mamíferos e aves, isso faz da galinha um modelo de evolução intermediária e possibilita o aproveitamento da informação adquirida no estudo do genoma humano sobre genes (Fillon, 1998; Groenen et al., 2000; McPherson et al., 2002).

## **2 Genética molecular x Melhoramento genético animal**

A partir da década de 70, os cientistas começaram a manipular a molécula de DNA. Desde então, a biologia molecular obteve grandes avanços tecnológicos, que têm culminado em importantes fontes de conhecimentos sobre a localização, função e expressão dos genes em diferentes espécies animais. Uma das grandes mudanças na biologia moderna é a compreensão da base genética da diversidade fenotípica das espécies (Andersson e Georges, 2004).

Uma das técnicas mais importantes neste campo é a reação em cadeia da polimerase (PCR – *Polimerase Chain Reaction*) desenvolvida na década de 80, que permite a amplificação de segmentos específicos do DNA em milhares de cópias em poucas horas. Desta poderosa técnica, outras se derivaram como clonagem, seqüenciamento e análise de polimorfismos de DNA. Outras ferramentas fundamentais que estão sendo muito utilizadas são os marcadores moleculares e os mapas genéticos. A aplicação das técnicas moleculares na análise dos genomas vem apresentando excelentes vantagens biológicas e econômicas para os estudos genéticos das espécies domésticas (Macari et al., 2002).

O melhoramento genético tradicional vem proporcionando inúmeros benefícios para a agropecuária, porém existem limitações e desvantagens da seleção pelo fenótipo. A seleção clássica é baseada no fenótipo e algumas vezes este não é fácil de ser identificado precocemente para características ligadas ao sexo (produção de leite e ovos); e pode ser de difícil mensuração para algumas características como: eficiência alimentar, resistência a doenças, qualidade da carne e carcaça. Em muitos casos o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo (Martinez e Machado, 2002).

A genética quantitativa, aliada ao uso de técnicas computacionais e estatísticas tem assegurado o ganho genético contínuo em todas as características de produção em aves. Cerca de 80% das melhoras obtidas nas linhagens de corte e postura foram decorrentes do melhoramento genético, acompanhadas de controle ambiental e nutrição adequada. Este melhoramento tem sido realizado sem o conhecimento do número e do efeito dos genes que atuam nas características de interesse (Embrapa Suínos e Aves, 2003). Junto com o sucesso do melhoramento genético na evolução das características de aves de corte e postura, surgiram respostas correlacionadas prejudiciais: aumento de doenças metabólicas, carne de baixa qualidade (PSE), diminuição da fertilidade e resistência à doenças infecciosas em aves de corte, aumento da incidência de osteoporose e problemas na qualidade da casca dos ovos em poedeiras (Ledur et al., 2003).

As novas tecnologias do melhoramento genético, surgidas com a genética molecular, não vão substituir os métodos tradicionais, mas sim complementá-los. Estas novas tecnologias têm sido adotadas principalmente para características de baixa herdabilidade, encontradas em um dos sexos e mensuradas apenas após o abate. A combinação de seleção genética tradicional e métodos modernos moleculares são ideais para o melhoramento de galinhas no futuro (Li et al., 2005).

### **3 Marcadores moleculares e mapas genéticos**

Marcadores são marcos no genoma que podem representar um gene ou um fragmento de DNA, e podem ser morfológicos ou moleculares. Até meados da década de 60, os marcadores utilizados em estudos de genética e melhoramento eram controlados por genes associados a caracteres morfológicos (marcadores morfológicos), mas estes apresentavam uma série de restrições e desvantagens, como: o número reduzido de marcadores e falta de ligação destes com caracteres de importância econômica. Depois foram desenvolvidos os marcadores moleculares, como isoenzimas ou fragmentos de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Existem vários tipos de marcadores moleculares, tais como: isoenzimas, RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), VNTR (*Variable number of tandem repeats*), RAPD (*Random amplified polymorphic*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), microssatélites e SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*).

Os marcadores isoenzimáticos correspondem a genes associados a características importantes, que produzem polimorfismos de proteínas. Os outros tipos

de marcadores moleculares são fragmentos de DNA repetidos ou não no genoma. A maioria não apresenta variação associada a fenótipos, porém podem estar associados a determinados fenótipos, por localizarem-se próximos a regiões ou genes responsáveis por determinada característica. Portanto, os marcadores moleculares são pontos de referência nos cromossomos de organismos, correspondendo ou não a regiões expressas.

Segundo Griffiths et al. (1998), os genomas apresentam muitos pontos de variação (polimorfismos) no DNA, ou seja, embora todos os membros de uma espécie tenham mais ou menos os mesmos genes, os organismos dentro da espécie diferem nos pontos variantes que contêm. Estes pontos (marcadores) são importantes porque se um animal for heterozigoto para um destes pontos, os dois tipos diferentes de DNA podem ser considerados alelos e podem ser usados no mapeamento como alelos heterozigotos de um efeito conhecido. De fato, os indivíduos em geral contêm grandes números de pontos de DNA heterozigotos, que podem ser usados como locos marcadores de DNA no mapeamento.

Walling et al. (1998) afirmam que a utilização de marcadores genéticos é atualmente muito difundida e esta tecnologia é acessível e adaptável a muitas aplicações. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), as aplicações dos marcadores moleculares são inúmeras, tais como: identificação e discriminação de genótipos, testes de paternidade, estudos de diversidade genética, construção de mapas genéticos e bibliotecas genômicas, mapeamento de QTL, seleção assistida por marcadores (MAS), entre outras.

De acordo com Dekkers (2004), durante as décadas passadas avanços na genética molecular trouxeram a identificação de múltiplos genes ou marcadores genéticos associados a genes que afetam características de interesse na produção animal, e isso nos traz a oportunidade de aumentar a resposta de seleção, em particular para características difíceis de serem melhoradas pela seleção convencional. Regitano e Coutinho (2001) afirmam que o uso de marcadores moleculares permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão e antes mesmo da expressão do seu fenótipo. Em outras palavras, talvez seja possível no futuro determinar o genótipo de um embrião, para algumas características, sem que seja necessário avaliar a sua produção ou sua progênie.

Alguns exemplos de aplicações de marcadores moleculares na produção animal, que já estão sendo utilizados comercialmente (Regitano e Coutinho, 2001; Ledur et al., 2003; Dekkers, 2004):

- 1) Receptor da rianodina; IGF-2; receptor do estrogênio e KIT (afeta cor da pelagem) em suínos.
- 2) K-caseína e  $\beta$ -lactoglobulina que afetam a qualidade do leite.
- 3) BLAD, miostatina e GeneSTAR em bovinos.
- 4) Gene do pescoço pelado, que confere tolerância ao calor e grupo sanguíneo B que está relacionado à resistência a doenças em aves.

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998) uma grande proporção do genoma de organismos eucariotos é composta de seqüências repetidas de DNA. Várias classes destas seqüências têm sido caracterizadas, e diferem no número e composição de nucleotídeos. Exemplo deste tipo de seqüência são os microsatélites. Os marcadores microsatélites, ou SSR (*simple sequence repeats*) são seqüências curtas de um a seis nucleotídeos repetidos em tandem e são co-dominantes (ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados). É a classe de marcadores mais freqüente, polimórfica, melhor distribuída ao acaso e fácil de ser detectada por PCR, por isso é a mais utilizada no mapeamento de QTL.

Os microsatélites são amplificados por PCR, utilizando-se um par de iniciadores (*primers*) específicos (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam o microsatélite. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A visualização dos alelos por PCR é feita por eletroforese em gel de agarose (baixa definição), ou poliacrilamida (alta definição), ou ainda por equipamentos mais sofisticados como seqüenciadores automáticos de DNA.

Segundo Primmer et al. (1997), o número de seqüências microsatélites tende a se correlacionar positivamente com o tamanho do genoma. Os mesmos autores afirmam que em galinhas os microsatélites não estão uniformemente distribuídos no genoma e, além disso, encontram-se em baixa densidade nos microcromossomos, o que é um obstáculo para o mapeamento genético. Porém, Smith et al. (2000), discordam destes resultados, pois encontraram mais seqüências microsatélites do que o esperado nos microcromossomos de galinhas. Esta discrepância entre os dois estudos pode ser explicada por um problema na técnica PRINS (*Primed in situ*) utilizada por Primmer e colaboradores.

Uma grande variabilidade no número de repetições da maioria dos locos de microsatélites faz deles úteis no mapeamento genético, testes de paternidade, estimação de variabilidade genética, estudos e genética de populações e mapeamento de QTLs (Crooijmans et al., 1997). A única desvantagem dos microsatélites é o

trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores. Porém, atualmente existe um número suficiente disponível para galinhas.

O genoma pode ser considerado em vários níveis, e muitas técnicas têm sido desenvolvidas para o mapeamento de locais específicos. As unidades básicas utilizadas para medir o genoma são pares de bases de DNA (pb), genes, frequências de recombinação, unidades de mapa genético (cM) e cromossomos (Weller, 2001). Os mapas de ligação ou genéticos constituem um aspecto essencial do estudo genético experimental de qualquer organismo. Há uma forte implicação de que o tamanho de um mapa de ligação seja proporcional ao mapa físico. As distâncias genéticas, de fato, são mais ou menos proporcionais às cromossômicas (Griffiths et al., 1998). O mapa é construído utilizando as informações obtidas na análise de ligação de locos polimórficos e ligação meiótica ao longo do cromossomo (Packer e Paz, 2001).

Os mapas de ligação são obtidos a partir de uma análise genética; segundo Griffiths et al. (1998), podemos usar a taxa de recombinação como um indicador quantitativo da distância linear entre dois genes. Quanto maior a distância, maior a probabilidade das cromátides não-irmãs se cruzarem na região entre os genes, e portanto, maior a proporção de recombinantes que seriam produzidos. Determinando a frequência de recombinantes, obtemos uma medida de distância de mapa entre os genes. A frequência de recombinação de 0,01 ou 1% é definida como aproximadamente 1 cM (centiMorgan). Segundo Weller (2001), apesar da média de 1 cM ser cerca de um milhão de pares de bases, tem sido mostrado que nos mapas físicos certas regiões possuem uma alta frequência de recombinação, enquanto outras possuem um baixo nível. Além disso, esta frequência é afetada por outros fatores, como o sexo dos animais avaliados ou espécie, por isso podemos encontrar divergências de tamanho entre os mapas genéticos e físicos.

O desenvolvimento de mapas genéticos é considerado uma das aplicações de maior impacto na tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Estes mapas são necessários para estudos de mapeamento de QTL. O mapa de ligação, em princípio, pode identificar todas as regiões do cromossomo contendo um QTL ou grupos de QTLs com magnitude de efeito razoável (Packer e Paz, 2001).

O primeiro mapa de ligação genético de aves foi publicado por Hutt em 1936, e constituiu também o primeiro mapa de ligação relatado para uma espécie de animal doméstico (Macari et al., 2002). Porém o primeiro mapa genético construído completamente com marcadores de DNA em galinhas foi publicado por Bumstead e



Palyga em 1992. Este mapa que utilizou a população referência de *Compton* consistiu apenas de marcadores RFLP, os quais não eram apropriados para a construção dos mapas genéticos de todo o genoma em grandes populações. Posteriormente, outro mapa foi publicado por Levin e colaboradores em 1994, utilizando a população referência de *East Lansing*. E em 1998 foi publicado, por Groenen e colaboradores, um mapa genético de galinhas construído com as informações da população referência *Wageningen* (Groenen et al., 1998).

Em 2000 foi publicado um mapa de ligação da galinha denominado de *Consensus Linkage Map* (Mapa Consenso) por Groenen e colaboradores e foram utilizadas as três populações referência - *East Lansing*, *Wageningen* e *Compton*. De acordo com ele, o genoma da galinha apresenta um total de 1889 locos, sendo que 480 têm sua localização definida nos cromossomos e 235 representam genes identificados ou seqüências que podem ser relacionadas a genes conhecidos, e 801 microssatélites distribuídos em 3800 cM de extensão (Groenen et al., 2000). Este mapa foi atualizado posteriormente por Schmid et al. (2000). Atualmente, existem (jan./2006) 2530 locos no mapa de ligação da galinha, sendo que 765 são genes identificados (ARKdb, 2006). Na Figura 2 podemos verificar os mapas Consenso dos cromossomos 11 e 13 da galinha.

Em virtude do extenso polimorfismo dos marcadores microssatélites, os mapas genéticos facilitam a detecção e localização dos locos controladores de características quantitativas. O conhecimento de mapas genômicos de aves constitui o primeiro passo para se fazer uso prático das metodologias com utilização de DNA, permitindo uma série de aplicações (Macari et al., 2002).

#### **4 Locos de características quantitativas (QTLs)**

Muitas das características de interesse econômico em plantas e animais são de natureza quantitativa, ou seja, os fenótipos observados são distribuídos continuamente e refletem a ação de muitos locos mais o efeito ambiental (De Koning et al., 1998). As características denominadas de quantitativas, complexas, multifatoriais ou poligênicas são o foco de estudos de mapeamento de QTL. Segundo Griffiths et al. (1998), estas se caracterizam por não possuírem segregação de modo simples nos cruzamentos; elas variam mais ou menos continuamente em uma faixa. A continuidade de fenótipo é o resultado de dois fenômenos: (1) cada genótipo não tem uma única expressão

fenotípica, mas cobre uma ampla gama fenotípica; (2) muitos locos segregantes podem ter alelos que fazem diferença para o fenótipo que está sendo observado. Além disso, a influência do efeito ambiental.

Mackay (2001) afirma que a maioria das características econômicas importantes em animais domésticos é quantitativa e embora sejam influenciadas por muitos genes não são igualmente influenciadas por todos eles, ou seja, alguns genes terão efeitos maiores, e outros efeitos menores. A hipótese de muitos fatores, como é conhecida, explica que um grande número de genes (poligenes) de pequeno efeito está segregando para produzir uma característica quantitativa (Griffiths et al., 1998).

Dekkers (2004) afirma que para a finalidade de detecção e aplicação de QTL, as características quantitativas podem ser classificadas em: (1) Características rotineiramente mensuradas; (2) Características difíceis de serem mensuradas (ex. consumo de alimento); (3) Características não mensuráveis (ex. resistência a doenças). Cada uma destas pode ser subdividida em características que são: (4) Mensuradas nos dois sexos; (5) Limitadas ao sexo; (6) Mensuradas tardiamente. A habilidade de detectar QTL depende da disponibilidade dos dados fenotípicos e decresce de 1 até 6, porém para as características difíceis de serem medidas, pode haver maiores ganhos genéticos com a MAS (seleção assistida por marcadores), quando comparadas com as da categoria 1.

Segundo Andersson e Georges (2004), o principal desafio das características complexas não é detectar os QTLs, mas descobrir os genes que os explicam. Falconer e Mackay, 1996 afirmam que: "a identificação de genes individuais pode ter inúmeras aplicações úteis: (a) Pode-se aumentar a eficácia da seleção especialmente para características com baixa herdabilidade e que são mensuradas em apenas um dos sexos; (b) A tecnologia dos transgênicos poderá ser aplicada para características quantitativas; (c) Na medicina, a identificação de alelos causando predisposição a doenças multifatoriais comuns, como doenças do coração ou diabetes, poderá ajudar a melhorar os métodos de prevenção; (d) A teoria da genética quantitativa poderá ser mais realista quando o número e as propriedades dos genes forem conhecidos".

São várias as definições para QTL (do inglês - *Quantitative trait loci*) ou locos de características quantitativas, algumas vezes também são chamados de ETL (locos de características econômicas). Uma região do cromossomo que contém um ou mais genes que influenciam uma característica multifatorial é conhecido como QTL (Andersson e Georges, 2004). Hocking (2005) afirma que a estimativa estatística da melhor localização para um suposto gene é chamada de QTL quando o valor

individual para uma característica é regularmente distribuído. Erickson et al. (2004) afirmam que um QTL é uma região cromossômica flanqueada por dois marcadores delimitando sua posição no genoma.

A lógica de mapeamento de QTL não é nova e foi utilizada pela primeira vez por Sax em 1923 para mapeamento de QTLs associados com o tamanho de sementes de feijão através da ligação com um loco de pigmento (Mackay, 2001). Avanços na tecnologia de marcadores e, paralelamente, no desenvolvimento de *softwares* analíticos para análises combinadas de informações fenotípicas e genéticas, resultaram na aplicação da análise de QTL na medicina, agricultura, ecologia e evolução (Erickson et al., 2004). Segundo Slate (2005) nos últimos 15 anos o mapeamento de QTL tem se tornado um método popular para a compreensão da base genética da variação contínua em uma variedade de sistemas. Ikeobi et al. (2004), afirmam que: “a identificação de QTL é o primeiro passo para a caracterização de variações genéticas que ocorrem no nível dos genes e do DNA”.

Para o mapeamento genético de qualquer característica simples ou complexa, devem-se seguir três etapas: (1) varrer o genoma todo com uma coleção densa de marcadores genéticos; (2) calcular uma apropriada ligação estatística  $S(x)$  para cada posição  $x$  ao longo do genoma; (3) identificar as regiões nas quais a ligação estatística  $S$  mostra um desvio significativo do que seria esperado caso houvesse segregação independente (Lander e Kruglyak, 1995). Os genes que segregam em um QTL não podem ser individualmente identificados na maioria dos casos. É possível, entretanto, localizar as regiões do genoma nas quais estão os locos relevantes e estimar o quanto da variação total é explicada pela variação do QTL.

Esta análise é feita cruzando duas linhagens que diferem na característica quantitativa e também diferem nos alelos de locos conhecidos (marcadores). A geração F1 entre duas linhagens é cruzada entre si para se obter uma geração F2 segregante, ou pode ser retrocruzada com uma das linhagens parentais. Buscam-se regiões cromossômicas comuns a indivíduos aparentados que apresentam desempenho superior para as características de interesse e que, ao mesmo tempo, tendem a diferir entre indivíduos aparentados com desempenho superior e inferior. Se existirem QTLs proximamente ligados a um marcador, então os diferentes genótipos marcadores na geração segregante também levarão os alelos dos QTLs que estavam ligados a eles nas linhagens parentais originais (Griffiths et al., 1998).

Segundo Seaton et al. (2002): “o *QTL Express* (QTL Express, 2005) é a primeira aplicação para mapeamento de QTL em populações exogâmicas com o uso

de uma interface na Internet”. São necessários para a análise três arquivos contendo: o mapa de marcadores, fenótipos e genótipo dos marcadores; para realização do mapeamento de um ou de múltiplos QTLs. Para populações derivadas de cruzamentos, o modelo para o mapeamento de QTL pode ser especificado, em termos de efeitos aditivos e de dominância, com a opção de interação entre um QTL e um efeito fixo. Também para populações exogâmicas o modelo de QTL pode incluir efeito gamético (*imprinting*). Além disso, são realizados testes de permutação, limiar de significância das ligações para todo o genoma, e o procedimento de *bootstrap* para estimar o intervalo de confiança dos QTLs.

#### **4.1 Populações e delineamentos experimentais para estudos de mapeamento de QTLs**

Para desenvolver uma população para o mapeamento de QTL, as linhagens parentais devem ter variação tanto no DNA quanto fenotípica. Quanto mais variação, mais fácil será encontrar marcadores informativos (polimórficos), que permitam traçar eventos de recombinação para o mapeamento de QTL (Nones, 2004). Em aves e suínos a maioria dos estudos de mapeamento de QTL tem sido realizada através de cruzamentos de linhagens ou raças genética e fenotipicamente divergentes (De Koning et al., 2003). Esta abordagem foi utilizada para mapear QTLs para uma grande variedade de características em suínos (Knott et al., 1998; De Koning et al., 1999 e 2001), frangos (Van Kaam et al., 1999 a e b; Calborg et al., 2004; Jennen et al, 2005, Ikeobi et al., 2002 e 2004) e codornas (Minvielle et al., 2005).

Segundo Ledur e Bertani (2002), são poucas as populações para estudos de QTL em galinhas no mundo. Os cruzamentos mais utilizados são:

1. Entre linhagens de postura e corte (Ledur et al., 2000; Hamoen et al., 2001; Ikeobi et al., 2002; Sewalen et al., 2002; Calborg et al., 2004),
2. Entre linhagens de postura: Buitenhuis et al. (2004), utilizaram duas linhagens com comportamentos divergentes; Siwek et al. (2004), trabalharam com linhagens de respostas imunológicas diferentes,
3. Entre linhagens de corte: Van Kaam et al. (1998), utilizaram uma linhagem paterna selecionada para crescimento e uma linhagem materna selecionada para características reprodutivas; Zhu et al. (2003), trabalharam com linhagens diferentes quanto à resistência a coccidiose e doença de Marek; Jennen et al. (2004), utilizaram uma

população derivada da raça *White Plymouth Rock*, com características divergentes para gordura.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Suínos e Aves em colaboração com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq) desenvolveram uma população experimental de aves a partir do cruzamento de uma linhagem de corte e uma de postura. Essa população contribui para elucidar diferenças na expressão gênica e nos efeitos de QTLs, bem como possibilita estudos sobre efeito materno, citoplasmático, ligado ao sexo e efeito gamético (*gametic imprinting*) (Ledur et al., 2000).

Nesta população experimental brasileira estão sendo realizados estudos de mapeamento de QTLs. Nos cromossomos 1 a 5 foram mapeados QTLs para as características de: peso vivo, consumo de ração, carcaça e peso de órgãos (Nones et al., 2006; Baron, 2004 e Ruy, 2004). Nos cromossomos 6, 7 e 8 foram mapeados QTLs sugestivos para: características de crescimento, consumo de ração, peso da moela e dos pés (Moura et al., 2006).

Grande número de delineamentos experimentais e de metodologias estatísticas tem sido proposto para se detectar QTLs. Todos os delineamentos sugeridos têm vários elementos em comum. Considera-se que um loco de característica quantitativa esteja ligado ao loco de um marcador com a frequência de recombinação  $r$ . Para simplificar, pressupõe-se que apenas dois alelos estão segregando na população para ambos os locos, do marcador M e do QTL Q. Os genótipos dos marcadores podem ser denominados M1M1, M1M2 e M2M2. Os genótipos do QTL podem ser denominados Q1Q1, Q1Q2 e Q2Q2. Desde que M e Q estejam ligados, aquelas progênies que receberem M1 também receberão Q1, enquanto que aquelas que receberem M2, também receberão Q2, exceto pelos indivíduos recombinantes. Dessa forma, o efeito do QTL pode ser detectado pela comparação das médias dos grupos de progênie que receberem alelos marcadores alternativos dos pais heterozigotos (Regitano e Coutinho, 2001).

Para a identificação de QTL geralmente são utilizados dados provenientes de cruzamentos entre linhagens ou raças endogâmicas, ou de populações chamadas de segregantes ou exogâmicas, como ocorre na maioria dos animais domésticos. A análise de registros de cruzamentos entre linhagens endogâmicas apresenta algumas vantagens, como o conhecimento dos genótipos dos parentais, da fase de ligação e do número de alelos do suposto QTL (Silva et al., 2005). Segundo Hocking (2005), o delineamento experimental para a identificação de QTL para características de

produção é tipicamente uma população F2, do cruzamento de duas linhagens com 250 a 700 aves.

#### 4.2 Métodos estatísticos para detecção de QTLs

Para o mapeamento de QTL é necessário um grande número de testes estatísticos e diferentes métodos podem ser utilizados. Lander e Botstein, em 1989, desenvolveram o método por intervalo através da análise de dois marcadores adjacentes na forma de um intervalo. Esta abordagem baseia-se na estimativa de máxima verossimilhança dos parâmetros de frequência de recombinação, ordem dos marcadores e magnitude do efeito. O teste de hipótese é feito com o método de LOD (*likelihood of odds*) (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Haley e Knott (1992) demonstraram que uma análise de quadrados mínimos pode ser usada no mapeamento de intervalo, pois fornece testes estatísticos e estimativas muito similares às obtidas pelo método de máxima verossimilhança, permitindo a utilização de modelos mais complexos com menor demanda computacional. Segundo Haley et al. (1994), a desvantagem de se utilizar a máxima verossimilhança no mapeamento de intervalos é a sua complexidade computacional, o que dificulta as análises simultâneas de vários QTLs ligados, interações entre QTLs, efeitos de QTLs não ligados e efeitos fixos. Mas isso é discutível, em virtude dos modernos computadores disponíveis para análises. O que dificulta as análises de QTLs para populações exogâmicas é a falta de *softwares* desenvolvidos; um dos disponíveis é o *QTL Express* (QTL Express, 2005) o qual utiliza o método da regressão linear.

Os modelos de análise mais utilizados para populações exogâmicas são os de meio-irmãos (*half-sib*) (De Konning et al., 1998 e 2003) ou F2 (*line cross*) (Alfonso e Haley, 1998). A análise de meio-irmãos não faz suposição de fixação dos alelos do QTL nas linhagens parentais, diferente do modelo de F2, quando os alelos estão supostamente fixados (De Konning et al., 2001).

#### 4.3 Níveis de significância

O nível de significância para declarar a existência de um QTL pode ser expresso na forma de valor de LOD, que indica na escala logarítmica, a razão entre a

probabilidade dos dados observados terem surgido assumindo a presença de um QTL, sobre a probabilidade de sua ausência. Um QTL é significativo quando o LOD excede o escore de três, ou seja, indica que esta probabilidade é aproximadamente 1000 vezes maior (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os níveis de significância podem ser analisados de diferentes formas, seguindo outros critérios, como mostram alguns trabalhos, como o publicado por Lander e Kruglyak (1995). O apropriado limiar de significância da ligação deve ser declarado e pode ser calculado em função do tamanho do genoma e do número de cromossomos (Slate, 2005). Hocking (2005) afirma que: “a maioria dos autores utiliza níveis de significância baseados no critério sugerido por Lander e Kruglyak (1995)”.

Segundo Lander e Kruglyak (1995), uma ligação sugestiva é a evidência estatística esperada de encontrar um QTL aleatoriamente numa varredura genômica completa. Ligação significativa é a evidência estatística esperada de ocorrer 5% e ligação altamente significativa a evidência estatística esperada de ocorrer 1% na varredura genômica. Os resultados de uma ligação sugestiva devem ser acompanhados de um aviso sobre sua natureza tênue e, devem ser confirmados em outros estudos, nos quais conjuntos de dados antigos e novos são combinados para verificar se uma evidência significativa de ligação pode ser encontrada.

#### **4.4 Problemas e limitações no mapeamento de QTLs**

Andersson e Georges (2004) afirmam que a identificação de genes e mutações que causam um QTL é problemática por algumas razões. Primeiro é difícil determinar a localização exata de um QTL: estes são freqüentemente mapeados em regiões cromossômicas de 20 cM, que podem conter centenas de genes. Segundo: a maioria dos QTLs possui um efeito fenotípico ameno, portanto as mutações que os causam são difíceis de serem diferenciadas de polimorfismos neutros. A estimativa da localização de um QTL é muito imprecisa para serem feitas inferências se o mesmo QTL está segregando em diferentes populações (Hocking, 2005). Além disso, não apenas falsos QTLs podem ser identificados, mas também reais QTLs podem ser perdidos na varredura do genoma (Slate, 2005).

Muitos fatores podem alterar o poder de um experimento de QTL: tipo e número de marcadores, delineamento experimental, número de animais da população. Em experimentos empregando menos de 300 animais haverá dificuldade para estimação dos efeitos do QTL; quanto maior o número de animais, melhor será a

detecção de QTL. Alfonso e Haley (1998) afirmam que a fração total da variância fenotípica explicada por um QTL é o mais importante fator influenciando ou não a detecção.

Segundo Weller (2001), o principal problema é o tamanho relativamente pequeno das amostras da maioria dos experimentos em mapeamento de QTLs. Na maioria dos casos cujos efeitos do QTL não foram encontrados, o poder foi muito pequeno para encontrar QTL segregando numa magnitude razoável. As limitações em identificar a posição e efeito de um QTL residem em mensurar e genotipar populações de tamanho limitado (Erickson et al., 2004).

#### **4.5 Aplicações do mapeamento de QTLs e seleção assistida por marcadores (MAS)**

Segundo Dekkers (2004), existem QTLs que já estão sendo utilizados em populações animais comerciais, como exemplos: para características de crescimento e composição de carcaça em suínos (*Monsanto*, EUA) e gado de corte (*Genetic Solutions*, Austrália); e para características de composição do leite em gado leiteiro. Segundo Ikeobi et al. (2002), a identificação e uso de QTLs em programas de seleção oferecem o potencial para um rápido ganho genético, particularmente em características difíceis de serem mensuradas. Enquadram-se neste grupo as características reprodutivas, de carcaça, resistência a doenças e longevidade produtiva. Identificar QTLs associados com características de carcaça é interessante porque a maioria destas características não pode ser mensurada em animais vivos, por isso a utilização de QTL irá facilitar a seleção (Van Kaam et al., 1999b).

O próximo passo para experimentos de mapeamento de QTL é o mapeamento fino de regiões contendo QTLs de interesse, que requer mapas mais densos (Crooijmans et al., 1997). Depois de obtermos maiores informações sobre os efeitos dos QTLs e suas localizações, é possível a utilização destes dados na seleção assistida por marcadores (MAS – *marker assisted selection*), juntamente com os métodos tradicionais de seleção. Um fator importante que deve ser considerado é interações entre QTLs. Existem evidências que interações epistáticas entre QTLs são importantes efeitos nas características multifatoriais (Andersson e Georges, 2004). Essas interações ainda são pouco estudadas; no estudo de Calborg et al. (2004), foi realizado um mapeamento de pares de QTLs que interagem entre si para



características de crescimento. No cromossomo 13 houve interações epistáticas significativas com os QTLs encontrados nos cromossomos 1, 2 e 8.

Segundo Dekkers (2004), algumas das primeiras aplicações da MAS em animais de produção foi a seleção de aves resistentes a doenças, usando testes de Elisa para detecção do grupo sanguíneo B e a seleção de suínos sem o problema da síndrome do estresse suíno, através da detecção do gene do halotano. Posteriormente, outros testes genéticos foram desenvolvidos para a seleção de animais, como para a exclusão de genes que causam problemas genéticos, ou para adição de alelos que conferem características favoráveis, como o teste do gene receptor do estrogênio, que afeta o tamanho da leitegada em suínos.

Os efeitos da MAS são difíceis de serem quantificados, principalmente em condições experimentais, devido às diferenças entre os estudos. O sucesso da aplicação da MAS não é claro e depende da habilidade de integração das informações dos marcadores na seleção com os programas de melhoramento genético (Dekkers, 2004).

## **5 Trabalhos de mapeamento de QTLs em *Gallus gallus***

Existem diversos trabalhos de mapeamento de QTL em galinhas para características de desempenho e carcaça. Autores mapearam QTLs para características de consumo de alimento, peso corporal, crescimento, rendimento de carcaça, cor da carne, deposição de gordura, comportamento, musculatura, produção e características de ovos (Van Kaam et al., 1998, 1999 a, b; Tatsuda e Fujinaka, 2001; McElroy et al., 2002; Sewalen et al., 2002; Hocking e Burt, 2003; Kerje et al., 2003; Buitenhuis et al., 2003 e 2004; Ikeobi et al., 2002 e 2004; Sasaki et al., 2004).

Os principais trabalhos encontrados na literatura cujos autores mapearam QTLs (significativos ou sugestivos) no cromossomo 11 estão enumerados na Tabela 2, e para o cromossomo 13 na Tabela 3. Podemos observar o número de marcadores utilizados para cada cromossomo (quando esta informação estava disponível), número de animais envolvidos no estudo (F2) e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL.

Sasaki et al. (2004) buscaram QTLs em uma população oriunda de cruzamentos de aves *White Leghorn* e *Rhode Island Red* para características de peso corporal, produção e diversas características de ovos. Foram detectados QTLs significativos nos cromossomos 4, 11, 27 e Z e vários sugestivos. Em outro trabalho,

Kerje et al. (2003) mapearam QTLs para características de peso corporal, crescimento em diferentes idades (1-8, 8-46, 46-112 e 112-200 dias) e peso de ovos. Utilizaram 105 microssatélites, com a média de 24,3 cM de distância entre eles. Foram empregados quatro marcadores para o cromossomo 11 e dois para o 13. Encontraram QTLs significativos para os cromossomos 1 a 5, 7, 8, 11, 12, 14, 23, 27 e Z.

Jennen et al. (2004) estudaram as características de peso corporal, peso e porcentagem da gordura abdominal em galinhas nas idades de 7, 9 e 10 semanas. Foram mapeados 26 QTLs em diversos cromossomos e três QTLs no cromossomo 13. Sewalen et al. (2002) estabeleceram uma população F2 a partir de cruzamentos entre uma linhagem paterna de corte e uma linhagem de poedeiras. Utilizaram 101 marcadores microssatélites para o mapeamento de QTL associados ao peso corporal as 3, 6 e 9 semanas de idade. Foram identificados QTLs significativos nos cromossomos 1, 2, 4, 7, 8, 13, 27 e Z. Em uma outra população F2, sete QTLs com 5% de significância no cromossomo, foram mapeados no cromossomo 13 para características de crescimento e carcaça. Todos estes QTLs estão localizados a 15 cM (McElroy et al., 2002).

No estudo de Ikeobi et al. (2002) foi analisada a maioria dos cromossomos, para a identificação de QTLs associados a peso da gordura abdominal, peso da gordura da pele e distribuição de gordura. Foram mapeados QTLs significativos nos cromossomos: 1, 3, 5, 7, 13, 15 e 28. Utilizando a mesma população, Ikeobi et al. (2004) identificaram 30 QTLs significativos nos cromossomos 1 a 9, 13, 27 e Z para 11 características de carcaça. Em outro trabalho de identificação de QTLs em aves, mas envolvendo o comportamento das mesmas às 5 e 29 semanas de idade, foi encontrado um QTL sugestivo para frequência de defecação no cromossomo 11 (Buitenhuis et al., 2004).

O Capítulo 2, denominado **MAPEAMENTO DE LOCOS DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS ASSOCIADOS A DESEMPENHO E CARÇA NOS CROMOSSOMOS 11 E 13 DE *Gallus gallus***, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista ***Genetics and Molecular Biology***. O objetivo deste trabalho foi **identificar locos controladores de características quantitativas (QTLs) nos cromossomos 11 e 13 de galinhas (*Gallus gallus*) para características de desempenho e carcaça.**

## Referências Bibliográficas

ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature Reviews**, v. 5, p. 202-212, mar. 2004.

ALFONSO, L.; HALEY, C.S. Power of different F2 schemes for QTL detection in livestock. **Animal Science**, v. 66, p.1-8, 1998.

ARKDB, Chicken. Disponível em: <<http://www.thearkdb.org>>. Acesso em: 1 jan. de 2006.

AVICULTURA INDUSTRIAL, Estatísticas. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>>. Acessos em: 15 ago. de 2005 e 31 de dez. 2005.

AVISITE, Estatísticas. Disponível em: <[www.avisite.com.br](http://www.avisite.com.br)>. Acesso em: 10 set. de 2005.

BARON, E.E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. Tese (Doutorado) - Esalq, Piracicaba, 2004.

BUITENHUIS, A.J. et al. Identification of quantitative trait loci for receiving pecks in young and adult laying hens. **Poultry Science**, v. 82, p. 1661-16667, nov. 2003.

BUITENHUIS, A.J. et al. Identification of QTLs involved in open-field behavior in young and adult laying hens. **Behavior Genetics**, v.34, n.3, p. 325-333, maio 2004.

BUMSTEAD, N.; PALYGA, J. A preliminary linkage map of the chicken genome. **Genomics**, v. 13, p. 690-697, jul. 1992.

CALBORG, Ö. et al. Simultaneous mapping of epistatic QTL in chickens reveal clusters of QTL pairs with similar genetic effects on growth. **Genet. Res. Camb.**, v. 83, p. 197-209, 2004.

CHICKEN GENOME. Disponível em: <<http://genome.wustl.edu/projects/chicken/index.php>>. Acesso em: 17 jun. de 2005.

CROOIJMANS, R.P.M.A. et al. Preliminary linkage map of the chicken (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers: 77 new markers mapped. **Poultry Science**, v. 75, p. 746-754, jun. 1996.

CROOIJMANS, R.P.M.A. et al. New microsatellite markers in chicken optimized for automated fluorescent genotyping. **Animal Genetics**, v. 28, p. 427-437, dez. 1997.

DE KONING, D.J. et al. A strategy for QTL detection in half-sib populations. **Animal Science**, v. 67, p. 257-268, 1998.

DE KONING, D.J. et al. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). **Genetics**, v. 152, p. 1679-1690, ago. 1999.

- DE KONING, D.J. et al. Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 2812-2819, nov. 2001.
- DE KONING, D.J. et al. Quantitative trait locus detection in commercial broiler lines using candidate regions. **J. Animal Science**, v. 81, p. 1158-1165, maio 2003.
- DEKKERS, J.C.M. Commercial application of marker and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 313-328, jan. 2004.
- EMBRAPA SUÍNOS E AVES – EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br>>. Acesso em: 10 set. de 2005 e 15 ago. de 2003.
- ERICKSON, D.L. et al. Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2505-2522, set. 2004.
- FALCONER, D.S; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow: Longman Group, 464 p., 1996.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. Terceira edição, CENARGEN. Brasília, 220 p., 1998.
- FILLON, V. The chicken as a model to study microchromosomes in birds: a review. **Genet. Sel. Evol.**, v. 30, p. 209-219, 1998.
- GRIFFITHS, A.J.F. et al. **Introdução à genética**. Sexta edição, Editora Guanabara Koogan, p.856, 1998.
- GROENEN, M.A.M. et al. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. **Genomics**, v.49, p.265-274, abr. 1998.
- GROENEN, M.A.M. et al. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research**, v. 10, p. 137-147, jan. 2000.
- HAMOEN, F.F.A. et al. Detection of genes on the Z-chromosome affecting growth and feathering in broilers. **Poultry Science**, v. 80, p. 527-534, maio 2001.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, v. 69, p. 315-324, 1992.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S. A.; ELSEEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least-squares. **Genetics**, v. 136, p. 1195-1207, mar. 1994.
- HOCKING, P.M.; BURT, D.W. Identifying quantitative trait loci for growth, muscling and fatness traits in a broiler x layer cross. **Proc Aust Poultry Science Sym**, v. 15, p. 168 - 171, 2003.
- HOCKING, P.M. Review of QTL mapping results in chickens. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, p. 215-226, jul. 2005.
- HUTT, F.B. **Genetics of the fowl VI**. A tentative chromosome map. Neue Forschungen in Tierzucht und Abstammungslehre (Duerst Festschrift), p. 105-112, 1936.

IKEOBI, C.O.N. et al. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. **Animal Genetics**, v.33, p.428-435, dez. 2002.

IKEOBI, C.O.N. et al. Quantitative Trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Sciences**, v. 87, p. 143-151, 2004.

JENNEN, D.G.J. et al. Detection and localization of quantitative trait loci affecting fatness in broilers. **Poultry Science**, v. 83, p. 295-301, 2004.

JENNEN, D.G.J. et al. Confirmation of quantitative trait loci affecting fatness in chickens. **Genet. Sel. Evol.**, v. 37, p. 215-228, mar. – abr. 2005.

JENSEN, P. The chicken genome sequence. **Heredity**, v. 94, p. 567-568, abr. 2005.

KERJE, S. et al. The twofold difference in adult size between the red junglefowl and white leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. **Animal Genetics**, v. 34. p. 264-274, ago. 2003.

KNOTT, S.A. et al. Multiple marker mapping of quantitative trait loci in cross between outbred wild boar and Large White pigs. **Genetics**, v. 149, p. 1069-1080, jun. 1998.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-199, jan. 1989.

LANDER, E.; KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nat. Genet.**,v.11, p. 241-247, nov. 1995.

LEDUR, M.C.; BERTANI, G.R.; NONES, K. Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. APINCO, Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola, 2003, Campinas, FACTA. Anais... 2003. p. 87-105.

LEDUR, M.C.; BERTANI, G.R. Análise genômica na avicultura: Resultados e perspectivas. In: IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2002. Anais...Campo Grande, 2002.

LEDUR, M.C. et al. Peso e características de carcaça em linhagens utilizadas no desenvolvimento de populações referência para detecção de QTL em aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, supl. 2, p.73, 2000.

LEVIN, I. et al. An autosomal genetic linkage map of the chicken. **J. Hered.**, v. 85, p. 79-85, mar. 1994.

LI, H. et al. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with the very low density apolipoprotein-II gene. **Poultry Science**, v. 84, p. 697-703, maio 2005.

MACARI, M.; FURLAN, R.L.; GONZALES, E. **Fisiologia aviária – aplicada a frangos de corte**. Funep, 2002.

MACKAY, T. F. C. Quantitative trait loci in Drosophila. **Nature Reviews**, v. 2, p. 11-20, jan. 2001.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, Campo Grande, 2002. Anais... Campo Grande, 2002.

McELROY, J.P. et al. Molecular markers associated with growth and carcass traits in meat-type chicken. In: World Congress of Applied to Livestock Production, Montpellier, France, 2002, Anais...CD ROM, Communication 04-04, 2002.

McPHERSON, J.D. et al. Proposal to sequence the genome of the chicken, 2002. Disponível em: <[http://genomeold.wustl.edu/projects/chicken/Chicken\\_Genome.pdf](http://genomeold.wustl.edu/projects/chicken/Chicken_Genome.pdf)>. Acesso em: 15 ago. de 2005.

MINVIELLE, F. et al. Microsatellite mapping of QTL affecting growth, feed consumption, egg production, tonic immobility and body temperature of Japanese quail. **BMC Genomics**, v. 6, p. 87, jun. 2005.

NCBI Map Viewer, *Gallus gallus*. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>>. Acesso em: 10 set. de 2005.

MOURA, A.S.A.M.T. et al. Mapping qtl for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13. In: 8<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, 2006 (no prelo).

NONES, K. **Mapeamento de QTLs no cromossomo 1 de *Gallus gallus* que influenciam características de desempenho e carcaça**. Tese (Doutorado) - Esalq, Piracicaba, 2004.

NONES, K., et al. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**. Disponível em: <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.13652052.2005.01387.x?prevSearch=allfield%3A%28NONES%29>>. Acesso em: 9 mar. de 2006.

PACKER, I.U.; PAZ, C.C.P. Impactos da biotecnologia no melhoramento animal. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38, Piracicaba, 2001. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001.p. 717-727.

PRIMMER, C.R. et al. Low frequency of microsatellites in the avian genome. **Genome Research**, v. 7, p. 471-482, maio 1997.

POMP, D.; ALLAN, M.F.; WESOLOWASKI, S.R. Quantitative genomics: exploring the genetic architecture of complex trait predisposition. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. E300-E312, 2004.

QTL EXPRESS. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>. Acesso em: 12 set. de 2005. REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia Aplicada à Produção Animal**, Embrapa, Brasília, 2001.

RUY, D.C. **Mapeamento de QTL para desempenho e características de carcaça, nos cromossomos 3 e 5 de *Gallus gallus***. Tese (Doutorado) - Esalq, Piracicaba, 2004.

SASAKI, O. et al. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens. **Animal Genetics**, v. 35, p.188-194, jun. 2004.

SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, v. 8, p. 552-560, maio 1923.

SCHMID, M. et al. First report on chicken genes and chromosomes 2000. **Cytogenet. Cell Genet.**, v.90, p. 169-218, 2000.

SEATON, G. et al. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v.8, n.2, p. 339-340, 2002.

SEWALEN, A. et al. Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six and nine weeks of age in a broiler layer cross. **Poultry Science**, v. 81, p. 1775-1781, dez. 2002.

SILVA, M.V.G.B. et al. Random model approach for estimation of QTL location in half-sibs families. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.1, p.66-75, 2005.

SIWEK, M. et al. Quantitative trait loci for body weight in layers differ from quantitative trait loci specific for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, v.83, p. 853-859, jun. 2004.

SLATE, J. Quantitative trait locus mapping in natural populations: progress, caveats and future directions. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 363 – 379, 2005.

SMITH, J. et al. Integration of the genetic and physical maps of the chicken macrochromosomes. **Animal Genetics**, v. 31, p. 20-27, fev. 2000.

STRINGHINI, J.H. et al. Avaliação do desempenho e rendimento de carcaça de 4 linhagens de frangos de corte criadas em gaiolas. **R. Bras. Zootec.**, v. 32, n.1, p.183-190, 2003.

TATSUDA, K.; FUJINAKA, K. Genetic mapping of the QTL affecting body weight in chickens using a F2 family. **British Poultry Science**, v. 42, p. 333-337, jul. 2001.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). Últimos números da avicultura, 2005. Disponível em: <[www.uba.org.br](http://www.uba.org.br)>. Acesso em: 2 jan. 2006.

VAN KAAM, J.B.C.H.M. et al. Whole genome scan for quantitative trait loci affecting body weight in chickens using a three generation design. **Livestock Prod. Sci.**, v. 54, p. 133-150, 1998.

VAN KAAM, J.B.C.H.M. et al. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency. **Poultry Science**, v. 78, p. 15-23, jan.1999a.

VAN KAAM, J.B.C.H.M. et al. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting carcass traits. **Poultry Science**, v. 78, p. 1091-1099, ago. 1999b.

WALLING, G.A. et al. Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. **Animal Genetics**, v. 29, p. 415 – 424, dez. 1998.

WELLER, J.I. **Quantitative Trait Loci Analysis in Animals**. Cambridge, MA, USA, CABI Publishing, 2001.

WICKER, T. et al. The repetitive landscape of the chicken genome. **Genome Research**, v.15, p. 126-136, 2005.

ZHU, J.J. et al. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to coccidiosis and growth. **Poultry Science**, v. 82, p. 9-16, jan. 2003.



Tabela 1 – Estimativa das exportações de carne de frango de 2002 a 2005

<b>Exportações de Carne de Frango</b>				
<b>[em 1.000 toneladas (*)]</b>				
<b>País</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>(1)2004</b>	<b>(2)2005</b>
<b>Brasil</b>	1.577	1.916	2.451	2.595
Estados Unidos	2.180	2.232	2.163	2.279
União Européia	877	760	824	830
Tailândia	465	528	215	270
China	438	388	241	250
Argentina	23	39	75	90
Canadá	84	76	70	75
Emirados Árabes	37	40	40	42
Arábia Saudita	20	25	25	25
Austrália	15	15	16	15
Outros Países	31	27	21	26
<b>Total Mundial</b>	<b>5.751</b>	<b>6.051</b>	<b>6.148</b>	<b>6.507</b>

Notas: (1) Dados Preliminares (2) Previsão (\*) Carne *in natura* com osso

Fonte: USDA (Avicultura Industrial, 2005).

Tabela 2 – QTLs significativos (1 e 5%) e sugestivos mapeados e descritos na literatura para o cromossomo 11 de *Gallus gallus*, número de aves estudadas, número de marcadores e porcentagem da variância fenotípica

<b>Característica</b>	<b>Nº aves F2</b>	<b>Número de Marcadores<sup>1</sup></b>	<b>Marcadores flanqueadores</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	<b>Autores</b>
Frequência de defecação às 5 semanas de idade <sup>+</sup>	630	-	LEI0143 – ADL0123	4,3	Buitenhuis et al., 2004
Peso da gordura abdominal às 7 semanas <sup>+</sup>	456	8	ADL0287 – ADL0120	-	Jennen et al., 2004
Luminosidade encontrada na casca de ovos <sup>+</sup>	265	2	-	10,0	Sasaki et al., 2004
Teor de vermelho encontrado na casca de ovos*	265	2	-	19,0	Sasaki et al., 2004
Teor de amarelo encontrado na casca de ovos <sup>+</sup>	265	2	-	13,0	Sasaki et al., 2004
Crescimento dos 8 aos 46 dias**	851	4	ADL0210-ADL0308	2,5	Kerje et al., 2003
Peso corporal aos 46 dias**	851	4	ADL0308 – MC1R	2,8	Kerje et al., 2003

\*\*Significativo a 1% no genoma; \*Significativo a 5% no genoma; <sup>+</sup>Ligação sugestiva.

<sup>1</sup> Marcadores microssatélites utilizados para o cromossomo 11. R<sup>2</sup> Porcentagem de variância fenotípica.

Tabela 3 – QTLs significativos (1 e 5%) e sugestivos mapeados e descritos na literatura para o cromossomo 13 de *Gallus gallus*, número de aves estudadas, número de marcadores e porcentagem da variância fenotípica

<b>Característica</b>	<b>Nº aves F2</b>	<b>Número de marcadores<sup>1</sup></b>	<b>Marcadores flanqueadores</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	<b>Autores</b>
Peso às 3 semanas**	466	3	ADL0147-ADL0225	4,3	Sewalem et al., 2002
Peso as 6 semanas**	466	3	ADL0147-ADL0225	4,4	Sewalem et al., 2002
Peso às 9 semanas*	466	3	ADL0147-ADL0225	3,6	Sewalem et al., 2002
Peso da metade da carcaça frontal*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Peso antes do transporte*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Peso após transporte*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Peso da carcaça sem miúdos*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Escore de conformação*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Peso de filé*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Peso de carne branca*	201	-	-	-	McElroy et al., 2002
Peso da gordura de pele*	442	3	ADL0147-ADL0225	3,6	Ikeobi et al., 2002
Gordura da pele <sup>†</sup>	442	3	ADL0147-ADL0225	-	Ikeobi et al., 2002
Peso da gordura abdominal <sup>†</sup>	442	3	ADL0147-ADL0225	-	Ikeobi et al., 2002
Musculatura coxa e sobrecoxa (cov. osso da perna)**	442	3	ADL0147-ADL0225	5,1	Ikeobi et al., 2004
Sobrecoxa <sup>†</sup>	442	3	ADL0147-ADL0225	-	Ikeobi et al., 2004

\*\*Significativo a 1% no genoma; \*Significativo a 5% no genoma; <sup>†</sup>Ligação sugestiva.

<sup>1</sup> Número de marcadores microssatélites utilizados para o cromossomo 13. R<sup>2</sup> Porcentagem de variância fenotípica.

Tabela 3 – QTLs significativos (1 e 5%) e sugestivos mapeados e descritos na literatura para o cromossomo 13 de *Gallus gallus*, número de aves estudadas, número de marcadores e porcentagem da variância fenotípica

<b>Característica</b>	<b>Nº aves F2</b>	<b>Número de marcadores<sup>1</sup></b>	<b>Marcadores flanqueadores</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>	<b>Autores</b>
Musculatura coxa e sobrecoxa (cov. carcaça)*	442	3	ADL0147-ADL0225	4,1	Ikeobi et al., 2004
Musculatura coxa (cov. carcaça)**	442	3	ADL0147-ADL0225	5,0	Ikeobi et al., 2004
Coxa**	442	3	ADL0147-ADL0225	4,6	Ikeobi et al., 2004
Musculatura coxa (cov. sobrecoxa) <sup>+</sup>	442	3	ADL0147-ADL0225	-	Ikeobi et al., 2004
Musculatura do peito (cov. musculatura coxa e sobrecoxa)**	442	3	ADL0147-ADL0225	5,1	Ikeobi et al., 2004
Musculatura do peito (cov. carcaça) <sup>+</sup>	442	3	ADL0147-ADL0225	-	Ikeobi et al., 2004
Peso de gordura abdominal às 7 semanas <sup>+</sup>	456	9	MCW0104- MCW0322	-	Jennen et al., 2004
Peso corporal às 7 semanas <sup>+</sup>	456	9	MCW0322-MCW0110	-	Jennen et al., 2004
Peso corporal às 10 semanas*	456	9	MCW0322-MCW0110	26,6	Jennen et al., 2004

\*\*Significativo a 1% no genoma; \*Significativo a 5% no genoma; <sup>+</sup> Ligação sugestiva.

<sup>1</sup> Número de marcadores microssatélites utilizados para o cromossomo 13. R<sup>2</sup> Porcentagem de variância fenotípica.



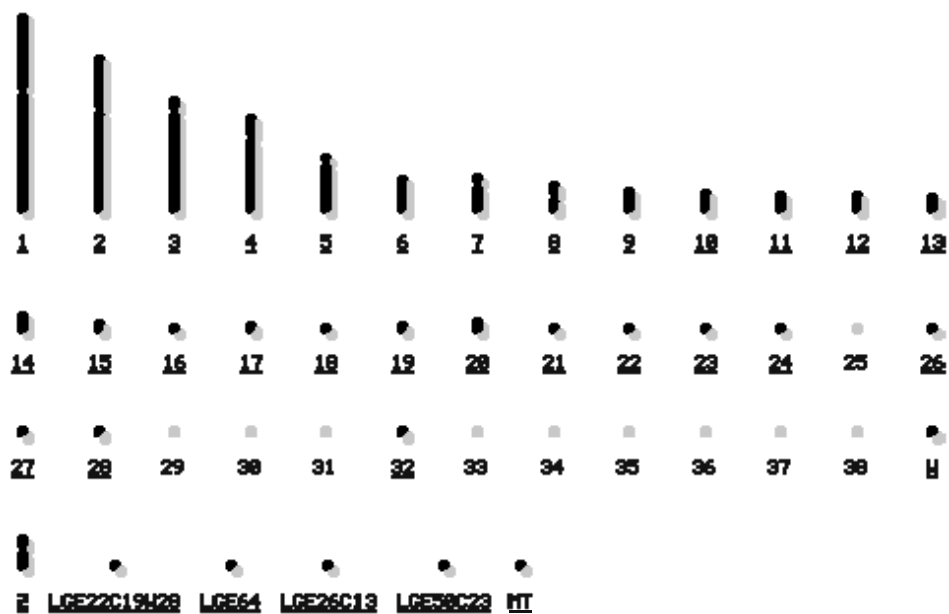


Figura 1 – Representação esquemática do cariótipo de *Gallus gallus* (os cromossomos e grupos de ligações em preto são os que possuem seqüências disponíveis) (NCBI Map Viewer, 2005)

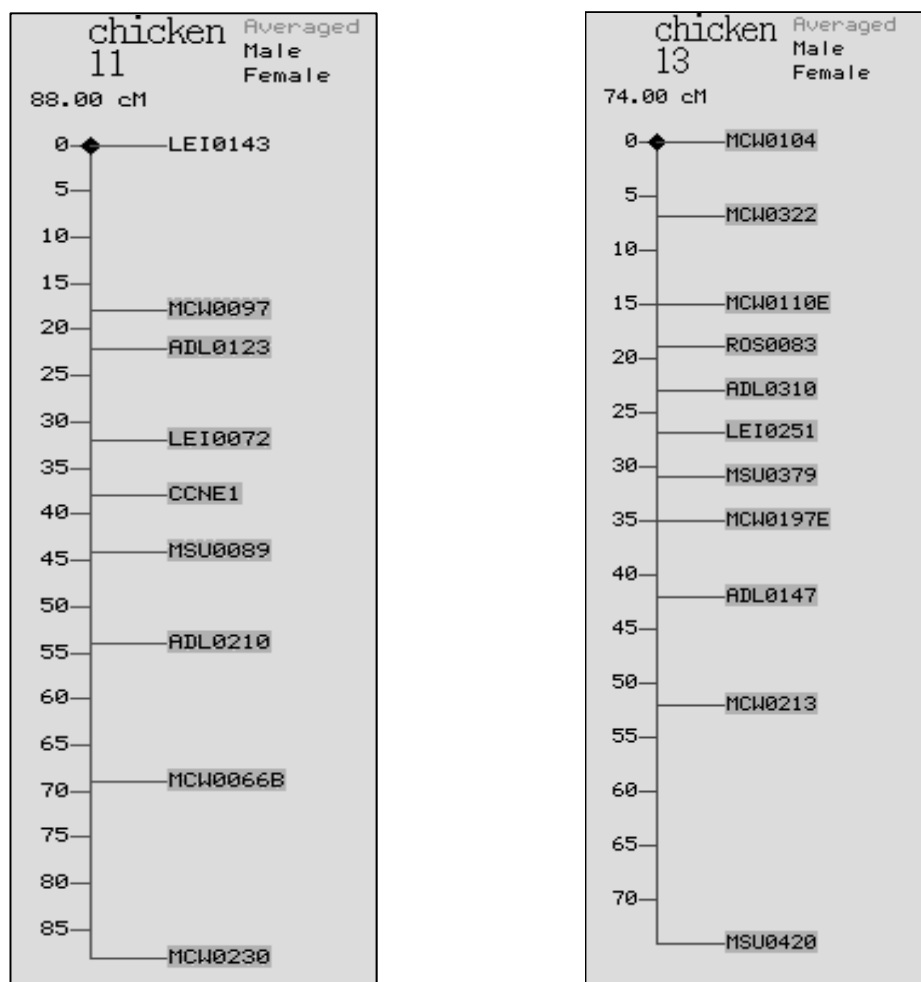


Figura 2 – Mapas Consenso dos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus* (ARKdb, 2006)

## CAPÍTULO 2



## **Mapeamento de locos de características quantitativas associados a desempenho e carcaça nos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus***

**Clarissa Boschiero<sup>I</sup>; Luiz L. Coutinho<sup>II</sup>; Mônica C. Ledur<sup>III</sup>; Ana Silvia A.M.T. Moura<sup>I</sup>**

<sup>I</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção e Exploração Animal, Unesp, Botucatu, SP, Brasil.

<sup>II</sup>Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Departamento de Zootecnia, Laboratório de Biotecnologia Animal, Piracicaba, SP, Brasil.

<sup>III</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

**Palavras-chave:** QTL, *Gallus gallus*, Mapeamento Genético, Marcadores Microssatélites.

### **Correspondência para**

Ana Silvia A.M.T. Moura

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
Departamento de Produção e Exploração Animal,  
Distr. Rubião Jr, s/n , Botucatu, Brasil

E-mail: [anamoura@fca.unesp.br](mailto:anamoura@fca.unesp.br)

## **Mapeamento de locos de características quantitativas associados a desempenho e carcaça nos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus***

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar locos controladores de características quantitativas (QTLs) nos cromossomos 11 e 13 de galinhas (*Gallus gallus*) para características de desempenho e carcaça. A partir do cruzamento entre uma linhagem de corte e uma de postura, foi gerada a população experimental F2 na Embrapa Suínos e Aves. Foram avaliadas as seguintes informações fenotípicas: peso ao nascer, peso aos 35, 41 e 42 dias, ganho de peso, consumo de ração, eficiência e conversão alimentar dos 35 aos 41 dias e valores de hematócrito. As carcaças foram evisceradas e avaliados: o comprimento do intestino, peso dos pulmões, do fígado, do coração e da moela. Foram obtidos após quatro horas de resfriamento: peso da carcaça, gordura abdominal, peso de partes: peito, coxas, dorso, asas, cabeça e pés. Quatro e cinco marcadores microsatélites dos cromossomos 11 e 13, respectivamente, foram genotipados num total aproximado de 330 animais F2 em quatro famílias de irmãos-completos. Os mapas de ligação para ambos os cromossomos foram construídos e a análise de mapeamento de QTLs baseada no modelo genético de F2 foi realizada. No cromossomo 11 foram mapeados dois QTLs sugestivos: para peso de pés e de moela, ambos posicionados no intervalo entre ADL0123 e ADL0210. No cromossomo 13 foi mapeado um QTL sugestivo para peso de coração posicionado no intervalo entre MCW0110 e MCW0104.

## **Mapping quantitative trait loci for performance and carcass traits on chromosomes 11 and 13 of *Gallus gallus***

### Abstract

The objective of this study was to identify quantitative trait loci (QTLs) for performance and carcass traits in chicken (*Gallus gallus*) chromosomes 11 and 13. From the crossbreeding of a broiler and a layer line, an F2 experimental population was generated at the *Embrapa Suínos e Aves*. The following phenotypic data were recorded: body weights at birth, 35, 41 and 42 d; weight gain, feed consumption and feed conversion from 35 to 41 d; weights of carcass, carcass parts, organs and abdominal fat, hematocrit and length of intestine. Four and five microsatellite markers from chromosomes 11 and 13, respectively, were genotyped in approximately 330 F2 chickens from four full-sib families. The linkage maps for both chromosomes were constructed and the QTL mapping analyses were carried out based on an F2 genetic model. Two suggestive QTLs were mapped to chromosome 11: for feet and gizzard weights, both located in the interval between ADL0123 and ADL0210. On chromosome 13 one suggestive QTL for heart weight was detected in the interval between MCW0110 and MCW0104.

## Introdução

A galinha (*Gallus gallus*) é o mais importante animal de produção do mundo, além disso, é muito utilizado como modelo de pesquisa para doenças humanas e estudos de comportamento animal. O total da população mundial de galinhas é cerca de 30 bilhões (Jensen, 2005).

A avicultura é uma atividade de grande importância socioeconômica em todos continentes. No Brasil, esta atividade vem se consolidando como uma das mais competitivas e tecnificadas do cenário internacional. Em 2004 o Brasil passou a ser o maior exportador mundial de frangos (União Brasileira de Avicultura, 2005). O desenvolvimento desta atividade foi possível devido a melhorias nas instalações, nutrição, manejo, sanidade e, principalmente devido aos progressos obtidos pelo melhoramento genético (Ledur et al., 2003).

Características economicamente importantes para animais de produção, como: peso vivo, produção e qualidade de carne, resistência a doenças, gordura, entre outras, são reflexos do conteúdo genético (genótipo), mais as influências ambientais, resultando no fenótipo. Um ambiente próximo do ideal deve ser proporcionado para que eles possam apresentar ótimo desenvolvimento em curto período de tempo. Pelos métodos tradicionais de melhoramento a seleção é baseada no fenótipo, que nem sempre é um reflexo do genótipo.

O desenvolvimento da biologia molecular propiciou a utilização de novas ferramentas para uma melhor compreensão da variação genética das espécies. Através das técnicas moleculares está sendo possível descobrir mecanismos de expressão gênica, localização de genes ou regiões cromossômicas responsáveis por características importantes; para que seja realizada uma seleção mais precoce e precisa, fundamentada no genótipo do animal. Essas novas tecnologias devem ser complementares às técnicas tradicionais de melhoramento genético, e os resultados poderão não ser de aplicação imediata, sendo ainda necessários mais estudos para sua validação.

Os mapas genéticos que recentemente foram publicados para galinhas (Groenen et al., 2000; Schmid et al. 2000), e os marcadores microssatélites são importantes ferramentas que facilitam a detecção e localização de locos controladores de características quantitativas (QTL). A disponibilidade de um mapa genético da galinha, rico em informações sobre marcadores, permite a análise sistemática da natureza da variação genética de características economicamente importantes (Ledur e Bertani, 2002). Uma das maiores metas da pesquisa genômica de aves tem sido o mapeamento

de QTLs. A detecção destes locos pode ser feita através da varredura de todo o genoma com a utilização de marcadores anônimos, ou através do estudo de polimorfismos de genes candidatos.

A aceleração do melhoramento genético e as melhorias das práticas de nutrição, manejo e sanidade resultaram no aumento das taxas de crescimento do frango de corte moderno, e também no aumento dos problemas de mortalidade causados por distúrbios metabólicos, como a síndrome da morte súbita, discondroplasia tibial e síndrome ascítica (Berchieri Júnior e Macari, 2000). Por este motivo, é fundamental uma melhor compreensão das características do coração, pulmão, pernas e pés de aves, e os genes ou regiões (QTL) que as controlam para o melhoramento genético mais eficiente dos frangos.

A Embrapa Suínos e Aves (Concórdia, SC) em colaboração com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/Piracicaba, SP), iniciou em 1999 o Projeto Brasileiro de Genômica de Aves, cujo objetivo inicial foi o mapeamento de QTL para características de importância econômica. Foi desenvolvida uma população experimental para estes estudos através do cruzamento de uma linhagem de corte e uma de postura. Várias outras instituições estão colaborando com este projeto: Embrapa Soja, Embrapa Gado de Leite, Embrapa Pecuária Sul, Agroceres, Instituto *Roslin*, UEL, Universidade de *Wageningen*, *US Poultry Genome Project* e recentemente a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/Botucatu, SP).

Nesta população experimental brasileira estão sendo realizados estudos de mapeamento de QTLs. Foram mapeados QTLs nos cromossomos 1 a 5, para as características de: peso vivo, consumo de ração, carcaça e peso de órgãos (Nones et al., 2006; Baron, 2004 e Ruy, 2004). Nos cromossomos 6, 7 e 8 foram mapeados QTLs sugestivos (Moura et al., 2006).

Este estudo tem o objetivo de identificar locos controladores de características quantitativas (QTL) para desempenho e carcaça nos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus*.

## **Material e Métodos**

### **População experimental**

Foi utilizada uma população experimental desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves, obtida a partir do cruzamento de machos de uma linhagem de corte (designada

TT) e fêmeas de uma linhagem de postura (CC). A linhagem TT é uma linha macho, cujo objetivo de seleção é melhorar o peso corporal, conversão alimentar, consumo de ração, rendimento de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade; e reduzir a gordura abdominal e doenças metabólicas (Figueiredo et al., 2003a). A linhagem CC foi originada da raça *White Leghorn*, para melhorar a produção de ovos, peso e qualidade do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade e redução do peso corporal (Figueiredo et al., 2003b). Estas linhagens possuem características divergentes, ou seja, quando é realizado um cruzamento entre estas linhagens, obtemos uma população ideal para estudos de mapeamento de QTLs.

Sete machos e sete fêmeas de cada linhagem foram utilizados nos cruzamentos. As aves foram mantidas em gaiolas individuais, com controle de pedigree, e os ovos foram identificados para possibilitar o anelamento ao nascer dos pintos da primeira geração (F1). Esta geração foi formada de sete famílias TC (cruzamento de machos de corte e fêmeas de postura) utilizada neste projeto.

Para a formação da segunda geração (F2) foram selecionados um macho e três fêmeas ao acaso, de cada família F1. Cada macho fertilizou três fêmeas, através de inseminação artificial, evitando-se acasalamentos próximos. A geração F2 TC totalizou 2063 aves (cerca de 100 irmãos completos F2, por fêmea), produzidos em 17 incubações, com intervalos de 15 dias durante quase oito meses. Podemos verificar a estrutura populacional das famílias TC na Tabela 4.

Essa população foi anelada com controle de pedigree individual, e avaliada para várias características de desempenho e carcaça. As aves foram criadas como frangos de corte recebendo ração à base de milho e farelo de soja, formulada para atender às necessidades nutricionais em cada fase, e água à vontade. As aves foram mantidas em boxes coletivos até os 35 dias de idade, quando foram realizadas a pesagem e alojamento em gaiolas individuais para teste de conversão alimentar dos 35 aos 41 dias.

### **Colheita dos dados fenotípicos e amostras de sangue**

As características de desempenho medidas foram: peso ao nascer (PN), peso aos 35 dias (P35), 41 dias (P41) e 42 dias (P42) de idade. O P42 foi mensurado após seis horas de jejum e transporte para o abate. Foram avaliados também: ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias e dos 35 aos 41 dias; consumo de ração, conversão

alimentar e eficiência alimentar dos 35 aos 41 dias de idade e valores de hematócrito (porcentagem de glóbulos vermelhos no volume sanguíneo total).

As carcaças foram evisceradas e medidas: comprimento do intestino (delgado e grosso), peso dos pulmões, do fígado, do coração e da moela. As seguintes características de carcaça foram obtidas após quatro horas de resfriamento: peso da carcaça (peso da carcaça sem vísceras, pés e cabeça), gordura abdominal e peso de partes: peito (com osso e pele), coxas (peso das coxas e sobrecoxas), dorso (peso da carcaça sem peito, asas e coxas), asas, cabeça e pés.

Foram utilizadas as características: porcentagem de peito (peso do peito / P42), porcentagem de carcaça (peso da carcaça / P42) e porcentagem de gordura na carcaça (peso da gordura abdominal / P42).

Todos os dados fenotípicos estão armazenados em um banco de dados do Setor de Melhoramento de Aves da Embrapa Suínos e Aves. Amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo EDTA 10% e armazenadas em *freezer* a  $-80^{\circ}$  C. Foram colhidos dos animais da geração parental 5 mL de sangue da veia braquial divididos em três colheitas durante três semanas (aproximadamente 1,6 mL/semana). Dos animais F1 e F2 o sangue foi colhido no abate após as aves serem decapitadas. O término dos abates ocorreu em agosto de 2000 e a organização e separação de alíquotas do sangue foram feitas até março de 2001. Parte das alíquotas foi levada para a Esalq, e o restante foi mantido como um banco de sangue na Embrapa para futuras pesquisas.

### **Extração e quantificação de DNA**

No Laboratório de Biotecnologia Animal (Esalq) foram realizadas as extrações de DNA de diversas amostras do sangue das aves para os projetos de mapeamento de QTL. Os eritrócitos de aves são nucleados, sendo assim, maior quantidade de DNA é obtida na extração a partir de sangue, quando comparada a mamíferos.

Dos animais F2, não foi necessário extrair DNA, uma vez que para outros projetos (cromossomos 1 a 5), foram extraídas quantidades suficientes de DNA. Um total de 16 animais parentais e F1 tiveram seus DNAs extraídos.

Primeiramente foi utilizado o protocolo de extração com o detergente de guanidina (DNAzol ®<sup>1</sup>) (Anexo I). Mas, para algumas amostras, foi necessário utilizar o

---

<sup>1</sup> Invitrogen Life Technologies.

protocolo com Proteinase K (Anexo II), já que delas resultou quantidade insuficiente de DNA quando realizada a extração com o detergente de guanidina. O DNA foi quantificado no espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-20000). Depois da quantificação, foi feito o cálculo de diluição para que todas ficassem com a mesma concentração padronizada de 20 ng de DNA/ $\mu$ l.

### **Amplificação dos marcadores microssatélites**

O Laboratório dispunha de alguns pares de *primers* doados pela *Michigan State University* através do projeto "*Chicken Genome Project*". Alguns destes foram inicialmente testados, mas posteriormente outros foram adquiridos. Para o cromossomo 11 foram selecionados inicialmente: LEI0143, ADL0123, ADL0210 e MCW0230. Para o cromossomo 13 foram inicialmente testados seis marcadores: ADL0147, LEI0251, MCW0213, MCW0244, MCW0322 e MCW0104 (Tabela 5).

Para as amplificações dos marcadores microssatélites foram utilizadas reações de PCR contendo 20 ng/ $\mu$ l de DNA genômico, as quais tiveram volume final de 25  $\mu$ l e incluíram solução tampão, MgCl<sub>2</sub> (cloreto de magnésio), dNTPs, iniciadores (*primers*) direto e reverso e 0,5 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Anexo III). Primeiramente, foi feito um gradiente de temperatura para cada marcador microssatélite: depois de verificada a temperatura de anelamento recomendada deste marcador<sup>2</sup> foi escolhida uma variação de seis graus a mais e seis a menos. O programa utilizado no termociclador está no Anexo IV.

Depois da reação de PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2%, acompanhadas do marcador de peso molecular  $\phi$ X174 RF DNA/ Hae III na primeira canaleta para visualização do tamanho aproximado dos fragmentos. Nem sempre a temperatura de anelamento indicada<sup>2</sup> foi a ideal, pois houve muita variação. Além da temperatura, também foi verificada a concentração de cloreto de magnésio. No caso da existência de muitas bandas inespecíficas, primeiro foi alterada a temperatura e depois a concentração do cloreto de magnésio.

---

<sup>2</sup> Obtida nos catálogos do marcador ou em ARKdb, 2005.



## Genotipagem

As quatro famílias de irmãos completos TC (F2) com o maior número de marcadores informativos na genotipagem seletiva dos cromossomos 1 a 5 (Baron et al. 2003; Nones et al. 2003 e Ruy et al. 2003) foram selecionadas para a genotipagem neste estudo. A genotipagem foi desenvolvida em duas etapas. Inicialmente foram genotipados 8 animais parentais (TT e CC) e oito da geração F1 para cada marcador. Depois de verificado se os marcadores eram informativos ou não, foi feita uma segunda genotipagem, com de cerca de 90 animais da geração F2 de cada uma destas mesmas quatro famílias.

Um genotipador MegaBACE<sup>3</sup> foi utilizado na análise dos fragmentos e identificação dos alelos. Apesar da amplificação de cada marcador ter sido individual, as genotipagens foram feitas a partir da mistura do produto amplificado de três a quatro marcadores, de acordo com o tamanho e a fluorescência do *primer*, juntamente com o padrão interno (ET-ROX 400)<sup>3</sup>. O programa para representação gráfica dos picos de fluorescência e determinação do tamanho dos fragmentos foi o *Genetic Profiler*<sup>3</sup>. Todos os picos e tamanhos foram conferidos manualmente.

## Mapas de ligação

Os mapas de ligação dos cromossomos 11 e 13 foram construídos pelo método da máxima verossimilhança com o auxílio do programa *CRIMAP* (Green et al., 1990), que utiliza a função de Kosambi para transformar a fração de recombinação em distância de mapa em cM. Para isto, as informações de parentesco e genótipo dos marcadores foram digitadas em arquivo de editor de texto.

Os seguintes procedimentos do programa foram empregados: a) *twopoint*, o qual estima as frações de recombinação entre os marcadores, dois a dois; b) *build*, que constrói o mapa de ligação, iniciando com os dois marcadores mais informativos e inserindo os demais nas suas respectivas posições; c) *flips*, que confere o valor de LOD,

---

<sup>3</sup> GE Healthcare.

alterando a posição de pares de marcadores enquanto os outros permanecem fixos, e gera valores de verossimilhança correspondentes; d) *chrompic*, que mostra a fase de ligação dos marcadores alinhados no cromossomo para cada indivíduo. Esta última opção permitiu identificar os indivíduos com duplas e triplas recombinações, os quais tiveram seus dados genotípicos conferidos, evidenciando possíveis erros. O programa utiliza como *default* o LOD três, que implica que a hipótese dos marcadores estarem ligados é 1000 vezes mais provável que a de não estarem. Após a obtenção dos mapas, eles foram desenhados com o auxílio do programa *Mapchart* (Voorrips, 2002), para uma melhor visualização dos marcadores e suas respectivas distâncias.

### **Análise de Mapeamento de QTLs**

O método de mapeamento de QTL por intervalos, proposto por Haley et al. (1994), que emprega regressão linear e estimação de quadrados-mínimos, foi implementado utilizando-se o programa *QTL Express* (Seaton et al., 2002, *QTL Express*, 2005). Uma das opções do programa é o delineamento genético F<sub>2</sub>, desenvolvido para pedigree de três gerações e análise de QTL a partir do cruzamento de linhagens não-endogâmicas. Três arquivos de dados foram necessários para possibilitar a análise: um de genótipos dos marcadores, outro do mapa de ligação e o terceiro de fenótipos.

Os dados fenotípicos foram previamente submetidos a uma análise estatística exploratória. O modelo incluiu os efeitos fixos de incubação, sexo, mãe, interações e as covariáveis (PN, P35 e P42). A covariável PN para as características: P35, P41, P42, ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias. A covariável P35 dias para as características: ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração e eficiência alimentar, todas dos 35 aos 41 dias. A covariável P42 dias para as características restantes (carcaça, partes, órgãos e valores de hematócrito). Para as características: peso ao nascer, porcentagens de gordura, peito e carcaça não foram empregadas covariáveis.

Em seguida, todas as características foram pré-ajustadas para o efeito de incubação. Ajustes para os efeitos das interações duplas entre incubação, sexo e mãe foram efetuados somente quando significativos. Os resíduos desta análise foram empregados na análise de mapeamento de QTL. Os efeitos de sexo e mãe e covariável, quando significativos, foram incluídos posteriormente, no modelo de análise de mapeamento de QTL para cada característica.

Na primeira etapa da análise de QTL, a probabilidade de um indivíduo F2 possuir cada um dos possíveis genótipos do QTL foi calculada condicionalmente a cada cM, na dependência do genótipo dos marcadores. A seguir, um modelo linear para os efeitos aditivos e de dominância de um QTL numa dada posição foi ajustado por quadrados-mínimos, para cada característica.

O efeito aditivo é definido como sendo metade da diferença do valor fenotípico entre os indivíduos F2 homocigotos para os alelos originários da linhagem TT e CC, enquanto o efeito de dominância corresponde à diferença entre o valor fenotípico dos heterocigotos e a média dos dois homocigotos (De Koning et al., 1999). Segundo Haley et al. (1994) o coeficiente aditivo de um QTL para um indivíduo é a diferença entre a probabilidade condicional de dois QTLs homocigotos, e o coeficiente de dominância é igual a probabilidade condicional do indivíduo possuir um QTL heterocigoto.

O modelo genético F2 (*line cross*) pressupõe que o QTL tenha alelos alternativos fixos nas linhagens fundadoras de corte e de postura, apesar delas poderem compartilhar alelos dos marcadores. Caso o teste estatístico F na análise inicial excedesse o valor limiar (*threshold*), as interações do QTL com os efeitos fixos de sexo e família foram testadas.

Os níveis de significância cromossômico (5%) e genômico foram empregados, controlando-se, no último caso, a taxa de Erro Tipo I (falso positivo), pois para detectar QTLs um grande número de testes é necessário. Como estes testes não são independentes, obtêm-se um nível de significância que pode gerar falsos QTLs. Para reduzir este problema o nível de significância no cromossomo foi calculado para obter o nível de significância genômico desejado, proporcional à contribuição do cromossomo para o comprimento total do genoma autossômico, como sugerido por De Koning et al. (1999) e Tuiskula-Haavisto et al. (2002). Esta probabilidade foi calculada pela seguinte equação seguindo a correção de Bonferroni:

$$P_{(genômico)} = 1 - (1 - P_{(cromossomo)})^{1/r}$$

Onde  $r$  é a contribuição de um cromossomo, obtida dividindo-se o comprimento do cromossomo (ou segmento) estudado pelo comprimento do genoma autossômico. A partir de 10.000 permutações realizadas na análise de QTL, foram obtidos empiricamente, segundo Churchill e Doerge (1994), os valores de F que correspondiam

aos níveis de significância sugestivos e 5% de detectar QTL em algum lugar em todo o genoma, para cada característica.

## **Resultados**

### **Amplificações por PCR**

No cromossomo 11, os quatro marcadores microssatélites testados produziram boa amplificação, mas foram necessários ajustes na temperatura de anelamento e na concentração de cloreto de magnésio. No cromossomo 13, dos marcadores testados inicialmente (ADL0147, LEI0251, MCW0213, MCW0244, MCW0322 e MCW0104) apenas três amplificaram – ADL0147, LEI0251 e MCW0104. Os iniciadores que não produziram produto de PCR foram descartados. Além disso, foram adquiridos os marcadores: MCW0110 e MCW0213, para uma melhor cobertura no mapa.

Para os iniciadores que amplificaram também foram realizados testes de gradiente de temperatura, e quando apresentaram bandas inespecíficas na visualização do gel de agarose, foram feitos ajustes nas concentrações de cloreto de magnésio. Para o marcador MCW0104 foram realizados vários testes para se chegar à condição ideal. Outros tiveram sua concentração inicial de cloreto de magnésio alterada, como exemplo os marcadores LEI0143 e o MCW0230; já para os marcadores do cromossomo 13, a concentração de cloreto de magnésio não precisou ser alterada. A temperatura de anelamento para os marcadores variou de 55 a 68° C. Na Tabela 6 estão as condições de otimização de PCR para os marcadores dos cromossomos 11 e 13.

Exemplos de géis de agarose mostrando os resultados das amplificações de alguns marcadores estão no Anexo V.

### **Seleção dos marcadores informativos e genotipagens**

Neste estudo foram genotipadas quatro famílias de irmãos-completos, uma vez que nos outros trabalhos realizados com esta mesma população experimental (com os cromossomos 1 a 5), elas se mostraram sempre informativas para os marcadores analisados. As genotipagens foram feitas em duas etapas.

Na primeira etapa, os animais parentais e F1 foram genotipados com os marcadores otimizados dos cromossomos 11 e 13. Foram genotipados 16 animais para cada marcador, ou seja, os parentais TT e CC e os indivíduos da geração F1. Na Tabela

7 encontramos o resultado das genotipagens dos animais das gerações parental e F1 para todos marcadores. Os nove marcadores foram pelo menos parcialmente informativos nas quatro famílias, por isso foi realizada a segunda etapa da genotipagem de cerca de 90 animais F2 de cada família para todos os marcadores.

No Anexo VI podemos verificar as genotipagens de animais parentais com o marcador LEI0143 (cromossomo 11) e, de um casal F1 para o LEI0251.

Todos os genótipos foram conferidos e incluídos numa planilha única para cada cromossomo para construção do mapa de ligação. Os genótipos que geraram dúvidas foram corrigidos. Após a conferência e correção dos genótipos foi construído o mapa de ligação para cada cromossomo.

### **Mapas de ligação**

Os mapas de ligação dos cromossomos 11 e 13 foram construídos com o auxílio do programa *Crimap* (Green et al., 1990). As representações gráficas (Figuras 3 e 4) foram obtidas com o *software MapChart* – versão 2,1 (Voorrips, 2002). As Figuras 3 e 4 mostram os mapas designados como *Embrapa* (obtidos neste estudo), e à direita o mapa Consenso para fins de comparação. As médias das distâncias entre os marcadores dos mapas *Embrapa* foram de 35,17 cM no cromossomo 11, e de 14,25 cM no cromossomo 13. Os números de meioses informativas totais, e de fase conhecida para cada marcador estão na Tabela 8.

O mapa do cromossomo 11 foi semelhante ao mapa Consenso, a ordem dos quatro marcadores foi a mesma, e a extensão do mapa obtido neste trabalho foi de 105,5 cM. A extensão do mapa de ligação do cromossomo 13 foi de 57 cM, mas com a ressalva de que é parcial, pois inicia-se a 22 cM do mapa Consenso e contém cinco marcadores, enquanto que o Consenso, onze. A ordem dos marcadores foi a mesma do mapa Consenso, com a exceção de dois marcadores: ADL0147 e MCW0213, que tiveram sua posição invertida quando comparada ao mapa Consenso.

### **Análise estatística exploratória e ajuste dos dados fenotípicos**

As estatísticas descritivas das 28 características de desempenho e carcaça avaliadas nas quatro famílias de meio-irmãos incluídas neste estudo são apresentadas

na Tabela 9. Os resultados das análises estatísticas exploratórias, resumidos na Tabela 10, foram utilizados tanto no ajuste dos dados fenotípicos para gerar os resíduos a serem empregados na análise de mapeamento de QTL, como na definição do próprio modelo de análise de mapeamento de QTL de cada uma das características. Assim, optou-se por pré-ajustar todas as características para o efeito fixo de incubação e para as interações duplas entre os efeitos de incubação, sexo e família, quando significativas. Já os efeitos fixos de sexo, família e da respectiva covariável foram incluídos posteriormente, no modelo de análise de mapeamento de QTL, também somente quando significativos.

### **Análise de Mapeamento de QTLs**

As análises de mapeamento de QTL para os cromossomos 11 e 13 foram realizadas com o modelo F2 para as características descritas nas Tabelas 9 e 10. Devido à inversão dos marcadores no mapa de ligação do cromossomo 13, optou-se por realizar duas análises de mapeamento de QTL para este cromossomo, utilizando o mapa Embrapa e o Consenso.

Foram mapeados QTLs sugestivos inéditos na literatura nos cromossomos 11 e 13, porém não foram mapeados QTLs com 5% ou 1% de significância no genoma. Nas Tabelas 11, 12 e 13 encontram-se os valores de F da análise de mapeamento de QTL e valores críticos de F para ligação sugestiva e 5% no genoma, levando-se em conta a contribuição relativa do cromossomo. Na Tabela 11 estão os valores obtidos para o cromossomo 11; na Tabela 12 para o cromossomo 13, quando utilizamos o mapa de ligação *Embrapa*, e na Tabela 13 para o cromossomo 13 com a utilização do mapa Consenso. Os valores de F foram semelhantes para as duas análises.

### **Cromossomo 11**

Dois QTLs sugestivos inéditos foram mapeados para peso de moela e pés na mesma região (Figura 5). Um QTL significativo a 5% no cromossomo foi mapeado para rendimento de carcaça. Todos estes QTLs foram mapeados no intervalo entre ADL0123 e ADL0210.

Os QTLs sugestivos mapeados para peso de moela e peso de pés explicam 2,98% e 2,87% da variância fenotípica, respectivamente, e seus efeitos aditivos e de

dominância, com os respectivos erros-padrão encontram-se na Tabela 14. Para a característica de rendimento de carcaça foi mapeado um QTL significativo a 5% no cromossomo que explica 1,59% de variância fenotípica desta característica (Tabela 14).

### **Cromossomo 13**

Foi encontrado um QTL sugestivo para peso de coração localizado no intervalo entre MCW0110 e MCW0104, utilizando o mapa *Embrapa* (Figura 6) e também o mapa Consenso (Figura 7). Foram mapeados apenas para a análise do mapa Consenso, QTLs com 5% de significância de efeito no cromossomo para as características: P41, P42 e ganho de peso aos 41 e 42 dias entre os marcadores ADL0147 e MCW0213 (Figura 7). Para a análise utilizando o mapa *Embrapa* os valores foram muito semelhantes, porém não chegaram a ter efeito significativo a 5% no cromossomo (Figura 6).

O QTL sugestivo para peso do coração explica 4,34% (mapa *Embrapa*) e 4,37% (mapa Consenso) da variância fenotípica. Os efeitos aditivos e de dominância (Tabela 14) apresentam valores muito semelhantes para as duas análises. Para a característica peso do coração, praticamente não há efeito de dominância, e o efeito aditivo foi positivo. Para as demais características o efeito aditivo e de dominância foram negativos.

## **Discussão**

### **Mapas de ligação**

O mapa *Embrapa* do cromossomo 11 foi semelhante ao mapa Consenso, a ordem dos marcadores foi a mesma (o primeiro nos dois mapas foi o LEI0143), mas a extensão foi de 105,5 cM, enquanto que o mapa Consenso tem 88 cM. A diferença de extensão pode ser explicada pelas seguintes razões: as populações experimentais são diferentes e utilizou-se apenas quatro marcadores microssatélites, enquanto que o mapa Consenso contém oito marcadores; portanto as taxas de recombinação foram diferentes entres os mapas *Embrapa* e Consenso.

O mapa de ligação do cromossomo 13 foi de 57 cM (parcial), enquanto que o Consenso, 74 cM. A ordem dos marcadores foi a mesma, com exceção dos marcadores ADL0147 e MCW0213, os quais tiveram sua posição invertida, o primeiro marcador do mapa *Embrapa* é o ADL0147 a 0 cM que corresponde a 32 cM no mapa Consenso

(Figura 4). As mesmas razões para as diferenças de extensão entre os mapas se aplicam neste caso.

Em outros estudos as extensões dos mapas de ligação também divergem do mapa Consenso, uma vez que são mapas parciais, como no trabalho de Jennen et al. (2004) onde o mapa do cromossomo 13 foi de 54,8 cM, sendo que o primeiro marcador utilizado foi MCW0104 e o último MCW0213. Para o cromossomo 11 o mapa neste mesmo trabalho foi de 99,7 cM, sendo o primeiro marcador o LEI0143, e o último MCW0230. Nos dois casos os primeiros e últimos marcadores foram os mesmos utilizados neste estudo, e o tamanho dos mapas obtidos, semelhantes aos obtidos neste trabalho.

Sobre a inversão dos marcadores, não podemos afirmar com certeza a razão, mas podemos formular algumas hipóteses. O primeiro questionamento é se esta inversão existe ou não na nossa população experimental, por se tratar de uma população diferente das utilizadas no mapa Consenso. Esta inversão é possível, porém pouco provável, pois o Consenso é aceito como referência por toda a comunidade científica.

O marcador ADL0147 envolvido na inversão apresentou baixo número de meioses informativas, principalmente de fase conhecida, comparado aos outros marcadores (Tabela 8); é um marcador pouco informativo nesta população, dificultando seu posicionamento no mapa de ligação. Em contrapartida, o outro marcador que teve sua posição invertida (MCW0213) foi muito informativo, com alto número de meioses informativas. Adicionalmente, o intervalo entre estes dois marcadores foi pequeno, dificultando seu posicionamento relativo pela proximidade de apenas 10,5 cM.

Uma tentativa de esclarecer esta dúvida foi comparar (“blastar”) as seqüências dos iniciadores destes dois marcadores com a seqüência do genoma da galinha (NCBI Map Viewer, 2005) para comparar com a posição relativa das seqüências do cromossomo 13. Para o marcador MCW0213, os iniciadores direto e reverso se localizam próximos a 982200 pares de base (pb). Para o marcador ADL0147 os iniciadores direto e reverso localizam-se a aproximadamente 1077500 pb, e assim podemos concluir que o marcador MCW0213 está localizado antes do marcador ADL0147 na seqüência genômica do cromossomo 13, em concordância com o mapa Consenso. Porém devemos lembrar que estas seqüências são baseadas no seqüenciamento do genoma de uma única fêmea ancestral das galinhas, não necessariamente representando o genoma das atuais linhagens comerciais.



## **Análise de Mapeamento de QTLs**

### **Cromossomo 11**

Foram mapeados dois QTLs sugestivos inéditos para peso de moela e pés, além de um QTL significativo a 5% no cromossomo para rendimento de carcaça; todos no mesmo intervalo de marcadores (ADL0123 e ADL0210).

O QTL sugestivo para peso de moela apresenta efeito aditivo positivo (Tabela 14). O efeito aditivo positivo é uma indicação de que o alelo responsável pelo maior peso da moela é proveniente da linhagem de corte (TT). A moela é um tipo de “estômago muscular” das aves, responsável pela mistura e maceração do alimento, favorecendo a ação da pepsina e do ácido clorídrico, que estão relacionados com o início da digestão protéica e a dissolução dos minerais. A motilidade deste órgão depende da natureza do alimento (Pinheiro, 1994).

O tamanho maior da moela (e conseqüentemente maior peso) está relacionado entre outros fatores, como o tipo de ração consumida. López e Baião (2004) afirmam que aves alimentadas com rações fareladas apresentam maior peso da moela do que aves que receberam rações processadas e, este fato é atribuído a maior taxa de passagem das rações granuladas, o que provocaria menor volume de alimento na moela e menor atividade dos músculos. Este QTL pode ser importante, uma vez que a moela está diretamente relacionada com a digestão e conseqüentemente com a absorção de nutrientes.

O QTL sugestivo mapeado para peso de pés também apresentou efeito aditivo positivo (Tabela 14), sendo a linhagem de corte a responsável pelo alelo que confere maior peso dos pés. É de extrema importância preservar a integridade das pernas e pés dos animais, uma vez que estes são responsáveis pela sustentação. Esta característica possui uma evidente importância para a indústria avícola, pois a incidência da discondroplasia tibial aumentou consideravelmente na moderna criação de frangos, oriundos de linhagens geneticamente melhoradas para uma maior massa muscular (Berchieri Júnior e Macari, 2000). A discondroplasia tibial causa lesão na articulação da perna, devido a uma falha na calcificação do osso. Além da mortalidade, em torno de 20% do plantel de elite, a ave sente dificuldade de locomoção, fato que a impede de se alimentar normalmente (Unesp, 2002). Por isso, com o aumento de peso dos animais

selecionados para corte, e com a não seleção genética para pés e pernas mais desenvolvidos, estes ficam comprometidos, causando problemas para o animal. Além disso, apesar dos pés terem pouco valor comercial para a maioria dos produtores, para outros é um importante produto de exportação para países do oriente, principalmente para a China (Macedo, 2005).

Para a característica de rendimento de carcaça foi mapeado um QTL significativo a 5% no cromossomo, embora seu efeito seja pequeno, pode ser importante para a indústria avícola (Tabela 14).

Na literatura existem poucos QTLs mapeados no cromossomo 11 (Tabela 2), a maioria é sugestivo e difere na localização dos mapeados neste estudo. Um QTL sugestivo para características de comportamento foi mapeado entre os marcadores LEI0143 e ADL0123, utilizando análise de meio-irmãos (Buitenhuis et al., 2004). No trabalho em que Kerje et al. (2003) realizaram cruzamentos entre uma linhagem comercial (*White Leghorn*) e a ancestral das galinhas (*Red Junglefowl*), foram mapeados QTLs entre os marcadores ADL0210 e ADL0308 para peso corporal aos 8 e 46 dias de idade, e entre ADL0308 e MC1R para crescimento dos 8 aos 46 dias. Em outro estudo, Jennen et al. (2004) mapearam um QTL sugestivo para peso de gordura abdominal entre ADL0287 e ADL0210, utilizando oito marcadores neste cromossomo. Sasaki et al. (2004) mapearam três QTLs para características relacionadas à produção de ovos entre os marcadores LEI0072 e LEI0214, mas este cromossomo teve uma cobertura de apenas 20 cM, com apenas 2 marcadores. Entretanto, os marcadores encontram-se na mesma região onde foram mapeados os QTLs neste presente estudo. Foi mapeado um QTL sugestivo para peso de moela no cromossomo 8, e um para pés de pés no cromossomo 6 (Moura et al., 2006).

O que pode explicar as divergências dos resultados encontrados na literatura é que neste trabalho foram mapeados QTLs para características nunca publicadas, como peso de moela e de pés, o que torna impossível comparações destes resultados com outros no mesmo cromossomo. Porém não foram encontrados QTLs para peso, como o encontrado por Kerje et al. (2003), ou para gordura, como o mapeado por Jennen et al. (2004). Uma possível explicação seria o número insuficiente de animais na amostra que foi utilizada (327 animais F2), enquanto que nos dois trabalhos citados foram utilizadas populações com mais de 450 animais da geração F2. O QTL mapeado por Jennen et al. (2004) para peso de gordura abdominal está localizado na mesma região dos QTLs mapeados para peso de moela, pés e rendimento de carcaça, pois o marcador ADL0287 está próximo do ADL0123. Outra possibilidade, é que nas quatro famílias, ou na

população experimental utilizadas neste projeto, os alelos do QTL podem não estar segregando para as características mapeadas em outros trabalhos da literatura.

Os três QTLs neste trabalho foram mapeados na mesma região, sugerindo a existência de um gene ou grupo de genes que estejam influenciando um maior desenvolvimento do animal em alguns aspectos. Entre os marcadores ADL0123 e ADL0210 foi mapeado o gene CCNE1 (Figura 2), conhecido como gene da ciclina E1 (Expert Protein Analysis System, 2005); as ciclinas são proteínas que atuam no ciclo celular. Existem vários subtipos, como a E1 que é sintetizada durante o período que antecede a mitose celular (Lewin, 2000). Existem outros genes mapeados no cromossomo 11 da galinha, num total de 33 genes já identificados (Anexo VII).

### **Cromossomo 13**

Foi mapeado um QTL sugestivo inédito para peso do coração nas duas análises (mapas *Embrapa* e Consenso), mas quando se utilizou o mapa Consenso foram encontrados QTLs significativos a 5% no cromossomo para P41, P42, ganho de peso aos 41 e 42 dias; para o mapa *Embrapa* os valores de F para estas características chegaram bem próximos a 5% de significância no cromossomo. Da mesma forma, os efeitos aditivos e de dominância (Tabela 14) apresentaram valores muito semelhantes para as duas análises, os efeitos aditivos foram positivos, ou seja, o maior peso do coração provém da linhagem de corte, e não há efeito de dominância (é praticamente zero).

O peso do coração é uma importante característica a ser analisada em frangos de corte, pois a seleção intensa ocasionou alterações em alguns órgãos das aves, tornando o coração um fator limitante ao desenvolvimento (Gaya et al., 2004). Segundo Berchieri Júnior e Macari (2000), a seleção direcionada para ganho de peso e melhor conversão alimentar causou um desbalanceamento entre produção e suprimento de energia para manutenção, o que levou ao surgimento de doenças em órgãos que são responsáveis pelo fornecimento de energia para a ave, como o coração.

O tamanho e peso do coração de galinhas são afetados por alguns fatores ambientais e alterações metabólicas, como exemplos encontrados na literatura: temperatura, linhagens, sexo e síndrome ascítica e da morte súbita. A síndrome ascítica tem como principal fator causador, o limite fisiológico do sistema cárdio-respiratório, provocando, entre outros fatores: maior ritmo cardíaco, hipertrofia da artéria pulmonar, insuficiência cardíaca direita e espessamento da musculatura ventricular direita. O índice

cardíaco, conhecido como IC ( $IC = \text{peso do ventrículo direito} / \text{peso total dos ventrículos}$ ) acima de 0,25 é um indicativo de morte da ave por ascite, pois um sintoma desta síndrome é o aumento do ventrículo direito das aves (Gonzales e Macari, 2000). As linhagens de corte e postura utilizadas neste projeto não apresentaram sintomas de síndrome ascítica ou da morte súbita.

A síndrome da morte súbita é um distúrbio metabólico que parece estar correlacionado a uma suscetibilidade intrínseca dos frangos à hipoxemia, possivelmente influenciada pelo menor crescimento relativo dos sistemas respiratório e cardíaco. Em muitas aves é possível identificar uma pequena dilatação do ventrículo direito (Gonzales e Macari, 2000).

No estudo de Furlan et al. (2001), o peso relativo do coração dos frangos de corte (machos) criados em temperatura abaixo da termoneutralidade foi significativamente maior quando comparado ao das aves mantidas em temperaturas termoneutra e quente aos 14, 28 e 42 dias de idade. O aumento dessas vísceras nas aves mantidas em ambiente frio estaria relacionado à maior atividade cardíaca para atender à demanda de oxigênio e aumento na taxa metabólica para manutenção da homeostase térmica e crescimento das aves.

Estudos demonstram que as linhagens de corte apresentam piores parâmetros cardíaco-pulmonares (peso relativo e volume do coração, incidência de ascite, volume da cavidade torácica, etc) do que as linhagens de postura e raças nativas (Hassanzadeh et al., 2005). Em outro estudo, as linhagens de corte tiveram um coração relativamente menor, tanto estruturalmente como funcionalmente, do que as linhagens *White Leghorn*. Além disso, os parâmetros como: diâmetros de ventrículos e espessura da parede dos ventrículos, às sete semanas de idade são também menores nas linhagens de corte (Martinez-Lemus et al., 1998).

O sexo das aves também pode ser um fator que ocasiona diferença no tamanho do coração. Thaxton (2002) afirma que machos de linhagens de corte possuem maiores pesos e comprimentos do coração, além da parede ventricular direita mais espessa do que as fêmeas.

Gaya et al. (2004) avaliaram uma linhagem macho de frangos de corte e mostraram a existência de alta herdabilidade para peso do coração (0,38) e correlação genética de 0,60 e 0,28 entre peso do coração e peso vivo aos 38 e 42 dias, respectivamente. Os autores afirmam que esta característica deveria ser utilizada como critério de seleção nos programas de melhoramento de aves.

Na literatura não há registros de QTLs para peso de coração no cromossomo 13

de aves. No cromossomo 1 foram mapeados dois QTLs para peso de coração (modelo F2 e de meio-irmãos) – sugestivo e significativo a 1% no genoma (Nones, 2004); no cromossomo 5, um QTL sugestivo para a mesma característica (Ruy, 2004). É importante salientar que neste estudo o QTL para peso do coração explicou 4,4% da variância fenotípica, o que pode indicar um importante efeito, embora tenha sido apenas sugestivo. Na região onde este QTL foi localizado, Jennen et al. (2004) mapearam QTL sugestivo para peso da gordura abdominal (entre os marcadores MCW0104 e MCW0322), QTL sugestivo para peso vivo às 7 semanas e significativo para peso vivo às 10 semanas entre MCW0322 e MCW0110. O marcador MCW0322 está posicionado entre os marcadores MCW0104 e MCW0110 (Tabela 3).

Nos estudos de Ikeobi et al. (2002 e 2004) e Sewalem et al. (2002) foram mapeados diversos QTLs em posições distintas no intervalo entre ADL0147 e ADL0225. Utilizaram apenas três marcadores para cobrir todo o cromossomo 13, o que torna muito extenso o intervalo onde foram mapeados os QTLs.

Um dos possíveis motivos de ter sido mapeado apenas um QTL sugestivo pode ser o número de F2 genotipados (328) quando comparado a outros estudos neste cromossomo (Ikeobi et al., 2002 e 2004, Jennen et al., 2004 e Sewalem et al., 2002) que utilizaram mais de 440 animais da geração F2 (Tabela 3).

Existem vários genes mapeados no cromossomo 13 (Anexo VII), seria interessante uma busca detalhada destes que se encontram na região do QTL sugestivo mapeado para verificar possíveis relações entre esta característica com os genes identificados até o momento.

Uma possibilidade futura é aumentar o número de indivíduos F2 genotipados para os dois cromossomos, a fim de aproximarmos este número de animais à maioria dos trabalhos encontrados na literatura. De qualquer forma o QTL para peso de coração inédito mapeado na população Embrapa tem um importante efeito, mesmo sendo sugestivo. É de interesse para a avicultura esta característica, tendo em vista os problemas metabólicos frequentes nas criações de frangos.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/UNESP), Embrapa Suínos e Aves e Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq/USP).

Este projeto teve o suporte financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), que também concedeu bolsa de mestrado.

## Referências Bibliográficas

ARKDB, Chicken, <http://www.thearkdb.org>.

BARON, EE (2004) Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*). Tese Doutorado, Esalq, Piracicaba, Brasil.

BARON EE, RUY DC, NONES K, LEDUR MC, CAMPOS RLR, AMBO M, COUTINHO LL (2003) Mapeamento de QTL para peso corporal em aves (*Gallus gallus*) no cromossomo 4. Sociedade Brasileira de Genética, CD-ROM. 49 Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, Brasil.

BERCHIERI JÚNIOR AJ, MACARI M (2000) Doenças das aves. Facta, Campinas, 490 pp.

BUITENHUIS AJ, RODENBURG TB, SIWEK M, CORNELISSEN SJB, NIEUWLAND MGB, CROOIJMANS RPMA, GROENEN MAM, KOENE P, BOVENHUIS H, VAN DER POEL JJ (2004) Identification of QTLs involved in open-field behavior in young and adult laying hens. Behavior Genetics 34:325-333.

CHURCHILL GA, DOERGE RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138: 963-971.

DE KONING DJ, JANSS LLG, RATTINK AP, VAN OERS PAM, DE VRIES BJ, GROENEN MAM, VAN DER POEL JJ, DE GROOT PN, BRASCAMP EW, VAN ARENDONK JAM (1999) Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). Genetics 152: 1679-1690.

EXPERT PROTEIN ANALYSIS SYSTEM (ExPASy) Proteomics Server, CCNE1, Chick, <http://ca.expasy.org/uniprot/P49707>.

FIGUEIREDO EAP, ROSA PS, SCHEUERMANN GN, JAENISCH FRF, SCHMIDT GS, LEDUR M; BRENTANO L, COSTA CAF (2003a) Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. IX World Conference on Animal Production, 13, Anais, Porto Alegre, Brasil.

FIGUEIREDO EAP, SCHMIDT GS, LEDUR MC, AVILA VS, BRUM PAR, FIORENTIN L, JAENISCH FRF (2003b) Genetic gain in egg production and egg weight in White Legorn Embrapa 011. IX World Conference on Animal Production, 13, Anais, Porto Alegre, Brasil.

FURLAN RL, CARVALHO NC, MALHEIROS EB, MACARI, M (2001) Effect of early quantitative feed restriction and environmental temperature on viscera growth and compensatory gain of broiler chickens. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 53: 1-7.

GAYA LG, FERAZ JBS, MATTOS EC, REZENDE FM, FIGUEIREDO LG, MOURÃO GB, FILHO TM, ELER JP (2004) Estimativa de parâmetros genéticos do peso do coração em linhagem macho de frangos de corte. V Simpósio da Sociedade brasileira de melhoramento Animal, Pirassununga, Brasil.

GONZALES E, MACARI M (2000) Enfermidades metabólicas em frangos de corte. In: BERCHIERI JÚNIOR A, MACARI M Doenças das aves. FACTA, Campinas, pp 451-464.

GREEN P, FALLS K, CROOKS S (1990) CRI-MAP Program version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis.

GROENEN MAM, CHENG HH, BUMSTEAD N, BENKEL BF, BRILES WE, BURKE T, BURT DW, CRITTENDEN LB, DODGSON J, HILLEL J, LAMONT S, PONCE DE LEON FA, SOLLER M,

TAKAHASHI H, VIGNAL A (2000) A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome Research* 10: 137-147.

HALEY CS, KNOTT SA, ELSEN JM (1994) Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least-squares. *Genetics* 136: 1195-1207.

HASSANZADEH M, GILANPOUR H, CHARKHKAR S, BUYSE J, DECUYPERE E (2005) Anatomical parameters of cardiopulmonary system in three different lines of chickens: further evidence for involvement in ascites syndrome. *Avian Pathol.* 34(3):188-93.

IKEOBI CON, WOOLLIAMS JA, MORRICE DR, LAW A, WINDSOR D, BURT DW, HOCHING PM (2002) Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. *Animal Genetics* 33: 428-435.

IKEOBI CON, WOOLLIAMS JA, MORRICE DR, LAW A, WINDSOR D, BURT DW, HOCHING PM (2004) Quantitative Trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. *Livestock Production Sciences* 87: 143-151.

JENNEN DGJ, VEREIJKEN ALJ, BOVENHUIS H, CROOIJMANS RPMA, VEENENDAAL A, VAN DER POEL JJ, GROENEN MAM (2004) Detection and localization of quantitative trait loci affecting fatness in broilers. *Poultry Science* 83: 295-301.

JENSEN P (2005) The chicken genome sequence. *Heredity* 94: 567-568.

KERJE S, CARLBORG O, JACOBSSON L, SCHÜTZ K, HARTMANN C, JENSEN P, ANDERSSON L (2003) The twofold difference in adult size between the red junglefowl and white leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. *Animal Genetics* 34: 264-274.

LEDUR MC, BERTANI GR (2002) Análise genômica na avicultura: Resultados e perspectivas. *Anais IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, Campo Grande, Brasil.*

LEDUR MC, BERTANI GR, NONES K (2003) Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. *Anais APINCO: 87-105. Conferência de Ciência e Tecnologia Avícola, Campinas, Brasil.*

LEWIN B (2000) *Genes VII.* Oxford University Press, 990 pp.

LÓPEZ CAA, BAIÃO NC (2004) Efeitos do tamanho da partícula e da forma física da ração sobre o desempenho, rendimento de carcaça e peso dos órgãos digestivos de frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 56: 2.

MARTINEZ-LEMUS LA, MILLER MW, JEFFREY JS, ODOM TW (1998) Echocardiographic evaluation of cardiac structure and function in broiler and Leghorn chickens. *Poult Sci.* 77(7):1045-50.

MACEDO, Empresa de produtos avícolas, <http://www.macedo.com.br>.

MOURA ASAMT, BOSCHIERO C, CAMPOS RLR, AMBO M, NONES K, LEDUR MC, ROSARIO MF, MELO CMR, BURT DW, COUTINHO LL (2006) Mapping qtl for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13. 8<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Brasil, (no prelo).

NCBI Map Viewer, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>.

NONES K, et al. (2006) Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*, <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.13652052.2005.01387.x?prevSearch=allfield%3A%28NONES%29>.

NONES, K (2004) Mapeamento de QTLs no cromossomo 1 de *Gallus gallus* que influenciam características de desempenho e carcaça. Tese Doutorado, Esalq, Piracicaba, Brasil.

NONES K, LEDUR MC, RUY DC, BARON EE, COUTINHO LL (2003) Identificação de QTL associados a peso corporal no cromossomo 1 de aves. Revista Brasileira de Ciência Avícola 5: 109.

PINHEIRO MR (1994) Fisiologia da digestão e absorção das aves. Coleção Facta, Fundação Apinco de Ciências e tecnologias avícolas, Campinas, 176 pp.

QTL EXPRESS, <http://qtl.cap.ed.ac.uk>.

RUY, DC (2004) Mapeamento de QTL para desempenho e características de carcaça, nos cromossomos 3 e 5 de *Gallus gallus*. Tese de Doutorado, Esalq, Piracicaba, Brasil.

RUY DC, NONES K BARON EE, LEDUR MC, CAMPOS RLR, AMBO M, COUTINHO LL (2003) Mapeamento de QTL influenciando o peso corporal no cromossomo 3 de aves (*Gallus Gallus*). Sociedade Brasileira de Genética: 185, CD-ROM. 49 Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, Brasil.

SASAKI O, ODAWARA S, TAKAHASHI H, NIRASAWA K, OYAMADA Y, YAMAMOTO R, ISHII K, NAGAMINE Y, TAKEDA H, KOBAYASHI E, FURUKAWA T (2004) Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens. Animal Genetics 35: 188-194.

SEATON G, HALEY CS, KNOTT SA, KEARSEY M, VISSCHER PM (2002) QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. Bioinformatics 8: 339-340.

SEWALEN A, MORRICE DM, LAW A , WINDSOR D, HALEY CS, IKEOBI CON, BURT DW, HOCKING PM (2002) Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six and nine weeks of age in a broiler layer cross. Poultry Science 81: 1775-1781.

SCHMID M, NANDRA I, GUTTENBACH M, STEINLEIN C, HOEHN H, SCHARTL M, HAAF T, WEIGEND S, FRIES R, BUERSTEDDE JM, WIMMERS K, BURT DW, SMITH J, A'HARA S, LAW A, GRIFFIN DK, BUMSTEAD N, KAUFMAN J, THOMSON PA, BURKE T, GROENEN MAM, CROOIJMANS RPMA, VIGNAL A, FILLON V, MORISSON M, PITEL F, TIXIER-BOICHARD M, LADJALI-MOHAMED K, HILLEL J, MAKI-TANILA A, CHENG HH, DELANY ME, BURNSIDE J, MIZUNO S (2000) First report on chicken genes and chromosomes 2000. Cytogenet. Cell Genet. 90: 169-218.

THAXTON JP (2002) Heart growth in broilers. Br Poult Sci. 43(1):24-7.

TUISKULA-HAAVISTO M, HONKATUKIA M, KONING DJ, SCHULMAN NF, MÄKI-TANILA A (2002) Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in eggs layers. Poultry Science 81: 919-927.

UNESP, Arquivo, Notícias, <http://www.unesp.br/destaques/arquivo/300902b.htm>.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA), <http://www.uba.org.br>.

VOORRIPS R E (2002) MapChart Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. The Journal of Heredity 93: 77-78.



**Tabela 4** - Estrutura da população F2 TCTC, número de aves empregadas em cada geração e o tipo de dados avaliados.

<b>Geração</b>	<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>	<b>Total</b>	<b>Dados</b>
Parental	7	7	14	genótipos
F1	7	20*	27	genótipos
F2	1039	1024	2063	fenótipos e genótipos

\* Houve perda por morte de uma fêmea F1.

**Tabela 5** - Marcadores microssatélites testados inicialmente e sua posição nos mapas referências

<b>Marcador</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Posição no mapa (cM)</b>	<b>Mapa</b>
LEI0143	11	0	Consenso
ADL0123	11	22	Consenso
ADL0210	11	54	Consenso
MCW0230	11	88	Consenso
MCW0213	13	22	Consenso
ADL0147	13	32	Consenso
LEI0251	13	47	Consenso
MCW0244	13	58	<i>Wageningen</i>
MCW0322	13	67	Consenso
MCW0104	13	74	Consenso

**Tabela 6** - Otimização das condições da PCR para os cromossomos 11 e 13

<b>Marcador</b>	<b>Posição (cM)</b>	<b>Seqüência dos iniciadores</b>	<b>TA (°C)</b>	<b>Concentração de MgCl<sub>2</sub></b>
LEI0143	0	CGGAGGTGATACGGATGGAG GATCAATGAGTGCCGGGAGAG	64	1,0
ADL0123	22	GCTGTGTCAAGATTAGAATCAC AACAATGAAAAACTACCTGA	55	2,0
ADL0210	54	GCCAAAAAGATGAATGAGTA ACAGGAGGATAGTCACACAT	55	2,0
MCW0230	88	GATCCTCTGATGGCTGCCG TGCACAGAGCCAAGCTGCTTC	68	1,5
MCW0213	2	CTGTTCACTTTAAGGACATGG GACAAGTCAACAACCTTGCCAG	61	2,0
ADL0147	32	CTGGTGAATGAGAAGCGATG GCTGCGGCAATAAACTCCCT	56	2,0
LEI0251	47	GGTACTCTTATGTTTAATGATGTC CATCTAGAAATGGCTGACTGAC	58	2,0
MCW0110*	59	CATCTGTGTTACTGTACACAG TCAGAGCAGTACGCCGTGGT	58	2,0
MCW0104	74	AGACTTGCACAGCTGTGTACC TAGCACAACCTCAAGCTGTGAG	57	2,0

TA: Temperatura de anelamento do iniciador. \*Primer reduzido.

**Tabela 7** - Resultado das genotipagens dos animais parentais e F1: marcadores, cromossomos, número e respectivos alelos

<b>Marcadores</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Nº de alelos</b>	<b>Alelos (pb)</b>
<b>LEI0143</b>	11	3	264, 268 e 270
<b>ADL0123</b>	11	4	118, 125, 133 e 136
<b>ADL0210</b>	11	4	123, 125, 131 e 133
<b>MCW0230</b>	11	4	270, 278, 295 e 297
<b>MCW0213</b>	13	6	300, 304, 308, 310, 312 e 316
<b>ADL0147</b>	13	3	213, 217 e 219
<b>LEI0251</b>	13	5	105, 117, 119, 124 e 140
<b>MCW0110</b>	13	5	102, 104, 108, 110 e 112
<b>MCW0104</b>	13	5	190, 215, 224, 226 e 228

**Tabela 8** - Grau de informação dos marcadores dos cromossomos 11 e 13

<b>Marcador</b>	<b>Número de meioses informativas totais</b>	<b>Número de meioses informativas (fase conhecida)</b>
LEI0143*	463	325
ADL0123*	620	620
ADL0210*	478	478
MCW0230*	608	304
<b>Média</b>	<b>542</b>	<b>432</b>
MCW0213 <sup>+</sup>	606	606
LEI0251 <sup>+</sup>	602	430
MCW0104 <sup>+</sup>	626	446
ADL0147 <sup>+</sup>	307	150
MCW0110 <sup>+</sup>	612	612
<b>Média</b>	<b>550</b>	<b>449</b>

\*Cromossomo 11; <sup>+</sup>Cromossomo 13.

**Tabela 9** - Estatísticas descritivas das características de desempenho e carcaça dos indivíduos da geração F2 (N=364) pertencentes às quatro famílias incluídas nas análises de mapeamento de QTL

<b>Característica</b>	<b>Média</b>	<b>DP</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
Peso ao nascer (g)	46,03	4,50	15,60	78,70
Peso vivo 35 d (g)	788,7	140,1	490,0	1309,0
Peso vivo 41 d (g)	1004,9	189,9	550,0	1686,0
Peso vivo 42 d (g)	966,5	188,1	526,0	1631,0
Ganho de peso 35 d (g)	742,7	139,4	448,6	1259,1
Ganho de peso 41 d (g)	958,9	189,0	471,3	1636,1
Ganho de peso 42 d (g)	920,5	187,2	447,3	1582,2
Ganho de peso 35 a 41 d (g)	219,6	68,0	39,0	388,0
Consumo de ração 35 a 41 d (g)	604,6	145,7	218,0	1176,0
Conversão alimentar 35 a 41 d	2,95	0,88	1,52	8,20
Eficiência alimentar 35 a 41 d	0,359	0,072	0,122	0,657
Peso da carcaça (g)	628,0	131,2	309,0	1104,0
Rendimento de carcaça (%)	64,81	2,04	55,54	75,34
Peso do peito (g)	158,5	35,5	70,0	303,0
% Peito	16,33	1,04	13,31	20,00
Peso da gordura abdominal (g)	14,20	7,17	0,00	38,00
% Gordura abdominal	1,42	0,58	0,00	3,50
Peso das coxas e sobrecoxas (g)	207,4	45,4	102,0	354,0
Peso das asas (g)	79,30	14,83	31,00	127,00
Peso da cabeça (g)	34,62	6,15	21,00	55,00
Peso dos pés (g)	39,27	9,11	23,00	73,00
Peso do dorso (g)	182,8	39,2	92,0	334,0
Peso da moela (g)	22,93	4,38	13,00	39,00
Peso do coração (g)	6,56	1,72	2,00	12,00
Peso do fígado (g)	26,31	5,37	15,00	49,00
Peso do pulmão (g)	8,09	2,21	3,00	14,00
Comprimento do intestino (cm) <sup>1</sup>	150,6	14,8	112,0	204,0
Hematócrito	28,41	3,26	18,00	43,00

DP - Desvio padrão. <sup>1</sup> Delgado e grosso.

**Tabela 10** - Efeitos fixos principais e interações duplas significativas ( $P < 0,05$ ) na análise estatística exploratória dos dados fenotípicos

Característica	Incubação	Sexo	Família	I*S <sup>1</sup>	I*F <sup>2</sup>	S*F <sup>3</sup>	Cov <sup>4</sup>
Peso ao nascer	X	X	X				
Peso vivo 35 d	X	X	X				
Peso vivo 41 d	X	X	X				
Peso vivo 42 d	X	X	X				
Ganho de peso 35 d	X	X	X				
Ganho de peso 41 d	X	X	X				
Ganho de peso 42 d	X	X	X				
Ganho de peso 35 a 41 d	X	X	X				X
Consumo de ração 35 a 41 d	X	X	X	X	X	X	X
Conversão alimentar 35 a 41 d	X	X			X		
Eficiência alimentar 35 a 41 d	X	X					
Peso da carcaça	X	X					X
Rendimento de carcaça	X		X				
Peso do peito	X	X					X
% Peito	X	X					
Peso da gordura abdominal	X	X	X			X	X
% Gordura abdominal	X	X	X			X	
Peso das coxas e sobrecoxas	X		X				X
Peso das asas	X	X	X	X			X
Peso da cabeça	X	X	X	X	X	X	X
Peso dos pés		X	X			X	X
Peso do dorso	X		X				X
Peso da moela	X		X				X
Peso do coração	X	X					X
Peso do fígado	X	X	X				X
Peso do pulmão			X				X
Comprimento do intestino	X	X		X	X	X	X
Hematócrito	X		X	X	X		

<sup>1</sup> Interação Incubação x Sexo; <sup>2</sup> Interação Incubação x Família; <sup>3</sup> Interação Sexo x Família.

<sup>4</sup> Covariáveis incluídas nos modelos de análise exploratória: PN para pesos e ganhos de peso, todos 35, 41 e 42 dias; P35 para ganho de peso, consumo, conversão e eficiência alimentar, todos dos 35 aos 41 dias; P42 para características de carcaça, partes, vísceras e hematócrito. Nenhuma covariável foi incluída no modelo para peso ao nascer, rendimento de carcaça e porcentagens de peito e de gordura abdominal.

**Tabela 11** - Valores do teste F da análise de Mapeamento de QTL e valores críticos de F para 5% de significância no cromossomo e ligação sugestiva e significativa a 5% no genoma, estimados a partir das permutações para o cromossomo 11

<b>Característica</b>	<b>Valor de F (análise)</b>	<b>Valor de F (5% cromossomo)</b>	<b>Valor de F (sugestivo)</b>	<b>Valor de F (5% genoma)</b>
Peso ao nascer	3,76	4,52	4,87	7,72
Peso vivo 35 dias	1,90	4,77	5,25	8,52
Peso vivo 41 dias	2,29	4,87	5,37	8,36
Peso vivo 42 dias	2,15	4,84	5,34	8,23
Ganho de peso 35 dias	2,01	4,75	5,14	8,60
Ganho de peso 41 dias	2,37	4,79	5,29	8,74
Ganho de peso 42 dias	2,23	4,82	5,30	8,33
Ganho de peso 35 a 41 dias	1,74	4,59	5,07	8,39
Consumo de ração 35 a 41 dias	1,06	4,77	5,20	8,14
Conversão alimentar 35 aos 41 dias	2,26	4,80	5,36	9,00
Eficiência alimentar 35 a 41 d	2,22	4,72	5,23	8,58
Peso da carcaça	2,93	4,72	5,23	8,71
Rendimento de carcaça	4,74	4,72	5,27	8,47
Peso do peito	2,55	4,79	5,14	8,84
% Peito	3,22	4,72	5,23	8,57
Peso da gordura abdominal	1,25	4,70	5,12	8,70
% Gordura abdominal	2,40	4,73	5,18	8,50
Peso das coxas e sobrecoxas	3,21	4,73	5,20	8,56
Peso das asas	4,40	4,74	5,27	9,40
Peso da cabeça	3,91	4,79	5,31	8,99
Peso dos pés	5,74	4,79	5,30	8,94
Peso do dorso	4,38	4,80	5,13	8,44
Peso da moela	5,94	4,77	5,30	8,51
Peso do coração	1,12	4,79	5,27	8,63
Peso do fígado	3,13	4,82	5,32	9,17
Peso do pulmão	4,18	4,74	5,26	9,00
Comprimento do intestino	3,91	4,75	5,22	8,06
Hematócrito	2,03	4,83	5,24	9,00



**Tabela 12** - Valores do teste F da análise de Mapeamento de QTL e valores críticos de F para 5% de significância no cromossomo e ligação sugestiva e significativa a 5% no genoma, estimados a partir das permutações para o cromossomo 13 utilizando o mapa *Embrapa*

<b>Característica</b>	<b>Valor de F (análise)</b>	<b>Valor de F (5% cromossomo)</b>	<b>Valor de F (sugestivo)</b>	<b>Valor de F (5% genoma)</b>
Peso ao nascer	1,00	4,18	4,89	6,67
Peso vivo 35 dias	2,92	4,52	5,63	8,62
Peso vivo 41 dias	4,21	4,55	5,57	8,30
Peso vivo 42 dias	4,17	4,60	5,75	8,76
Ganho de peso 35 dias	2,92	4,54	5,53	8,89
Ganho de peso 41 dias	4,25	4,58	5,58	8,95
Ganho de peso 42 dias	4,21	4,55	5,52	8,38
Ganho de peso 35 a 41 dias	3,33	4,30	5,34	8,45
Consumo de ração 35 a 41 dias	2,18	4,52	5,54	8,66
Conversão alimentar 35 aos 41 dias	2,21	4,45	5,56	8,82
Eficiência alimentar 35 a 41 dias	2,19	4,45	5,49	8,83
Peso da carcaça	2,70	4,61	5,62	8,94
Rendimento de carcaça	3,54	4,45	5,47	8,32
Peso do peito	3,41	4,56	5,58	8,92
% Peito	4,19	4,67	5,59	9,19
Peso da gordura abdominal	2,07	4,58	5,57	8,57
% Gordura abdominal	2,54	4,54	5,66	8,41
Peso das coxas e sobrecoxas	1,36	4,57	5,46	9,03
Peso das asas	2,75	4,59	5,64	8,87
Peso da cabeça	1,60	4,44	5,50	8,53
Peso dos pés	4,14	4,57	5,62	8,95
Peso do dorso	2,03	4,48	5,44	8,88
Peso da moela	3,78	4,54	5,57	8,81
Peso do coração	8,37	4,57	5,54	8,70
Peso do fígado	2,36	4,51	5,52	8,80
Peso do pulmão	0,66	4,62	5,67	9,14
Comprimento do intestino	3,63	4,65	5,58	9,13
Hematócrito	1,95	4,41	5,46	8,85

**Tabela 13** - Valores do teste F da análise de Mapeamento de QTL e valores críticos de F para 5% de significância no cromossomo e ligação sugestiva e significativa a 5% no genoma, estimados a partir das permutações para o cromossomo 13 utilizando o mapa Consenso

<b>Característica</b>	<b>Valor de F (análise)</b>	<b>Valor de F (5% cromossomo)</b>	<b>Valor de F (sugestivo)</b>	<b>Valor de F (5% genoma)</b>
Peso ao nascer	0,99	4,22	5,13	7,58
Peso vivo 35 dias	3,56	4,59	5,85	9,41
Peso vivo 41 dias	4,74	4,61	5,73	9,56
Peso vivo 42 dias	4,72	4,48	5,65	8,89
Ganho de peso 35 dias	3,57	4,56	5,62	8,28
Ganho de peso 41 dias	4,78	4,56	5,63	8,96
Ganho de peso 42 dias	4,75	4,62	5,74	9,03
Ganho de peso 35 a 41 dias	3,27	4,25	5,44	8,88
Consumo de ração 35 aos 41 dias	2,17	4,61	5,58	9,01
Conversão alimentar 35 aos 41 dias	2,19	4,50	5,65	8,79
Eficiência alimentar 35 aos 41 dias	2,17	4,47	5,54	8,75
Peso da carcaça	2,78	4,42	5,49	8,35
Rendimento de carcaça	3,55	4,59	5,55	8,61
Peso do peito	3,48	4,55	5,76	8,90
% Peito	4,20	4,65	5,71	9,37
Peso da gordura abdominal	2,09	4,52	5,63	8,72
% Gordura abdominal	1,97	4,58	5,68	8,79
Peso das coxas e sobrecoxas	1,23	4,53	5,64	8,78
Peso das asas	2,71	4,63	5,78	9,03
Peso da cabeça	1,58	4,59	5,70	8,46
Peso dos pés	4,15	4,65	5,71	8,48
Peso do dorso	1,95	4,63	5,69	8,94
Peso da moela	4,00	4,54	5,62	8,80
Peso do coração	8,42	4,62	5,66	9,13
Peso do fígado	2,31	4,61	5,71	8,86
Peso do pulmão	0,68	4,62	5,69	9,32
Comprimento do intestino	3,63	4,59	5,61	8,31
Hematócrito	1,94	4,48	5,63	8,55

**Tabela 14** - Efeitos aditivos e de dominância (seus erros-padrão), intervalo dos marcadores, posição em cM e a proporção da variância fenotípica explicada pelos QTLs mapeados nos cromossomos 11 e 13

<b>Cromossomo</b>	<b>Característica</b>	<b>Posição em cM</b>	<b>Marcadores flanqueadores</b>	<b>Efeito Aditivo (EP)</b>	<b>Efeito de Dominância (EP)</b>	<b>R<sup>2</sup> (%)</b>
11(ME) <sup>+</sup>	Peso dos pés (g)	46 <sup>1</sup>	ADL0123 e ADL0210	1,13 (0,39)	-1,67 (0,73)	2,87
11(ME) <sup>+</sup>	Peso da moela (g)	43 <sup>1</sup>	ADL0123 e ADL0210	1,10 (0,35)	-1,25 (0,65)	2,98
11(ME) <sup>§</sup>	Rendimento de carcaça (%)	39 <sup>1</sup>	ADL0123 e ADL0210	-0,04 (0,20)	1,11 (0,36)	1,59
13(ME) <sup>+</sup>	Peso do coração (g)	39 <sup>2</sup>	MCW0110 e MCW0104	0,43 (0,10)	0,13 (0,15)	4,34
13(MC) <sup>+</sup>	Peso do coração (g)	40 <sup>3</sup>	MCW0110 e MCW0104	0,42 (0,10)	0,14 (0,15)	4,37
13 (MC) <sup>§</sup>	Peso aos 41 dias (g)	5 <sup>3</sup>	ADL0147 e MCW0213	-0,88 (10,48)	-48,25 (15,78)	2,27
13 (MC) <sup>§</sup>	Peso aos 42 dias (g)	5 <sup>3</sup>	ADL0147 e MCW0213	-2,53 (10,20)	-46,49 (15,36)	2,25
13 (MC) <sup>§</sup>	Ganho de peso aos 41 dias (g)	5 <sup>3</sup>	ADL0147 e MCW0213	-0,741 (10,49)	-48,52 (15,80)	2,29
13 (MC) <sup>§</sup>	Ganho de peso aos 42 dias (g)	5 <sup>3</sup>	ADL0147 e MCW0213	-2,38 (10,21)	-46,76 (15,38)	2,27

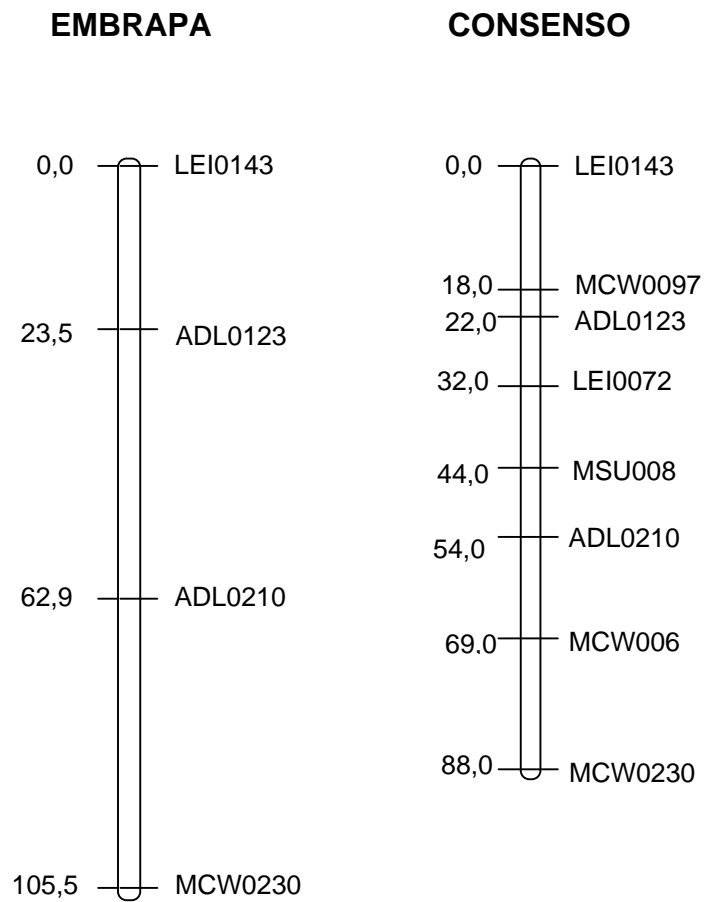
<sup>+</sup> QTL sugestivo, <sup>§</sup>QTL significativo a 5% no cromossomo. ME = mapa *Embrapa*; MC= mapa Consenso. EP = erro padrão. R<sup>2</sup> = Porcentagem da variância fenotípica.

<sup>1</sup> Posição do QTL em relação ao primeiro marcador no cromossomo 11 utilizando o mapa *Embrapa* (correspondendo a mesma localização do primeiro marcador no mapa Consenso).

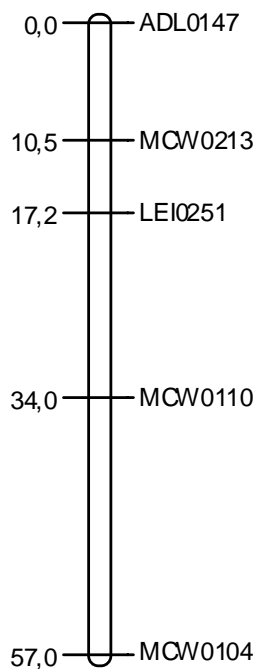
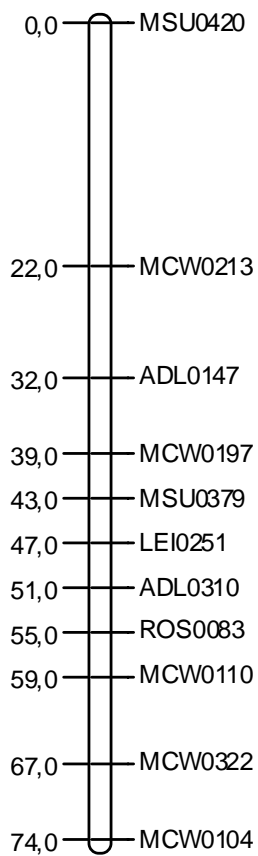
<sup>2</sup> Posição do QTL em relação ao primeiro marcador no cromossomo 13 utilizando o mapa *Embrapa* (correspondendo ao MCW0213 a 22 cM no mapa Consenso).

<sup>3</sup> Posição do QTL em relação ao primeiro marcador no cromossomo 13 utilizando o mapa Consenso (correspondendo ao MCW0213 a 22 cM no mapa Consenso).

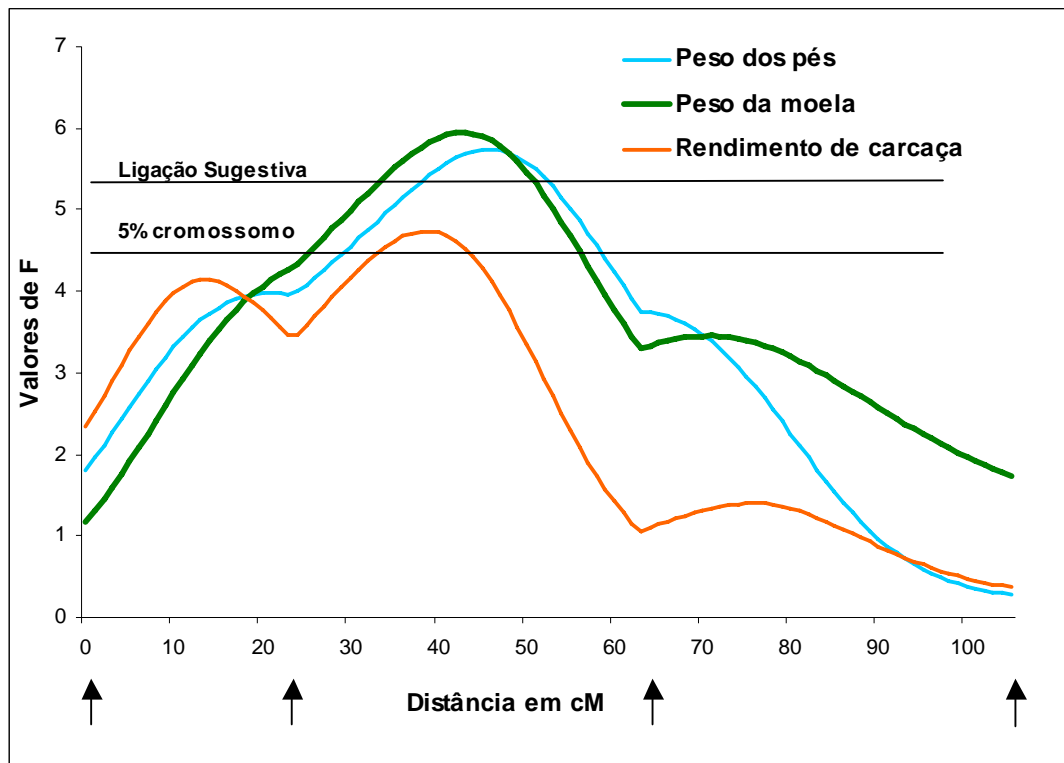




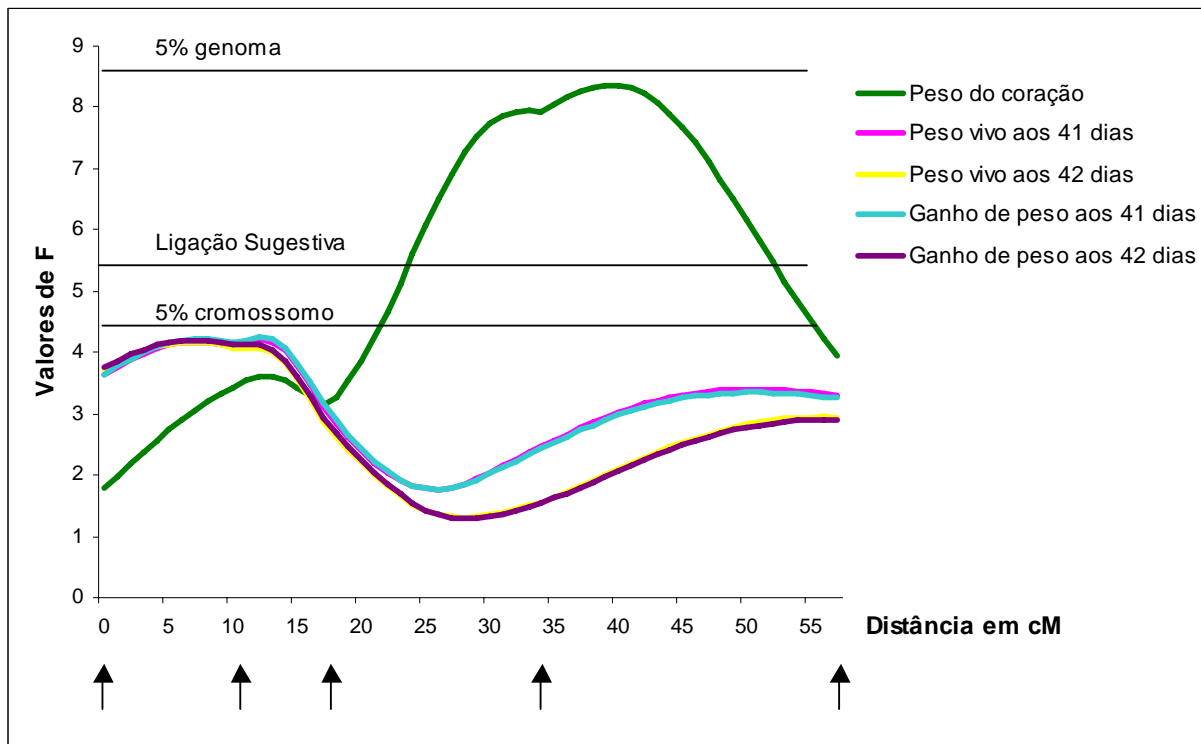
**Figura 3** - Mapa de ligação do cromossomo 11 contendo as posições em cM (Kosambi), médias dos dois sexos. Da esquerda para direita: mapa de ligação *Embrapa* (obtido neste trabalho) e mapa Consenso. Desenhado com o auxílio do programa *Mapchart* (Voorrips, 2002)

**EMBRAPA****CONSENSO**

**Figura 4** - Mapa de ligação do cromossomo 13 contendo as posições em cM (Kosambi), médias dos dois sexos. Da esquerda para direita: mapa de ligação *Embrapa* (obtido neste trabalho) e mapa Consenso completo. Desenhado com o auxílio do programa *Mapchart* (Voorrips, 2002)

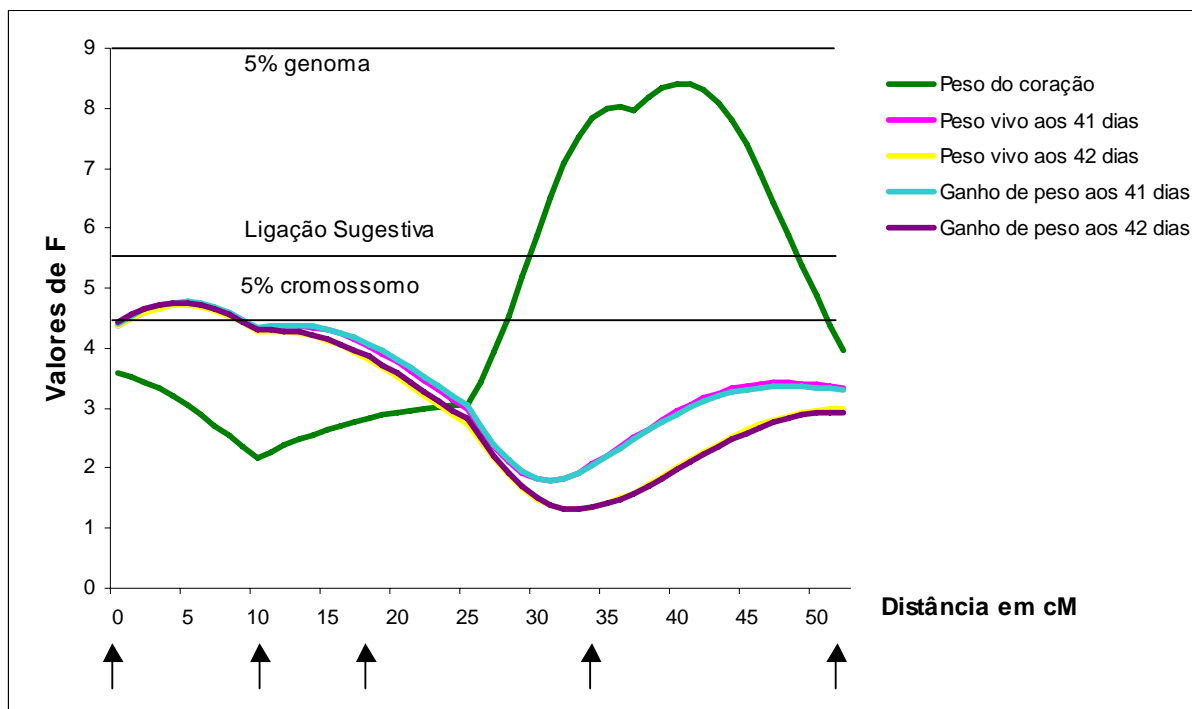


**Figura 5** – Valores de F para diversas características obtidos na análise de mapeamento de QTL no modelo de F2 para o cromossomo 11. As setas representam a localização dos marcadores utilizados



**Figura 6** – Valores de F para diversas características obtidos na análise de mapeamento de QTL no modelo de F2 para o cromossomo 13 quando utilizamos o mapa Embrapa. As setas representam a localização dos marcadores utilizados





**Figura 7** – Valores de F para diversas características obtidos na análise de mapeamento de QTL no modelo de F2 para o cromossomo 13 quando utilizamos o mapa Consenso. As setas representam a localização dos marcadores utilizados

### **CAPÍTULO 3**

### **IMPLICAÇÕES**

Foram mapeados no cromossomo 11, dois QTLs sugestivos inéditos para peso de pés e peso de moela posicionados na mesma região. No cromossomo 13 foi mapeado um QTL sugestivo inédito para peso de coração que explica alta porcentagem de variância fenotípica desta característica.

Os QTLs mapeados neste estudo devem ser melhor investigados, principalmente para peso do coração, uma vez que esta característica é de interesse para a indústria avícola, em função dos problemas metabólicos cada vez mais freqüentes resultantes do intenso melhoramento genético em frangos.

Não foram mapeados QTLs significativos nos cromossomos 11 e 13, apesar de haver na literatura muitos trabalhos relatando QTLs significativos no cromossomo 13. Um dos possíveis motivos pode ser o número de F2 genotipados (aproximadamente 330) quando comparado a outros estudos neste cromossomo, que utilizaram mais de 440 animais da geração F2. Pretende-se aumentar o número de animais F2 genotipados, uma família de irmãos-completos, com cerca de 90 animais, a fim de aproximarmos este número à maioria dos trabalhos encontrados na literatura. Outra possibilidade seria incluir novos marcadores, principalmente na região onde ocorreu a inversão dos marcadores no cromossomo 13.

## ANEXOS

### I) Protocolo para extração de DNA de aves utilizando detergente de guanidina (DNAzol ®<sup>4</sup>)

- 1) Pipetar 5µl de sangue em tubo *ependorf* de 1,5µL.
- 2) Adicionar 500 µl de detergente de guanidina (DNAzol ®), agitar bem até diluir o sangue.
- 3) Adicionar 250µl de Etanol Absoluto, inverter os tubos várias vezes cuidadosamente, até ficar bem misturado.
- 4) “Pescar” o DNA formado com uma pipeta.
- 5) Descartar o líquido e voltar o pélete de DNA para o mesmo tubo.
- 6) Colocar 500µl de etanol 95% para lavar o DNA, agitar bastante para lavar bem.
- 7) Centrifugar por dez minutos a 4000 rpm.
- 8) Descartar o sobrenadante e observar se os péletes estão fixados no fundo dos tubos para não correr o risco de descartá-los com o sobrenadante.
- 9) Repetir a lavagem com Etanol 95% (passos 6, 7 e 8).
- 10) Depois de descartar o sobrenadante, deixar os tubos secarem em temperatura ambiente por 10 minutos.
- 11) Ressuspender os péletes com 150 µl de água *MilliQ*.

---

<sup>4</sup> Invitrogen Life Technologies.

## II) Protocolo para extração e purificação de DNA de aves utilizando Proteinase K

- a) Aquecer as mostras a 37° C. Retirar alíquota de 50 µl do sangue total colhido com EDTA, e adicionar 1mL de tampão de lise de células vermelhas.
- b) Centrifugar por um minuto a 1300 rpm. Descartar o sobrenadante. Repetir o passo a e b uma ou mais vezes, até que o sobrenadante fique claro.
- c) Lavar o pélete uma vez com 500 µl de água destilada, centrifugar a 1300 rpm por um minuto, e depois se deve retirar o sobrenadante.
- d) Em um *becker* de 50mL adicionar 80µl do tampão de proteinase K (5x), 7µl de proteinase K (20 mg/mL), 10 µl de SDS 20% e 283 µl de água destilada (volume total = 380 µl). Este volume total é para cada amostra.
- e) Ressuspender o pélete em 380 µl do *mix* de proteinase K (vortexar ao invés de ressuspender com a ponteira).
- f) Incubar a 55 °C por uma hora numa placa aquecedora.
- g) Adicionar 120 µl de NaCl 5M e agitar no vórtex por 15 segundos. Centrifugar a 1300 rpm por 5 minutos.
- h) Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 1 mL de etanol absoluto. Homogeneizar e centrifugar por 5 min a 1300 rpm.
- i) Lavar o pélete com etanol (1 mL) a 95% a 1300 rpm por 5 minutos.
- j) Descartar o sobrenadante e deixar o pélete secar por uma hora a temperatura ambiente – aberto os tubinhos.
- k) Ressuspender o pélete em 50, 100 ou 150 µl de água (dependendo do tamanho do pélete) e agitar no vórtex por 30 segundos.
- l) Colocar o DNA diluído no bloco aquecedor por 4 a 8h a 37°C. Armazenar o DNA no *freezer* a -20° C.

### Tampão de lise

0,32 M de sucrose

12 mM Tris – HCl pH 7,5

5mM MgCl<sub>2</sub>

1% de Triton X

### Tampão de proteinase K (5x)

0,375M de NaCl

0,12 M EDTA (pH = 8)

## III) Protocolo de amplificação (PCR)

Data: \_\_\_\_\_

Cromossomo: \_\_\_\_\_

Microsatélite: \_\_\_\_\_

Programa: \_\_\_\_\_

Amostras: \_\_\_\_\_

Termociclador: \_\_\_\_\_

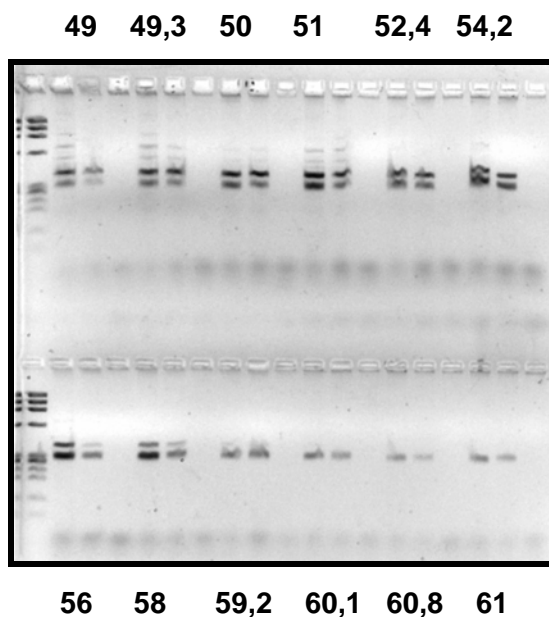
Reação Padrão	1X	_____	_____
Água milliQ	10,2	_____	_____
Tampão	2,5	_____	_____
MgCl <sub>2</sub>	2,0	_____	_____
dNTP	1,0	_____	_____
Primer F	2,0	_____	_____
Primer R	2,0	_____	_____
Taq DNA Pol (5U/μL)	0,3	_____	_____
DNA (20ng/μL)	5,0	_____	_____

IV) Programa utilizado nos termocicladores para amplificação dos marcadores microssatélites

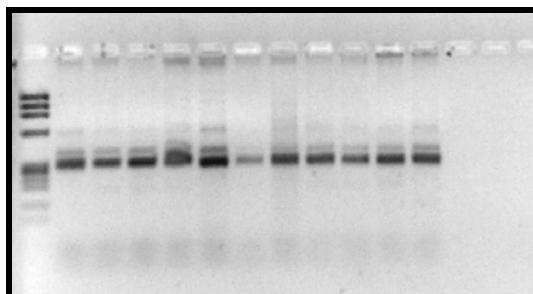
<b>Passos</b>	<b>Temperatura (° C)</b>	<b>Tempo</b>
1	94	2 minutos
2	94	1 minuto
3	TA (variável) *	1 minuto
4	72	1 minuto
5	Repete passos 2 a 4	29 vezes
6	72	10 minutos
7	10	indefinido

\*Cada marcador possui uma temperatura de anelamento (TA) específica.

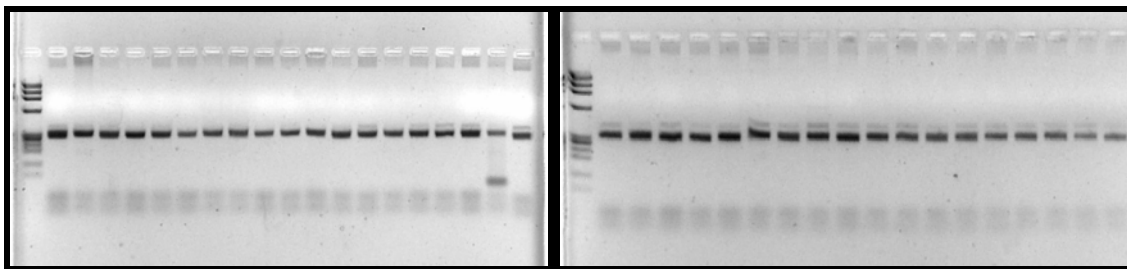
## V) Figuras dos géis de agarose



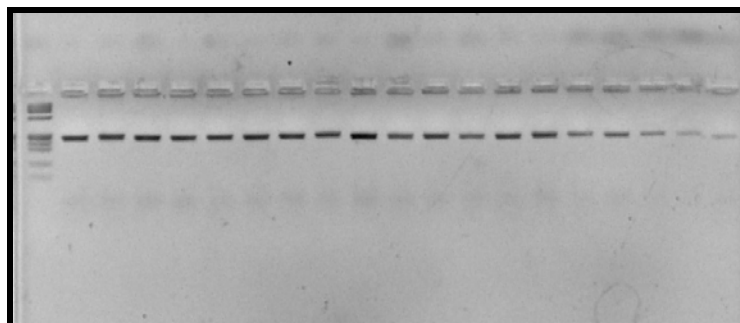
1 - Gel de agarose a 2% com realização de teste de gradiente de temperatura para o marcador MCW0213 em 29/10/04. Os números acima e abaixo da figura indicam a temperatura de anelamento testada ( $^{\circ}\text{C}$ ) para cada duas amostras de DNA. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular  $\emptyset$  X174 RF DNA/ Hae III



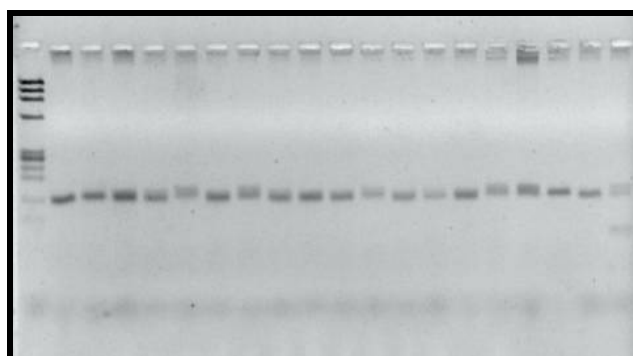
2 - Gel de agarose a 2% onde foi aplicado o produto de amplificação MCW0213 para animais parentais com as condições de PCR. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular  $\emptyset$  X174 RF DNA/ Hae III



3 - Géis de agarose a 2% onde foi aplicado o produto de amplificação MCW0213 para as famílias 7978 (esquerda) e 7971 (direita), com as condições de PCR otimizadas em 17/11/04. Nas primeiras canaletas foram aplicados os padrões de peso molecular  $\varnothing$  X174 RF DNA/ Hae III



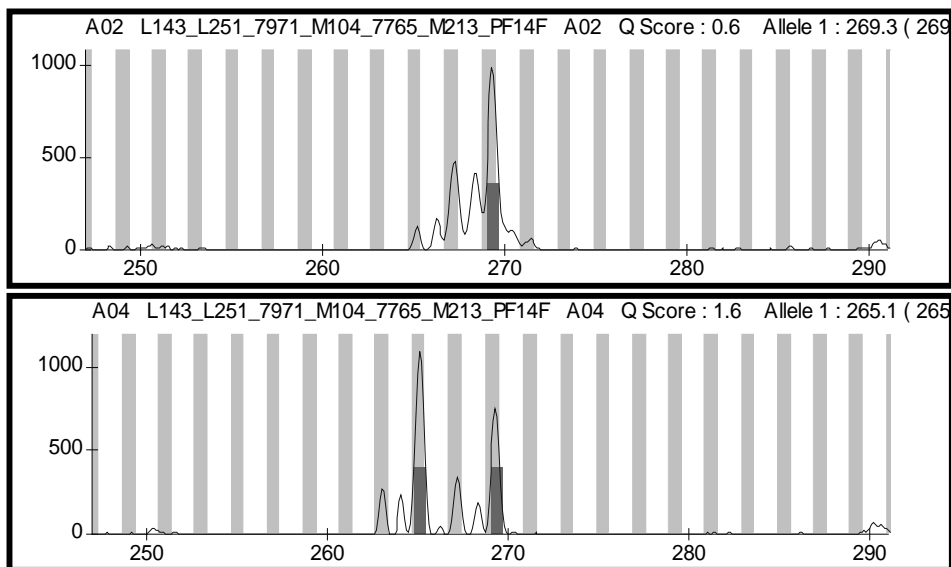
4 - Gel de agarose a 2% onde foi aplicado o produto de amplificação LEI0143 para a família 7971 com as condições de PCR otimizadas em 27/10/04. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular  $\varnothing$  X174 RF DNA/ Hae III



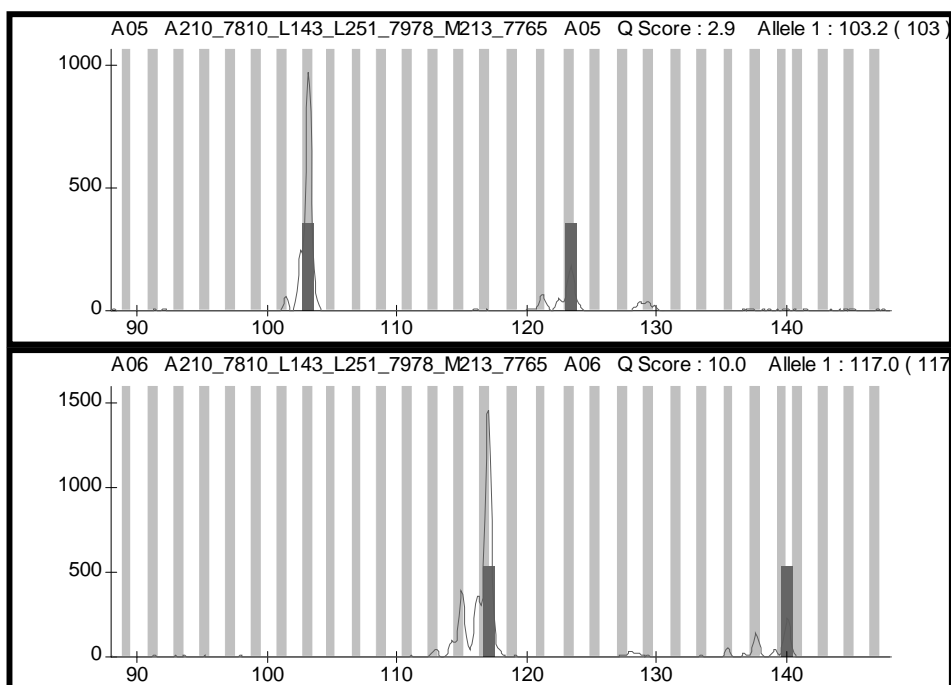
5 - Gel de agarose a 2% onde foi aplicado o produto de amplificação ADL0123 para a família 7765 com as condições de PCR otimizadas em 27/10/04. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular  $\varnothing$  X174 RF DNA/ Hae III



VI) Representação gráfica de alguns genótipos obtidos no seqüenciador automático MegaBACE (GE Healthcare)



Representação gráfica dos genótipos obtidos no seqüenciador automático MegaBACE (GE Healthcare) de animais parentais - homocigoto e heterocigoto do marcador LEI0143 (genótipos: 270, 270 e 264, 270)



Representação gráfica dos genótipos obtidos no seqüenciador automático MegaBACE (GE Healthcare) de um casal da geração F1 do marcador LEI0251 (genótipo do A05: 105/124 e A06: 117/140)

VII) Mapas dos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus*, da esquerda para direita: localização dos genes conhecidos, porcentagem de repetições GC e SNPs ([http://analysis1.lab.nig.ac.jp/Gallus\\_gallus/](http://analysis1.lab.nig.ac.jp/Gallus_gallus/))

