**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DOS
FATORES MIOGÊNICOS E MIOSTATINA COMO
MARCADORES MOLECULARES PARA
CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM *Gallus gallus***

CARLA DOS ANJOS DE SOUZA

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Ciência
Animal e Pastagens

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2004

**INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DOS
FATORES MIOGÊNICOS E MIOSTATINA COMO
MARCADORES MOLECULARES PARA
CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM *Gallus gallus***

CARLA DOS ANJOS DE SOUZA

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Ciência Animal
e Pastagens

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2004

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Souza, Carla dos Anjos de

Investigação de polimorfismo nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em *Gallus gallus* / Carla do Anjos de Souza. - - Piracicaba, 2004.
108 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.
Bibliografia.

1. Avicultura 2. Biotecnologia 3. Crescimento e desenvolvimento 4. Genes 5. Marcador molecular 6. Polimorfismo I. Título

CDD 636.5

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

*Aos meus amados pais Raimundo e Neide e à minha irmã Claudia.
Com vocês dividi alegrias, aflições e sonhos. Alguns destes sonhos com o tempo se vão,
outros porém tornam-se realidade. A vocês toda minha conquista, por vocês toda fé na
vida, para vocês todo meu amor.*

OFEREÇO

Aos meus avós Hildebrando e Juracy (in memorian) pelo amor e educação

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho. Em especial:

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela orientação, apoio e valiosos conhecimentos durante os anos de mestrado.

A pesquisadora Dra. Mônica Ledur pela orientação e pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Irineu Umberto Packer pelos ensinamentos e contribuição ao meu desenvolvimento profissional.

Aos pesquisadores Lúcia Elvira Álvares, Amauri Wenceslau e Cláudia Cristina Paro Paz pela troca de experiências, discussões e sugestões.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Valéria, Ciane e Flávio que apesar da distancia sempre estiveram presentes.

Às amigas Clarissa (Clareca), Ana Paula (Flipper) e Helena pelo apoio em todos os momentos, pelo companheirismo e amizade.

Às amigas Priscilla (Inguiço), Isabel (Bel), Adriana e Aline, minha família “emprestada”, por todos os momentos compartilhados, principalmente pela paciência e amizade.

Aos amigos Marcus Vinícius (Urrahh!!!), Anderson (Folha), Daniel (Bibo), Robson Barizon (Zuza), Adriano (Min), Anderson (Lange) e Élio pelo companheirismo e momentos de descontração.

Aos amigos da Vila Estudantil da ESALQ Érika, Júlio, Wirifran e Cláudio pelos momentos compartilhados.

A Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz pela oportunidade de realizar o curso.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que estiveram presentes na minha vida e durante a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

"Se não houver frutos

Valeu a beleza das flores

Se não houver flores

Valeu a sombra das folhas

Se não houver folhas

Valeu a intenção da semente"

Henfil

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiii
RESUMO	xv
SUMMARY	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Biotecnologia na avicultura.....	4
2.2 Genes candidatos.....	6
2.3 Marcadores SNPs	11
2.4 Formação da fibra muscular.....	12
2.5 Origem Embriológica da Musculatura Esquelética	13
2.6 Fatores regulatórios da miogênese	16
2.6.1 Propriedades estruturais das proteínas MRF	17
2.6.2 Expressão espacial e temporal dos fatores miogênicos.....	19
2.6.3 Papel funcional dos fatores miogênicos na formação da musculatura esquelética	22
2.7 Miostatina.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Formação da população referência.....	28
3.1.1 Linhagens	28
3.1.2 Formação da geração F1 e F2	29

3.2	Dados fenotípicos coletados.....	30
3.3	Extração de DNA	31
3.4	Leitura no espectrofotômetro	31
3.5	Detecção de polimorfismos.....	31
3.5.1	Preparação dos <i>pools</i> de DNA	31
3.5.2	PCR	32
3.5.3	Clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR.....	33
3.5.4	Análise das seqüências.....	33
3.6	Escolha dos polimorfismos e desenho de <i>primers</i> para genotipagem.....	34
3.7	Otimização da PCR.....	35
3.8	Purificação pré-seqüenciamento dos produtos da PCR	38
3.9	Seqüenciamento dos produtos de PCR	38
3.10	Genotipagem	38
3.10.1	Geração parental.....	39
3.10.2	Genotipagem seletiva da geração F2.....	39
3.10.3	Genotipagem dos indivíduos F2 das famílias informativas	40
3.11	Análise Estatística	40
3.11.1	Teste χ^2 (Qui-quadrado).....	40
3.11.2	Análise de Variância	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1	Detecção de polimorfismos.....	43
4.2	Validação de polimorfismos	50
4.2.1	Miostatina.....	50
4.2.2	Miogenina	52
4.2.3	MRF4	54
4.2.4	Myf5.....	56
4.2.5	MyoD	58
4.3	Análise Estatística	60
4.3.1	Seleção dos animais para genotipagem seletiva.....	61
4.3.2	Test χ^2 da genotipagem seletiva	63

4.3.3	Genotipagem dos indivíduos F2 das famílias informativas	63
4.3.4	Análise de variância	66
4.3.5	Miostatina e o mapeamento de QTLs no cromossomo 7	73
4.3.6	MyoD e o mapeamento de QTLs no cromossomo 5	74
4.3.7	Genotipagem seletiva na análise de genes candidatos	74
4.3.8	Efeito da miogenina sobre as características de desempenho e carcaça	75
5	CONCLUSÃO	77
	ANEXOS	79
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Maturação do somito epitelial. A figura ilustra a subdivisão do somito em compartimentos: o esclerótomo, o dermomiótomo e seus subdomínios e o miótomo, originado pela migração das células do dermomiótomo epaxial e hipaxial, durante e após o processo de brotamento da placa segmentar.....	15
2 Alinhamento das seqüências traduzidas dos genes da família MyoD de Gallus gallus, realizado pelo ClustalW multiple sequence alignment (www.ebi.ac.uk/clustalw). Vermelho - resíduos hidrofóbicos e aromáticos; azul – resíduos negativamente carregados; magenta - resíduos positivamente carregados; verde – outros resíduos polares. (*) - Os resíduos nessa coluna são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; (:) – substituições conservadas identificadas por letras da mesma cor; (.) – substituições semi-conservadas.....	18
3 Expressão temporal dos fatores miogênicos durante o desenvolvimento da musculatura esquelética. MyoD e Myf5 atuam na determinação de mioblastos, enquanto que a miogenina, e o MRF4 estão envolvidos no programa de diferenciação terminal das células musculares (Weintraub et al., 1991).....	21
4 Seqüência do contig 1 da miostatina com a localização dos polimorfismos detectados, segundo a numeração disponível no NCBI (acesso AF346599).....	44
5 Seqüência do contig 2 da miostatina com a localização dos polimorfismos detectados (NCBI, acesso AF346599).....	45

6	Contigs formados pela remontagem das seqüências dos contigs 1 e 2 da miogenina.....	46
7	Polimorfismos detectados nos contigs 1 e 2 referentes à extremidade 5'. A região CDS foi localizada pelo alinhamento dos contigs com a seqüência disponível sob número de acesso D90157 no NCBI, realizada pelo programa Vector NTI.....	47
8	Polimorfismos detectados nos contigs 3 e 4 referentes à extremidade 3'. A região CDS foi localizada pelo alinhamento dos contigs com a seqüência disponível sob acesso D90157 no NCBI, realizada pelo programa Vector NTI.....	48
9	Seqüência do único contig do gene Myf5 com a localização dos polimorfismos detectados (NCBI, acesso X73250).....	49
10	Gene MyoD de Gallus gallus com a localização dos primers e do polimorfismo caracterizado pela deleção de 13 pares de base no intron 2.....	50
11	Localização do sítio polimórfico 4938 da miostatina: Substituição A => G, presente em parentais da linhagem CC.....	51
12	Padrão dos cromatogramas dos possíveis genótipos no loco A4938G da miostatina, obtidos no seqüenciamento dos produtos de PCR.....	52
13	Polimorfismos detectados na genotipagem por seqüenciamento da miogenina, na geração parental: 1 - C => T, polimorfismo miog_10 ou nucleotídeo 455 (acesso D90157, NCBI); 2 - T => C, polimorfismo miog_13; 3 - C=>T, miog_16; 4 - C => T, miog_16; 5 - Deleção [AATCACA] e [A], polimorfismo miog_17; 6 - Deleção [AATCACA] e [A], polimorfismo miog_17.....	53

14	Ilustração do fragmento clonado do gene MRF4 e localização dos primers testados. As regiões CDS foram localizadas pelo alinhamento dos contigs com a sequência acessada pelo ID – D10599 no NCBI, realizado pelo programa Vector NTI.....	55
15	Gene Myf5 (GenBank, ID: X73250), contendo a localização dos primers testados.....	58
16	Produto de PCR seqüenciado do gene MyoD. A deleção de 13 pares de base está destacada em vermelho e a região microssatélite [AGC] em azul.....	59

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Resultados obtidos pela análise de genes candidatos relacionados à caracteres de produção.....	9
2 Resultados obtidos pela análise de genes candidatos envolvidos nos mecanismos imunológicos relacionados à resistência a inoculação de <i>Salmonella enteritidis</i>	10
3 Estrutura populacional do cruzamento TC.....	30
4 Sequência dos primers utilizados nas PCRs e tamanho dos produtos resultantes da amplificação.....	32
5 Sequência dos primers desenhados e testados para a genotipagem.....	35
6 Programa utilizado nos termocicladores para otimização da PCR.....	36
7 Conteúdo dos tampões 5X do PCR Optimizer Kit (Invitrogen).....	37
8 Número de contigs, reads e SNPs identificados em clones dos genes da miostatina, miogenina, MRF4 e Myf5.....	44
9 Pares de primers testados na otimização de PCR do gene MRF4 para genotipagem.....	54
10 Pares de primers testados na otimização de PCR do gene Myf5 para genotipagem.....	57
11 Genes e respectivos loco selecionados para a etapa de genotipagem.....	61

12	Correlações fenotípicas entre PV42 e características de desempenho de 2063 aves da geração F2 do cruzamento TC.....	62
13	Correlações fenotípicas entre PV42 e características de carcaça de 2063 aves da geração F2 do cruzamento TC.....	62
14	Frequências alélicas e probabilidades do teste qui-quadrado para cada loco genotipado.....	63
15	Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos 96 animais das famílias informativas.....	64
16	Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos 96 animais por família.....	65
17	Frequência de genótipos na amostra para um total de 86 observações válidas para os genes da miostatina, miogenina e MyoD.....	66
18	Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco A4938G do gene da miostatina.....	68
19	Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco D6619-6631 do gene MyoD.....	69
20	Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco T455C do gene da miogenina.....	70
21	Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV) e coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo multigênico.....	72

INVESTIGAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES DOS FATORES MIOGÊNICOS E MIOSTATINA COMO MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS EM *Gallus gallus*

Autor: CARLA DOS ANJOS DE SOUZA

Orientador: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar polimorfismos em cinco genes candidatos (MyoD, Myf5, miogenina, MRF4 e miostatina) que atuam no desenvolvimento muscular de galinhas, e avaliar os efeitos de suas variantes alélicas sobre características quantitativas de crescimento e desenvolvimento muscular. Os genes MyoD e Myf5 são essenciais para a determinação da linhagem miogênica de células precursoras das fibras musculares na etapa inicial da miogênese, enquanto que a miogenina e MRF4 são requeridos na diferenciação final destas células. A miostatina por sua vez, atua como um potente regulador negativo do crescimento muscular esquelético durante a miogênese, persistindo por toda a fase adulta. Os produtos amplificados dos cinco genes foram clonados e seqüenciados a partir de *pools* de DNA dos parentais de duas linhagens divergentes desenvolvidas pela Embrapa - Suínos e Aves, uma de corte (TT) e outra de postura (CC). Os polimorfismos identificados foram validados e genotipados em uma população experimental F2, originada do cruzamento entre machos da linhagem TT e fêmeas da linhagem CC. Para avaliação dos efeitos dos polimorfismos sobre características quantitativas foram genotipados os genes da

miostatina, miogenina e MyoD. Os polimorfismos dos genes da miostatina e MyoD não apresentaram efeito sobre nenhuma das características avaliadas. Dentre os sítios polimórficos detectados no gene da miogenina, um identificado como T455C apresentou associação estatisticamente significativa com as características: peso vivo ao 42 dias ($P = 0,0263$), ganho de peso do nascimento aos 42 dias de idade ($P = 0,0291$), ganho de peso dos 35 aos 42 dias de idade ($P = 0,0368$), peso da carcaça ($P = 0,0245$), peso das asas ($P = 0,0099$) e da carcaça residual ($P = 0,0056$), peso da gordura abdominal ($P = 0,0320$), do fígado ($P = 0,0373$) e do pulmão ($P = 0,0262$). Novas investigações poderão ser feitas no intuito de validar este polimorfismo como possível marcador genético para seleção de aves com maior capacidade de desenvolvimento muscular. Embora inúmeros polimorfismos tenham sido detectados nos genes Myf5 e MRF4, não foi possível estabelecer condições ideais para realização da genotipagem destes genes.

INVESTIGATION OF POLYMORPHISMS OF MYOGENIC FACTORS AND MYOSTATIN GENES AS MOLECULAR MARKERS FOR QUANTITATIVE TRAITS IN *Gallus gallus*

Author: CARLA DOS ANJOS DE SOUZA

Adviser: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

SUMMARY

The aim of this work was to identify polymorphisms in five candidate genes (MyoD, Myf5, Myogenin, MRF4 and Myostatin) which act in chicken muscle development and evaluate the effects of its allelic variants on growth and muscle development quantitative traits. MyoD and Myf5 are essential for the determination of the myogenic lineage of muscle precursor cells in early stages of myogenesis, whereas myogenin and MRF4 are required for the final differentiation of these cells. Myostatin acts as a potent negative regulator of skeletal muscle growth during myogenesis and continues to be expressed in adult animals. PCR products of these five genes were cloned and sequenced from DNA *pools* of parental individuals from two distinct lineages developed by Embrapa - Suínos e Aves, a broiler sire line (TT) and a layer line (CC). The polymorphisms identified were validated and genotyped in a F2 experimental population originated from a crossing of TT line sires and CC line dams. Polymorphisms of Myostatin, Myogenin and MyoD genes were genotyped to evaluate their effects on quantitative traits. The effects of Myostatin and MyoD polymorphisms were not significant on any traits. Among the polymorphic sites detected in the

myogenin gene one, identified as T455C, was significantly associated with the following traits: body weight at 42 days of age ($P = 0,0263$), body weight gain between birth and 42 days of age ($P = 0,0291$), body weight gain between 35 and 42 days of age ($P = 0,0368$), carcass weight ($P = 0,0245$), weight of drums ($P = 0,0099$), residual carcass ($P = 0,0056$), abdominal fat ($P = 0,0320$), liver ($P = 0,0373$) and lungs ($P = 0,0262$). New investigations should be conducted to validate this polymorphism as a possible genetic marker for selection of chickens with increased muscle development potential. Although many polymorphisms were detected in Myf5 and MRF4 genes, it was not possible to establish ideal conditions for their genotyping.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é uma das mais competitivas no comércio mundial, superando em vários aspectos países cuja produção é subsidiada pelo governo local, segundo o último relatório publicado pela Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango (ABEF, 2003). Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de frangos em volume, e o primeiro exportador mundial em receita cambial. Poucos produtos na pauta de exportação brasileira apresentam desempenhos tão significativos, sendo este o terceiro maior produto de exportação do agronegócio brasileiro. Este resultado se deve à agressividade comercial da avicultura de exportação do Brasil, que oferece o menor custo de produção do mundo, sendo o mais eficiente produtor mundial segundo a IFC (*International Finance Corporation*) (ABEF, 2003). Dentre as principais vantagens competitivas da avicultura brasileira, está o desempenho dos produtores e da indústria, que têm recebido contribuições relevantes dos programas de melhoramento genético, os quais tem alcançado com sucesso tanto a demanda do mercado quanto da indústria. Entretanto, para que o nível de competitividade seja mantido no mercado, será imprescindível a incorporação de novas técnicas como ferramentas nos programas tradicionais de melhoramento genético para que maiores progressos sejam obtidos.

Durante as últimas décadas, os programas de seleção na avicultura, tanto de corte quanto de postura, apresentaram um progresso espetacular: a produção de ovos (número de ovos/galinha/ano) foi triplicada e a taxa de crescimento em aves de corte para alcançar 1,5 kg de peso vivo, foi quadruplicada durante este período (Burt, 2002). Entretanto, este progresso genético possui limites e acredita-se que sejam alcançados nos próximos 20 anos (Burt, 2002). Sendo assim, a indústria avícola deverá se adaptar

às novas demandas do mercado consumidor e dos produtores, buscando oferecer produtos de melhor qualidade bem como a reduzir os custos de produção (Burt, 2002).

Dentro deste contexto, a pesquisa genômica na avicultura tem sido alvo de estudos intensos, uma vez que possibilita a identificação de marcadores genéticos distribuídos por todo genoma, os quais podem ou não estar envolvidos na expressão de características de interesse econômico (Burt, 2002). Uma das principais metas tem sido a identificação de locos que controlam características quantitativas, sendo a análise de genes candidatos uma das abordagens mais utilizadas para este fim (Rothschild & Soller, 1999).

Atualmente pode-se encontrar na literatura uma série de estudos realizados com aves, voltados para a identificação de marcadores em genes candidatos. Nos genes GH, GHR, IGF, foram identificados marcadores associados à características de produção (Kuhlein et al. 1997; Feng et al., 1997; Nagaraja et al., 2000; Amills et al., 2003); nos genes GNRHR e NPY, associados a características reprodutivas (Dunn et al., 2004); e em uma série de genes envolvidos em mecanismos de resistência a *Salmonella enteritidis* (Malek & Lamont, 2003; Kramer et al., 2003). Tendo em vista que o principal produto final na produção de frangos de corte é o tecido muscular, o número limitado de resultados na linha de pesquisa de marcadores em genes envolvidos diretamente no seu desenvolvimento propõe uma infinidade de estudos a serem realizados.

No final da década de oitenta, quatro genes responsáveis por promover a determinação e diferenciação das células musculares foram identificados e isolados: MyoD (Davis et al., 1987), Myf5 (Braun et al., 1989), miogenina (Edmonson & Olson, 1989; Wright et al., 1989) e MRF4 (Rhodes & Konieczny, 1989). Os fatores de transcrição codificados por estes genes são também denominados Fatores Regulatórios da Miogênese (MRF) e são capazes de desencadear a conversão de fibroblastos totipotentes em fibras musculares, pela ativação de genes músculo-específicos durante o desenvolvimento embrionário (revisado por Perry & Rudnicki, 2000 e Pownall et al., 2002). Os genes MyoD e Myf5 atuam na determinação da linhagem miogênica de células precursoras na etapa inicial do desenvolvimento muscular, apresentando

algumas funções redundantes, enquanto que a miogenina e MRF-4 são requeridos para a diferenciação bioquímica e morfológica para a maturação do tecido muscular esquelético (Perry & Rudnicki, 2000).

A miostatina, um novo membro da família TGF- β recentemente descrito por McPherron et al. (1997) em camundongos, tem se revelado um dos fatores mais relevantes para a regulação da formação da massa muscular, durante o desenvolvimento e crescimento do animal. Esta proteína atua como um potente regulador negativo do crescimento muscular esquelético, inibindo a proliferação de mioblastos durante a miogênese (Thomas, 2000).

A maioria das características quantitativas é determinada por muitos genes, cada um contribuindo com um pequeno efeito, entretanto alguns destes genes podem apresentar maior importância no controle de determinada característica quantitativa do que outros (Rothschild & Soller, 1999). Dentre as características quantitativas de maior interesse na avicultura de corte estão as de desempenho e carcaça, as quais estão relacionadas diretamente à capacidade de desenvolvimento muscular dos animais. Com base no exposto acima, o objetivo geral do presente estudo foi detectar polimorfismos em cinco genes candidatos (MyoD, Myf5, miogenina, MRF4 e miostatina) que atuam no desenvolvimento muscular de galinhas, em duas linhagens de composições genéticas distintas, uma de corte (TT) e outra de postura (CC); avaliar os efeitos das variantes alélicas sobre características de crescimento e desenvolvimento muscular em uma população experimental F2, proveniente do cruzamento das linhagens TT e CC; e investigar os efeitos de substituição alélica e interação entre os fatores miogênicos estudados sobre o fenótipo dos indivíduos da geração F2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biotecnologia na avicultura

A maior parte das organizações de melhoramento animal no mundo estão ativamente envolvidas em empregar ferramentas emergentes da análise genômica, para obter uma melhor compreensão da arquitetura molecular das características de produção (Georges, 2001). Na avicultura, a pesquisa genômica tem sido alvo de intensos estudos, dos quais se destacam: o isolamento e mapeamento de marcadores genéticos (crucial para o mapeamento de todo o genoma), o mapeamento de QTL, a identificação de genes candidatos e a descoberta de novos genes (Burt, 2002).

Na última década, um importante avanço na pesquisa genômica de galinhas foi a construção do mapa genético consenso, baseado nos mapas das populações referência de *East Lansing* (Bumstead & Palyga, 1992), *Compton* (Crittenden et al., 1993) e *Wageningen* (Groenen et al., 1998). Neste mapa, foram mapeados 1.965 marcadores em 50 grupos de ligação, cobrindo aproximadamente 4000 cM (Groenen et al., 2000). O genoma da galinha compreende 39 pares de cromossomos, sendo um par de cromossomos sexuais Z e W, e 38 pares de autossomos. Dentre eles, oito pares incluindo Z e W, são macrocromossomos citologicamente distintos, e os demais são pares de microcromossomos citologicamente indistinguíveis (Ladjali-Mohammedi et al., 1999). Pesquisas abordando a integração dos mapas genéticos e citogenéticos têm sido realizadas pela técnica de hibridização *in situ* com a utilização de clones BAC e PAC, incluindo marcadores localizados em macro e microcromossomos (Morrisson et al. 1998; Smith et al., 2000).

Certamente o maior avanço obtido até o momento foi a recente divulgação do seqüenciamento do genoma de galinha pelo *Washington U. Genome Sequencing Center* (WUGSC) e *National Human Genome Research Institute*, cuja montagem inicial foi baseada na cobertura de 6,6 vezes a seqüência do genoma (POULTRY GENOME NEWSLETTER, 2004). A identificação dos *contigs* ainda está em andamento e as seqüências depositadas já se encontram disponíveis nos bancos de dados do *GenBank*, *EMBL-bank* e *DDBJ*.

Embora as pesquisas em genômica funcional sejam mais recentes, cerca de 600.000 seqüências expressas ou EST (*Expressed Sequence Tag*) foram identificadas em uma variedade de tecidos de galinha e já se encontram disponíveis em bancos de dados na Internet (Vignal, 2004). Dentre estas seqüências, o Laboratório de Biotecnologia Animal - ESALQ/USP contribuiu com o seqüenciamento de aproximadamente 13.000 EST no banco de dados do NCBI, identificadas na hipófise (acesso c0419474-c0421626), hipotálamo (c042127-c0423759), tecido muscular dos membros (cd760792-cd765430) e peitoral (c0502869-c0507803). A maior contribuição até o momento, anunciada pelo *European Union Consortium*, foi o seqüenciamento de 339.314 EST de galinha de uma variedade de tecidos de embriões e aves adultas (Boarman et al., 2002).

Os resultados obtidos com o mapeamento de QTL, em conjunto com o seqüenciamento do genoma e os estudos de expressão gênica poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos nas variações fenotípicas de características de importância econômica (Vignal, 2004). A genética molecular aliada à genética quantitativa pode tornar mais eficientes as estratégias convencionais de seleção, de modo a aumentar a acurácia, promovendo maiores progressos genéticos no curto prazo.

Uma das maiores metas da pesquisa genômica na avicultura tem sido o mapeamento e identificação de locos que controlam características quantitativas (QTL-*Quantitative Trait Loci*), cuja detecção pode ser realizada através da análise de todo o genoma utilizando-se marcadores microssatélites (Anderson et al., 1994) ou pela análise de genes candidatos (Rothschild & Soller, 1999). As informações provenientes da

genética molecular podem ser usadas para implementar estratégias de melhoramento através da seleção assistida por marcadores (MAS – *Marker Assisted Selection*). Esta por sua vez, pode ser utilizada em conjunto com a seleção fenotípica na introgressão de determinada característica de uma população para outra, mantendo as características desejáveis da população receptora e também na predição do desempenho e heterose da progênie resultante de cruzamentos (Dekkers & Hospital, 2002).

2.2 Genes candidatos

Genes candidatos são genes já sequenciados, de ação biológica conhecida que estão envolvidos com o desenvolvimento ou fisiologia de determinada característica. Estes genes podem ser estruturais, regulatórios ou que participam de vias metabólicas, afetando a expressão do caráter (Bryne & McMullen, 1996). O estudo de genes candidatos envolve uma série de etapas: escolha do gene, desenho de *primers* para amplificação, descoberta de polimorfismos, estabelecimento da técnica de genotipagem dos sítios polimórficos, formação de uma população referência para genotipagem e finalmente realização dos testes de associação com características fenotípicas desta população.

A técnica do gene candidato é uma forma abrangente de se pesquisar o genoma, uma vez que o gene é escolhido baseado em evidências de que o peptídeo que ele codifica tem efeito biológico ou fisiológico na característica de interesse. Nesta metodologia, é assumida a hipótese de que uma proporção significativa do QTL, o qual afeta a variação fenotípica de uma característica em uma dada população, na realidade corresponde a genes associados a estas características (Rothschild & Soller, 1999).

O processo de identificação de QTL por meio de genes candidatos, baseia-se na detecção de polimorfismos conhecidos como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) que possam estar associados com características de interesse, através de uma análise estatística apropriada, utilizando-se dados provenientes de uma amostra de população referência. Nesta metodologia os polimorfismos podem ser revelados por diversas técnicas, dentre elas a digestão com enzima de restrição e o sequenciamento automático.

A técnica de PCR-RFLP para identificação de polimorfismos tem sido utilizada em grande parte dos trabalhos publicados com genes candidatos e tem apresentado bons resultados.

Dentre as vantagens da análise de genes candidatos, estão o maior poder estatístico, obtido com menor número de famílias e indivíduos, quando comparada com análises de mapas ligação, a ampla aplicabilidade, uma vez que podem ser estudados em uma única geração, o baixo custo dos procedimentos de genotipagem em larga escala, e a simplicidade operacional, pois se pode trabalhar com um único gene e não com um genoma por inteiro (Rothschild & Soller, 1999). Finalmente, uma vez validado, o polimorfismo do gene candidato pode ter utilização imediata na seleção assistida por marcadores na população testada (Rothschild & Soller, 1999).

As limitações desse procedimento são o pequeno número de genes conhecidos que controlam características de interesse, o efeito pleiotrópico e de epistasia de outros genes sobre o gene candidato, o alto custo da etapa inicial de detecção de polimorfismos e a dificuldade no estabelecimento definitivo do efeito do gene candidato (Rothschild & Soller, 1999). Além destes, o efeito de interação entre genótipo e ambiente também exerce grande influência. Até que se estabeleça a variante causal do gene responsável pelo seu efeito quantitativo, sempre haverá a possibilidade de que o gene estudado não seja o gene que realmente esteja causando a diferença na característica, mas esteja somente ligado ao QTL (Rothschild & Soller, 1999). Isso pode levar a resultados contraditórios, dependendo da população estudada, pois associações significativas em uma população podem não ser verificadas em outras. Por exemplo, em estudos realizados por Linville et al. (2001) não houve associação significativa dos marcadores dos receptores do estrogênio (ESR) e da prolactina (PRLR), com o tamanho da leitegada em suas populações de suínos, enquanto que associação significativa foi observada anteriormente nas populações utilizadas por Short et al. (1997) e Vincent et al. (1998).

O poder estatístico do teste de associação neste tipo de análise é maior quando regiões polimórficas usadas para genotipar o gene candidato estão em completo desequilíbrio de ligação, causando variação na função do gene candidato, isto é na sua

região funcional (Rothschild & Soller, 1999). Segundo estes autores, as análises de genes candidatos, aplicadas dentro de uma população experimental, proveniente do cruzamento entre duas linhagens divergentes, irá gerar desequilíbrio de ligação envolvendo grande blocos de cromossomos contendo centenas de genes, o que permitirá a análise das regiões polimórficas e sua associação a características fenotípicas.

Em aves, genes candidatos para algumas mutações foram identificados ou sugeridos por estudos genéticos ou fisiológicos, por ocasionarem alterações morfológicas, possibilitando a compreensão do vínculo existente entre o fenótipo e o genótipo (Tixier-Boichard, 2000). Nestes estudos, foi observado que algumas mutações em genes específicos ocasionavam defeitos moleculares, indicando que alguns genes estariam desempenhando papel crucial no fenótipo, independente da complexidade da função (Tixier-Boichard, 2000). Uma das primeiras descobertas foi o gene recessivo do nanismo ligado ao sexo (Dw), descrito em uma variedade de linhagens de galinhas (Hutt, 1959). Estudos extensos sobre o desempenho, fisiologia e endocrinologia de aves anãs sugeriram que o receptor do hormônio do crescimento GHR, mapeado no cromossomo Z, poderia ser o gene candidato, o que levou à identificação de três diferentes mutações neste gene (Tixier-Boichard, 2000).

Outros genes candidatos para algumas mutações em aves foram revelados da mesma forma, como por exemplo a deleção de seis bases no gene da tirosinase, a qual foi relacionada com o albinismo (Tobita-Teramoto et al, 2000), e o receptor da rianodina (RYR1), associado ao “*crooked neck dwarf*”, cuja mutação causa severa malformação da musculatura esquelética, levando ao desenvolvimento embrionário anormal (Groenen et al., 2000).

Alguns exemplos de estudos realizados sobre a associação de marcadores em genes candidatos com características de produção e resistência à doenças estão descritos nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Resultados obtidos pela análise de genes candidatos relacionados à caracteres de produção

Gene	Caracteres avaliados	Caracteres associados	RFLP	Linha	Referência
GH	Idade a 1º postura produção de ovos total Taxa de postura e peso do ovo ^a Gravidade específica	Idade a 1º postura produção de ovos total Taxa de postura	MspI SacI	White Leghorn	Kuhlein et al. 1997
GH	Peso aos 140 dias Idade a 1º postura taxa de produção de ovos	Idade a 1º postura Taxa de postura	MspI	White Leghorn	Feng et al., 1997
GHR	peso do ovo Gravidade específica	-----	SacI		
IGF-I	Idade a 1º postura taxa de produção de ovos Peso corporal consumo Peso do ovo Gravidade específica Peso da casca do ovo	Peso do ovo Gravidade específica Peso da casca do ovo	PstI	White Leghorn	Nagaraja et al., 2000
IGF-1	Peso corporal Ganho de peso médio Consumo	Ganho de peso médio ^b Eficiência alimentar ^b	HinfI	Black Penedese nca	Amills et al., 2003
IGF-2	Eficiência alimentar	-----	Hsp 92 II		

^a Cosseleccionados para resistência a leucose aviária e doença de Marek.

^b Estatisticamente significativo dentro de uma linhagem.

Tabela 2. Resultados obtidos pela análise de genes candidatos envolvidos nos mecanismos imunológicos relacionados à resistência a inoculação de *Salmonella enteritidis*

Gene	Caracteres avaliados	Caracteres associados	RFLP	Linha	Referência
INOS	C. de bactérias baço ^a	-----	AluI	Fayoumi	Malek & Lamont, 2003
TRAIL	C. de bactérias ceco ^a	C. de bactérias baço ^a	StyI	X	
	Nível de anticorpos	C. de bactérias ceco ^a		MHCLeghorn	
TGF-β2	após a vacina	-----	RsaI		
TGF-β3		C. de bactérias ceco ^a	BsrI		
IgL		C. de bactérias fígado ^a	Sau96I		
SLC11A	C. de bactérias baço ^a	C. de bactérias ceco ^a	SacI	Old Dutch	Kramer et al., 2003
1	C. de bactérias ceco ^a	C. de bactérias fígado ^a		Breed	
IAP1	C. de bactérias fígado ^a	C. de bactérias ceco ^a	BglI		
PSAP		C. de bactérias ceco ^a	TfI		
CASP		C. de bactérias ceco ^a	Hsp92 II		
		C. de bactérias fígado ^a			
INOS		C. de bactérias ceco ^a	AluI		
IFNG		-----	Tsp509		
IL2		C. de bactérias ceco ^a	MnI		
		C. de bactérias fígado ^a			
IgL		C. de bactérias ceco ^a	Sau96 I		
		C. de bactérias fígado ^a			
ZOV3		-----	SnaBI		
TGF-β2		C. de bactérias ceco ^a	RsaI		
TGF-β3		C. de bactérias baço ^a	BsrI		
TGF-β4		C. de bactérias ceco ^a	MboII		
		C. de bactérias fígado ^a			
TLR4	C. de bactérias baço ^a	-----	Sau96I	Fayoumi	Malek et al., 2003
CD28	C. de bactérias ceco ^a	C. de bactérias ceco ^a	RsaI	MHCLeghorn	
	Nível de anticorpos	Nível de anticorpos			
	após a vacina	após a vacina			
MIF		-----	-----		
MD-2		C. de bactérias baço ^a	AseI		
LITAF		-----	HinfI		

^a Carga de bactérias após inoculação com *Salmonella enteritidis*.

O estudo de genes candidatos é amplamente aplicado também a outras espécies. Em suínos, polimorfismos identificados no gene do halotano relacionado com a incidência de PSE (*Pale, Soft and Exudative Meat*), são rotineiramente usados como marcadores em programas na seleção (De Vries et al., 1998). A identificação de um

alelo dominante no gene RN⁺ também foi relacionado com a redução da qualidade de carne em suínos, uma vez que caracteriza a incidência de fibras brancas glicolíticas de contração rápida (De Vries et al., 1998). Em bovinos, deleções no gene da miostatina foram associadas com a formação da musculatura dupla nas raças Belgian Blue e Piamontesa (McPherron & Lee, 1997; Grobet *et al.* 1997). Estes resultados indicam que determinados genes possuem maior relevância no fenótipo de algumas características, apesar da complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos na sua fisiologia.

2.3 Marcadores SNPs

Como sugerido pela sigla, um marcador SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) é caracterizado por uma única substituição de base na seqüência de DNA, com a alternativa usual de dois possíveis nucleotídeos em uma dada posição (Vignal et al., 2002). Para que tal posição seja considerada como um SNP, assume-se que o alelo menos freqüente tenha abundância acima de 1%. A princípio, os SNPs podem ser polimorfismos bi-, tri-, ou tetralélicos, entretanto na prática são em geral bialélicos (Brookes, 1999). Os SNPs podem ser classificados como sinônimos (sSNP), quando não implicam em substituição de aminoácidos, e não-sinônimos quando causam alterações na seqüência de aminoácidos (nSNP). Milhares destes marcadores já foram identificados em galinhas, detectados em seqüências EST e se encontram depositados no banco de dados do NCBI.

Os mecanismos de mutação resultam tanto em transições: substituições purina-purina ($A \Leftrightarrow G$) ou pirimidina-pirimidina ($C \Leftrightarrow T$); como em transverções: substituições purina-pirimidina ou pirimidina-purina ($A \Leftrightarrow C$, $A \Leftrightarrow T$, $G \Leftrightarrow C$, $G \Leftrightarrow T$). O grande número de SNPs caracterizados por substituições $C \Leftrightarrow T$ e $G \Leftrightarrow A$, pode ser explicado pela alta taxa de reação de desaminação espontânea da 5-metilcitosina (5mC) para timidina, que são conhecidas por ocorrer freqüentemente em dinucleotídeos CpG (Cooper e Krawzack, 1989). Alguns autores consideram inserções e deleções de pares de base (indels) como SNPs, embora certamente ocorram por um mecanismo diferente (Vignal et al., 2002).

Recentemente os marcadores SNPs têm sido utilizados com uma nova abordagem na pesquisa genômica aplicada ao melhoramento: na identificação de genes candidatos em pesquisas de mapeamento de QTL. Uma vez que o genoma possui o potencial para fornecer milhares de marcadores SNPs em alta densidade e distribuídos homogeneamente em todos os cromossomos, é possível melhorar a resolução dos mapas de ligação para identificação de QTL já realizada com marcadores microssatélites, permitindo o mapeamento de genes candidatos. A descrição da arquitetura genética de características quantitativas não está completa até que se possa especificar quais sítios polimórficos em um gene correspondem ao QTL que de fato seja a causa da diferença no fenótipo da característica. Estes sítios caracterizados por SNPs são denominados QTNs (*Quantitative Trait Nucleotides*) (Mackay, 2001). Se os genótipos de todos os sítios polimórficos na região de interesse são determinados, um deles deve corresponder ao sítio que ocasiona o efeito fenotípico. Os mesmos métodos utilizados no mapeamento de desequilíbrio de ligação para a identificação de genes candidatos podem ser usados também para determinar quais dos sítios polimórficos no gene candidato está associado com o fenótipo da característica quantitativa (Mackay, 2001).

2.4 Formação da fibra muscular

A miogênese esquelética é iniciada no embrião como resultado de uma intrincada rede de sinais provenientes de estruturas adjacentes, as quais especificam o destino miogênico de células precursoras musculares (Buckingham, 2001). Mediante estes sinais, células precursoras de origem mesodérmica ativam o programa miogênico, sendo capazes de proliferar e estabelecer um *pool* de células denominadas mioblastos. Sinais específicos levam os mioblastos a saírem do ciclo celular, e darem início à etapa de diferenciação, através da síntese de proteínas músculo-específicas. Por fim, os mioblastos diferenciados se fundem formando miotubos multinucleados, os quais darão origem às fibras musculares (Rehfeldt et al., 2000). Durante a miogênese, os miotubos se desenvolvem em duas fases temporariamente distintas. As miofibras primárias se formam na primeira onda de diferenciação, durante os estágios iniciais de fusão dos

mioblastos, fornecendo um arcabouço para a ampla população de fibras secundárias menores. Estas, por sua vez se formam a partir dos mioblastos fetais durante a segunda onda de diferenciação (Rehfeldt et al., 2000, Picard et al., 2002).

2.5 Origem Embriológica da Musculatura Esquelética

A musculatura esquelética dos vertebrados se origina do mesoderma paraxial do embrião durante a gastrulação, o qual pode ser dividido em: mesoderma paraxial não segmentar, somitos e placa segmentar. O mesoderma da placa segmentar surge com a invaginação do epiblasto a partir do nó de Hensen, ao longo da linha primitiva. À medida que esta regride, novas células mesenquimais são adicionadas continuamente à extremidade caudal da placa segmentar, entre os estágios 4 e 15 (Hamburger & Hamilton, 1951). Com exceção dos músculos da cabeça, todos os demais músculos esqueléticos de vertebrados são derivados dos somitos, os quais dão origem à musculatura axial, do tronco e dos membros (Ludolph & Konieczny, 1995). Os somitos são blocos de células mesenquimais, originadas do mesoderma paraxial bilateral, os quais se encontram dispostos sequencialmente em ambos os lados das estruturas axiais do embrião, o tubo neural e a notocorda (Ludolph & Konieczny, 1995; Christ & Ordahl, 1995, Buckingham et al. 2000). Os pares de somitos são formados na extremidade rostral da placa segmentar, sendo que a maturação ocorre no sentido crânio-caudal do embrião em um processo contínuo (Stockdale et al., 2000). Como consequência, somitos em diferentes etapas de maturação estão presentes em todos os estágios de desenvolvimento do embrião.

O futuro somito começa a sofrer compartimentalização antes mesmo de emergir da extremidade rostral da placa segmentar, quando a maior parte destas células se torna densamente empacotada e polarizada (com exceção das células localizadas centralmente, que irão ocupar o lúmen do somito), sugerindo uma transição mesênquima-epitélio que ocorre à medida que os somitos se formam (Stockdale, 2000).

A maturação do somito recém formado (figura 1) denominado somito epitelial, é caracterizada por mudanças na organização, determinação e diferenciação das células

dos somitos, ao longo de três eixos principais do embrião: dorso-ventral, médio-lateral e rostro-caudal (Pourquié, 2001; Stockdale, 2000). Após o brotamento, a porção ventral do somito epitelial sofre uma nova transição epitélio-mesênquima para formar o esclerótomo, cujas células são precursoras dos ossos e cartilagens, que darão origem ao esqueleto axial e às costelas. A porção dorsal do somito, agora chamada dermomiótomo, mantém sua natureza epitelial e suas células darão origem aos músculos esqueléticos, à derme e aos derivados vasculares (Stockdale, 2000). Conforme a maturação do somito progride, o dermomiótomo se estende lateralmente dorso e ventralmente, dando origem a dois subdomínios: o epaxial, na região dorso-medial adjacente ao tubo neural, e o hipaxial, na região da borda ventro-lateral (Stockdale, 2000; Buckingham, 2003).

O miótomo dá origem a todos os músculos epaxiais do embrião de vertebrados (Stockdale, 2000). Suas células são derivadas do lábio dorso-medial (LDM) e ventro-lateral (LVL) do dermomiótomo, que delaminam e translocam para a região ventral do dermomiótomo (Denetclaw & Ordahl, 2000) em resposta a uma complexa rede de sinais procedentes de estruturas adjacentes incluindo o tubo neural, a notocorda, a superfície da ectoderme e o mesoderma intermediário e lateral (Arnold & Braun, 2000). Esta delaminação é seguida por uma migração longitudinal de células para as bordas rostral e caudal do dermomiótomo, local onde se diferenciam (Cinnamon et al., 2001).

Figura 1 - Maturação do somito epitelial. A figura ilustra a subdivisão do somito em compartimentos: o esclerótomo, o dermomiótomo e seus subdomínios e o miótomo, originado pela migração das células do dermomiótomo epaxial e hipaxial, durante e após o processo de brotamento da placa segmentar

Fonte: adaptada de Gilbert (2003)

Os músculos dos membros são formados por células derivadas do dermomiótomo hipaxial de somitos localizados próximos aos primórdios dos pares de membros. Nestas regiões, células progenitoras do epitélio do dermomiótomo hipaxial, delaminam e migram para os primórdios dos membros, onde as massas musculares dorsais e ventrais serão formadas (Brand-Saberi & Christ, 1999; Buckingham et al., 2003). Uma vez no membro, as células precursoras dos somitos seguem um destino exclusivamente miogênico, onde continuam a proliferar e posteriormente se diferenciar, uma vez que qualquer área de brotação do membro contém sinais que induzem a miogênese em células provenientes dos somitos (Christ & Brand-Saberi, 2002).

2.6 Fatores regulatórios da miogênese

Fatores miogênicos são fatores de transcrição que quando expressos, são capazes de desencadear a conversão de fibroblastos totipotentes em fibras musculares, pela ativação de genes-músculo específicos durante o desenvolvimento embrionário. A formação de células altamente especializadas, como as fibras musculares esqueléticas, requer a correta combinação da expressão espacial e temporal de uma série de genes reguladores e músculo-específicos (Ludolph e Konieczny, 1995). Este processo envolve a determinação e a proliferação de linhagens miogênicas de células precursoras (mioblastos), e subsequente diferenciação, caracterizada pela interrupção do ciclo celular, síntese de proteínas músculo-específicas e fusão de mioblastos em células multinucleadas.

As primeiras evidências sobre a descoberta dos fatores miogênicos foram obtidas em experimentos realizados em uma linha de células tronco do mesoderma C3H10T $\frac{1}{2}$, que crescem como fibroblastos em cultura. Foi observado que estas células têm a capacidade de se converter em mioblastos quando brevemente expostas ao agente desmetilante 5-azacitidina durante a divisão celular (Taylor & Jones, 1979). Este agente possui estrutura similar a citidina, porém contém um átomo de nitrogênio em lugar do carbono 5 do anel da base nitrogenada, posição onde ocorre a maior parte dos eventos de metilação de DNA. Desta forma, o DNA replicado das gerações seguintes de células C3H10T $\frac{1}{2}$, incorpora 5-azacitidina e não pode ser metilado, uma vez que não é substrato para metilases, desencadeando o programa miogênico, com uma frequência de conversão acima de 50% (Taylor & Jones, 1979).

Com base nesta descoberta, Davis et al. (1987) realizaram um estudo em bibliotecas de cDNA obtidas por hibridização subtrativa de células tratadas e não tratadas com 5-azacitidina, no qual identificaram e isolaram o primeiro fator miogênico, denominado MyoD. Subseqüentemente, outros três fatores, capazes de gerar o fenótipo de músculo esquelético quando superexpressos em fibroblastos 10T $\frac{1}{2}$ ou em várias outras linhagens de células, foram identificados em experimentos similares: miogenina (Edmonson & Olson, 1989; Wright et al., 1989), Myf5 (Braun et al., 1989), e MRF4

(Rhodes & Konieczny, 1989). O último foi independentemente isolado como *Herculina* (Miner & Wold, 1990), e *Myf-6* em humanos (Braun et al., 1990).

O gene MyoD da galinha está localizado no cromossomo 5, possui 7376 pares de bases incluindo a região promotora, três exons e dois introns. Sua sequência nucleotídica completa está disponível no banco de dados do NCBI sob os acessos L34006 e GeneID-374048. O gene da miogenina da galinha está localizado no cromossomo 32 e parte de sua sequência nucleotídica se encontra disponível no banco de dados do NCBI, sob o acesso GeneID-374004. O fragmento de cDNA clonado por Fujisawa-Sehara et al. (1990) está despositado sob o número de acesso D90157. O gene Myf5 está localizado no cromossomo 1 e parte de sua sequência, incluindo um total de 1609 pares de bases envolvendo três exons e dois introns, está disponível no banco de dados do NCBI sob o acesso X73250 e GeneID-395633. O gene MRF4 também está localizado no cromossomo 1 próximo ao gene Myf5 e parte de sua sequência está disponível sob o acesso GeneID-LOC417873. O fragmento de cDNA clonado por Fujisawa-Sehara et al. (1990) está despositado sob o número de acesso D10599.

2.6.1 Propriedades estruturais das proteínas MRF

Os Fatores Regulatórios da Miogênese (MRFs), também conhecidos como membros da família MyoD de fatores miogênicos, são fosfoproteínas nucleares estruturalmente semelhantes, as quais compartilham duas regiões funcionais de homologia: um domínio básico, caracterizado por uma sequência de aminoácidos positivamente carregados, e o domínio hélice-alça-hélice (HLH, *helix-loop-helix*) caracterizado por duas α -hélices anfipáticas, separadas por uma alça de tamanho variável (Ludolph & Konieczny, 1995). Devido à presença destes dois domínios, estas proteínas também são chamadas de proteínas básicas HLH (figura 2).

Figura 2 - Alinhamento das seqüências traduzidas dos genes da família MyoD de *Gallus gallus*, realizado pelo *ClustalW multiple sequence alignment* (www.ebi.ac.uk/clustalw). Vermelho - resíduos hidrofóbicos e aromáticos; azul – resíduos negativamente carregados; magenta - resíduos positivamente carregados; verde – outros resíduos polares. (*) - Os resíduos nessa coluna são idênticos em todas as seqüências do alinhamento; (:) – substituições conservadas identificadas por letras da mesma cor; (.) – substituições semi-conservadas

O domínio básico media a ligação entre o fator miogênico e uma sequência de DNA específica (CANNTG), conhecida como E-box, presente em regiões promotoras e ou *enhancers* de vários genes músculo-específicos (Weintraub et al., 1991; Sabourin & Rudnicki, 2000). A eficiente interação entre os fatores miogênicos e o DNA é alcançada pela heterodimerização destes com outras proteínas bHLH não miogênicas da família de proteínas ubíquas-E, tais como E12, E47, HEB e ITF (Puri & Sartorelli, 2000). A formação do heterodímero ocorre através do domínio HLH, presente em ambas as proteínas. O domínio bHLH é altamente conservado entre os MRFs, enquanto que as extremidades amino e carboxil terminais apresentam homologia limitada como observado na figura 2, sugerindo que estes fatores podem exercer funções redundantes durante o desenvolvimento muscular (Puri & Sartorelli, 2000).

Outros domínios não compartilhados entre os MRF sugerem que estes genes possuem algumas funções específicas. Um exemplo disto são os gene MyoD e Myf5, que possuem domínios funcionais potencialmente envolvidos com a remodelagem da cromatina e na regulação do ciclo celular (Buckingham, 2001).

2.6.2 Expressão espacial e temporal dos fatores miogênicos

Trabalhos sobre expressão gênica dos MRFs, dentre outros genes reguladores, têm sido realizados através da detecção de mRNA em embriões pela utilização de técnicas de hibridização *in situ*, permitindo avaliar o padrão espacial e temporal de expressão destes genes. Esta técnica permitiu a identificação de MRFs expressos especificamente em diferentes linhagens de células dos somitos.

A expressão dos genes da família MyoD é estritamente limitada às células da musculatura esquelética, excluindo músculos lisos e cardíacos. Entretanto, tem sido demonstrado que o gene Myf5 também é expresso no tubo neural em desenvolvimento e domínios definidos do cérebro (Arnold & Braun, 2000).

Em linhagens de células musculares e células primárias em cultura, MyoD e Myf5 são expressos em mioblastos durante a etapa de proliferação e continuam presentes em níveis reduzidos em miócitos diferenciados (Arnold & Braun, 2000). Estes

genes são ativados nas células precursoras do lábio dorso-medial (LDM) e ventro-lateral (LVL) do dermomiótomo, os quais formam os músculos epaxiais e hipaxiais respectivamente. São também ativados nas células precursoras dos músculos hipaxiais, que dão origem aos músculos ventrais do corpo e os músculos dos membros na região dos primórdios (Pownall et al., 2002).

Os fatores miogênicos são expressos sequencialmente ao longo do eixo crânio-caudal do embrião, havendo alguma variação quanto à ordem de expressão destes fatores em diferentes espécies. No momento da formação dos somitos, durante a segmentação, os genes *Myf5* e *MyoD* são expressos nas células progenitoras epaxiais, primeiramente nos somitos occipitais e cervicais, os quais dão origem aos músculos do pescoço, faringe, laringe e língua; e continuam sendo expressos à medida que novos somitos são formados nas regiões dos membros, tronco e cauda, ao longo do eixo axial do embrião (Pownall et al., 2002). Durante a maturação dos somitos, *Myf5* e *MyoD* continuam sendo expressos no LDM, cujas células progenitoras se diferenciam conforme migram ventralmente para formar o miótomo (Borycki et al., 1997).

No LDM dos somitos jovens, os transcritos de *Myf5* e *MyoD* são instáveis e sua expressão continuada requer sinais constantes provenientes do tubo neural e notocorda, para iniciar a diferenciação do miótomo, momento a partir do qual a expressão se torna independente destes sinais (Gustafsson et al., 2002).

Em contraste, a miogenina não está presente nos mioblastos, porém começa a se acumular no princípio da diferenciação, enquanto que o *MRF4* é expresso nas etapas finais da diferenciação se tornando predominante na fase pós-natal e adulta (Arnold & Braun, 2000).

Estas observações levam ao conceito de que *MyoD* e *Myf5* atuam em eventos mais remotos da miogênese, possivelmente na determinação de mioblastos, enquanto que a miogenina, e provavelmente o *MRF4* parecem estar envolvidos no programa de diferenciação terminal das células musculares. Isto tem sido confirmado em experimentos nocaute gênico em camundongos, bloqueando um ou vários membros da família *MyoD* (figura 3). Entretanto deve-se observar que os genes bHLH, os quais atuam na determinação dos mioblastos podem também contribuir para a diferenciação,

quando presentes em altas concentrações. Assim, os processos de determinação e diferenciação não podem ser vistos como dois processos completamente isolados, mas sim como eventos redundantes na formação do músculo (Arnold & Braun, 2000).

Figura 3 - Expressão temporal dos fatores miogênicos durante o desenvolvimento da musculatura esquelética. MyoD e Myf5 atuam na determinação de mioblastos, enquanto que a miogenina, e o MRF4 estão envolvidos no programa de diferenciação terminal das células musculares (Weintraub et al., 1991)

Fonte: <http://www.anslab.iastate.edu/Class/AnS445545X/Somite%20differentiation/Differentiation%20within%20Somites.ppt> (15/08/2004)

2.6.3 Papel funcional dos fatores miogênicos na formação da musculatura esquelética

Estudos *in vitro* sugerem que todos os membros da família MyoD têm propriedades bioquímicas e atividades miogênicas similares, o que dificulta a caracterização da contribuição individual de cada um dos fatores na miogênese. Neste contexto, experimentos de nocaute dos genes da família MyoD possibilitaram a definição da atuação individual dos genes no comprometimento das células precursoras, proliferação de mioblastos e diferenciação terminal, bem como na maturação e regeneração do músculo esquelético sob condições fisiopatológicas. Além disso, a combinação de genes MRFs inativados revelou que algumas de suas funções se sobrepõem, enquanto outras são mais específicas.

MyoD

A inativação do gene MyoD não ocasionou alterações no fenótipo dos camundongos homozigotos mutantes quando comparados ao tipo selvagem durante o desenvolvimento inicial, levando-se em consideração tanto aspectos histológicos como funcionais (Rudnicki et al., 1992). Este resultado sugeriu que a presença da proteína MyoD não é essencial para promover o desenvolvimento normal do músculo esquelético, corroborando com a afirmativa de que algumas funções dos membros da família MyoD são redundantes, tendo em vista suas propriedades estruturais e bioquímicas similares. Os mutantes homozigotos apresentaram níveis normais de transcritos dos genes MRF4 e miogenina, enquanto que os transcritos de Myf5 se apresentaram drasticamente elevados, quando comparados aos do tipo selvagem (Rudnicki et al., 1992).

Posteriormente, Megeney et al. (1996) observaram que mutantes adultos apresentavam déficit na regeneração muscular, indicando que este gene atua também no recrutamento de células satélites após a ocorrência de lesões musculares.

Myf5

Em experimentos realizados por Tajbakhsh et al. (1996a) e Braun et al. (1992), os alelos mutantes do gene *Myf5* foram gerados por recombinação homóloga em camundongos, resultando na formação de uma proteína *Myf5* não funcional. Nos camundongos mutantes homozigotos, houve a formação incompleta das partes distais das costelas, entretanto todos os músculos esqueléticos apresentaram-se morfolologicamente normais. A ausência de uma caixa torácica funcional resultou na morte dos camundongos logo após o nascimento. Segundo este resultado, o gene *Myf5* parece ser dispensável ao desenvolvimento dos músculos esqueléticos, enquanto que exerce papel crucial para a formação das costelas. Visto que as costelas se originam do esclerótomo, e que a expressão do *Myf5* durante a miogênese é limitada à região do miótomo nos somitos, novos estudos realizados por Tajbakhsh et al. (1996b) demonstraram que na ausência da proteína *Myf5* as células do miótomo não se diferenciam e migram do miótomo central para o esclerótomo ventral e o dermatômo dorsal, onde expressam os genes *escleraxis* e *Dermo-1*, comumente expressos em células condrogênicas e epidermais, respectivamente. Este fato indicou que o *Myf5* é essencial na determinação e manutenção das linhagens miogênicas de células multipotentes presentes no miótomo (Arnold & Braun, 2000).

MyoD e Myf5

Embora a inativação dos genes *MyoD* e *Myf5* isoladamente resultem em fenótipos aparentemente normais, a inativação de ambos os genes leva a uma completa ausência de musculatura esquelética em animais mutantes, bem como a ausência de qualquer célula precursora mononucleada (Rudnicki et al., 1993). As regiões de formação de músculo são parcialmente desprovidas de células musculares ou ocupadas por um mesênquima frouxo, o qual se apresenta inteiramente livre de transcritos músculo-específicos e demais fatores miogênicos (Rudnicki et al., 1993). A ausência de miócitos não é restrita aos músculos originados de somitos, mas também envolve aqueles derivados da placa do mesoderma precordial, tais como os músculos extraoculares. Portanto, os genes *MyoD* e *Myf5* são absolutamente essenciais no

estabelecimento e manutenção das linhagens miogênicas de células em todas as partes do corpo, assegurando a formação do tecido muscular esquelético mesmo na ausência de expressão de um destes genes, indicando que tais fatores apresentam funções redundantes (Rudnicki et al., 1993), apesar da distinta expressão temporal nos somitos e em outras regiões.

Miogenina

Camundongos homozigotos mutantes para o gene da miogenina produzem populações normais de mioblastos, mas a diferenciação terminal destes (i.e., formação de músculos funcionais), é ausente. Estes animais nascem imóveis e morrem logo após o nascimento, apresentam malformação das costelas e massa muscular reduzida, resultante da drástica redução da densidade de miofibras, e do grande número de células mononucleadas substituindo a maioria das células musculares maduras (Hasty et al., 1993; Nabeshima et al., 1993).

Após o nascimento, o número total de núcleos em regiões de formação de músculo parece ser o mesmo tanto em homozigotos mutantes como nos tipos selvagens. Entretanto, a maior parte dos genes músculo-específicos não são expressos em mutantes, sugerindo que estes núcleos representam mioblastos indiferenciados, uma vez que expressam níveis normais de MyoD, indicando que a expressão deste é inteiramente independente da expressão da miogenina. Em contraste, a miogenina exerce grande influência sobre a ativação do MRF4, cuja expressão é reduzida em homozigotos mutantes. Sendo assim, a ausência de células musculares diferenciadas pode não estar relacionada unicamente com a ausência da miogenina nos indivíduos mutantes, mas também com a reduzida expressão de MRF4 (Arnold & Braun, 2000).

Estas observações indicam que embora as células sejam capazes de entrar no programa miogênico na ausência de miogenina, são incapazes de se diferenciar e ativar a maior parte dos genes musculares sarcoméricos, sugerindo que a miogenina afeta de forma mais severa a miogênese secundária do que a miogênese primária (Arnold & Braun, 2000).

MRF4

De maneira geral, a ausência de MRF4 causa um fenótipo muscular muito suave, caracterizado por uma pequena redução na expressão de genes músculos-específicos (Patapoutian et al., 1995; Braun and Arnold, 1995; Zhang et al., 1995). Contudo, os fenótipos dos camundongos mutantes obtidos independentemente em três laboratórios apresentaram-se bastante variáveis, em função do tipo de mutação causada.

O alelo mutante gerado por Patapoutian et al., 1995, resultou na morte perinatal dos camundongos, os quais apresentaram severos problemas respiratórios devido à malformação das costelas. Entretanto, a anomalia não se apresentou tão aguda quando comparada aos camundongos mutantes Myf5 nulos.

A inativação do MRF4 no experimento realizado por Braun & Arnold (1995), aparentemente afetou a transcrição do gene Myf5, que se localiza próximo ao MRF4 no mesmo cromossomo. Neste caso os resultados foram equivalentes aos dos mutantes Myf5 nulos. Contudo, apesar da ausência de MRF4 e da redução dos níveis de Myf5, estes animais desenvolveram musculatura normal, manifestando apenas uma moderada redução dos músculos das costas.

A linha de mutantes MRF4 nulos, gerada por Zhang et al. 1995, resultou em camundongos viáveis, porém com múltiplas anormalidades nas costelas, incluindo bifurcações e fusões. Na fase adulta os camundongos apresentaram músculos relativamente normais, mas expressaram níveis elevados de miogenina. Com isso, os autores sugeriram que o MRF4 é requerido para a redução da expressão da miogenina, que normalmente ocorre após o nascimento, atuando como um regulador negativo e que, portanto, o aumento da expressão da miogenina em indivíduos mutantes, poderia estar compensando a sua ausência.

2.7 Miostatina

A miostatina foi inicialmente descrita por McPherron et al. (1997) como um novo membro família TGF- β , que é expressa durante o desenvolvimento da musculatura

esquelética em embriões e na fase adulta. A superfamília beta de fatores transformantes e de crescimento (TGF- β), é composta por um grande número de fatores de crescimento, os quais estão envolvidos na regulação de muitos processos celulares, tais como: proliferação, diferenciação e adesão celular (Capdevila & Izpisua Belmonte, 1999). Inúmeras pesquisas têm demonstrado que os fatores TGF- β são potentes inibidores da diferenciação miogênica, importantes para a regulação do desenvolvimento embrionário e manutenção da homeostase dos tecidos em animais adultos (Thomas et al., 2000).

A miostatina compartilha várias propriedades estruturais com os demais membros da superfamília TGF- β : um domínio central de aminoácidos hidrofóbicos próximo à extremidade amino-terminal, incluindo uma sequência sinal para secreção; um sítio de processamento proteolítico conservado (RSRR); e nove resíduos de cisteína na região carboxi-terminal (McPherron, et al., 1997).

O gene da miostatina, também conhecido como GDF8 (*Growth Differentiation factor 8*), está localizado no cromossomo 7 da galinha e sua sequência completa incluindo a região promotora, três exons e dois introns, está disponível no banco de dados do NCBI (acessos AF346599 e GeneID-373964). Assim como a maior parte dos membros da família TGF- β , a miostatina se apresenta altamente conservada sendo que genes homólogos têm sido encontrados em todos os vertebrados estudados incluindo humanos, camundongos e aves (McPherron & Lee, 1997).

A função biológica da miostatina foi determinada pela sua inativação em camundongos, em que os indivíduos mutantes apresentaram um grande aumento da massa muscular esquelética devido à hiperplasia e hipertrofia da célula muscular, sugerindo que este gene estaria atuando como um potente regulador negativo do crescimento muscular esquelético, inibindo a proliferação de mioblastos (McPherron et al., 1997). Outras evidências que contribuíram para a caracterização da sua função biológica foram a descoberta de mutações na sequência codificada pelo gene da miostatina em bovinos das raças Belgian Blue e Piamontesa, as quais foram relacionadas com o aumento da massa muscular. Estas mutações resultavam em uma proteína não funcional levando a um fenótipo caracterizado como musculatura dupla

(McPherron & Lee, 1997; Grobet et al., 1997).

A expressão do gene da miostatina é verificada inicialmente em células precursoras miogênicas localizadas no compartimento do miótomo de somitos em desenvolvimento, e sua expressão permanece na fase adulta em músculos axiais e paraxiais (McPherron et al., 1997; Mott & Ivarie, 2002; Castelhana-Barbosa, 2001). Em aves, Castelhana-Barbosa (2001) detectou sinais de expressão desde o estágio HH1 (ovo recém-posto) até o estágio HH25 (embriões com 5 dias) e no tecido muscular peitoral de animais com 14 dias.

Embora os primeiros relatos descrevam a expressão da miostatina como exclusiva do músculo esquelético, publicações mais recentes têm mostrado a presença de transcritos ou proteínas em outros tecidos. Um estudo realizado com anticorpos miostatina-específicos indicou a presença da proteína em cardiomiócitos e fibras Purkinje do coração (Sharma et al. 1999), e de transcritos na glândula mamária (Ji et al., 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Formação da população referência

3.1.1 Linhagens

Foram utilizadas duas populações experimentais de aves desenvolvidas pela Embrapa - Suínos e Aves, sendo uma de corte (TT) e outra de postura (CC). Estas linhagens apresentam composições genéticas distintas, pois a linhagem de corte teve sua origem a partir do cruzamento das raças Cornish, Hampshire e Plymouth Rock, enquanto que a linhagem de postura foi originada da raça White Leghorn. Estas linhagens foram selecionadas por várias gerações para diferentes objetivos.

A linhagem TT é uma linha macho, cuja seleção foi efetuada dentro de linha desde 1985, com o objetivo de melhorar geneticamente o potencial para: peso corporal, conversão alimentar, consumo de ração, rendimentos de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, redução da gordura abdominal e doenças metabólicas. Na época em que a população experimental foi formada esta linhagem já havia sido selecionada por seis gerações.

A linhagem CC foi selecionada por oito gerações desde 1989, para as características de: produção de ovos, peso do ovo, redução do peso corporal, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade e qualidade do ovo.

3.1.2 Formação da geração F1 e F2

A geração F1 foi formada a partir do acasalamento de sete machos TT com sete fêmeas CC, havendo também o cruzamento recíproco de sete machos CC com sete fêmeas TT. O cruzamento foi feito através de inseminação artificial, na proporção de um macho para uma fêmea. As aves foram mantidas em gaiolas individuais para controle de pedigree, e os ovos identificados para possibilitar o anelamento dos pintos da geração F1 ao nascer.

A geração F1 inclui sete famílias oriundas do cruzamento TC e sete do cruzamento CT. Dentro de cada família, foram escolhidos ao acaso, três machos e seis fêmeas, os quais foram criados como matrizes de frango de corte e alojadas em gaiolas individuais.

Na fase de reprodução, foram selecionados ao acaso um macho e três fêmeas de cada uma das famílias da geração F1. O cruzamento foi feito na proporção de um macho para cada três fêmeas (não parentes próximos), através de inseminação artificial, para formação da geração F2. Um total de 7 machos e 21 fêmeas F1 de cada cruzamento geraram cerca de 100 pintos F2 por família F1, totalizando 4000 aves, sendo cerca de 2000 por tipo de cruzamento (TT x CC e CC x TT). Os pintos F2 foram obtidos em 17 incubações com intervalos de 15 dias durante quase oito meses.

Na geração F2 as aves foram identificadas por anéis, com controle de pedigree individual e avaliadas para várias características de crescimento e carcaça. Estas aves foram criadas como frangos de corte recebendo ração e água à vontade. Os animais receberam ração de crescimento (20% de Proteína Bruta e 3200kcal de Energia Metabolizável) e ração final de 36 a 41 dias (18,5% de Proteína Bruta e 3.200kcal de Energia Metabolizável). As rações à base de milho e farelo de soja foram formuladas para atender às necessidades nutricionais das aves. As aves foram mantidas em boxes coletivos até 35 dias de idade, quando cada ave foi pesada e alojada em gaiola individual para teste de conversão alimentar dos 35 aos 41 dias.

Devido ao tempo e aos custos demandados neste projeto, optou-se pela realização das análises moleculares somente em indivíduos do cruzamento TC. Na tabela 3 é apresentada a estrutura populacional do cruzamento TC.

Tabela 3. Estrutura populacional do cruzamento TC

Geração	Machos	Fêmeas	Total
Parental	7	7	14
F1	7	20 ^a	27
F2	1039	1024	2063

^a Houve perda por morte de uma fêmea F1.

3.2 Dados fenotípicos coletados

Os dados fenotípicos coletados referentes às características de desempenho foram: peso ao nascer (PN), peso vivo aos 35 (PV35), 41 (PV41) e 42 (PV42) dias de idade. Os dados de PV42 foram obtidos após 6 horas de jejum e transporte para o abate. Foram avaliados também: o ganho de peso (GP), consumo de ração (CR) e conversão alimentar (CA) dos 35 aos 41 dias de idade. Após o abate as aves foram submersas em água quente para facilitar a depena. As carcaças foram evisceradas e o peso de pulmão (PU), coração (COR), moela (MO) e comprimento do intestino (CI) foram avaliados.

As características de carcaça foram avaliadas após o resfriamento de 4 horas. Foram avaliados: o peso da carcaça (CARC – peso da carcaça sem vísceras, pés e cabeça), peso do peito (PP), coxas (PC – peso de coxas e sobre-coxas), peso da carcaça residual (CARR – peso da carcaça menos peso de peito, asas e coxas), asa (PA), gordura abdominal (GA) e pés (PÉS). Todos os dados fenotípicos obtidos estão armazenados em um banco de dados do setor de melhoramento de aves da EMBRAPA, para realização de diversos estudos de genes candidatos e mapeamento de QTL.

3.3 Extração de DNA

As amostras de DNA genômico, dos parentais e das gerações F1 e F2, foram extraídas de sangue utilizando o reagente DNAzol[®] (Invitrogen). Para tanto, 1 ml de DNAzol[®] foi adicionado a alíquotas de 15 µL de sangue conservado em EDTA. Após agitar manualmente as amostras por alguns segundos, o conteúdo foi fracionado em dois tubos. A cada tubo foram acrescentados 500 µL de DNAzol[®], procedendo-se homogeneização e nova subdivisão do conteúdo em outros dois tubos. Foram adicionados 500 µL de etanol absoluto, invertendo-se cuidadosamente cada amostra. O DNA precipitado foi coletado com o auxílio de um micropipetador e transferido para um tubo limpo. A seguir, foram feitas duas lavagens adicionais com 1 ml de etanol 95%, seguindo-se centrifugação a 1000 x *g* por 10 min entre as lavagens. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* seco por duas horas a 37°C. As amostras de DNA foram ressuspensas em 300 µL de TE ou água.

3.4 Leitura no espectrofotômetro

As amostras individuais de DNA foram analisadas em espectrofotômetro (HITACHI U-2000) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0%. Após a confirmação da integridade procederam-se diluições, com base na concentração inicial calculada, para obter homogeneidade de concentração entre as amostras (20ng/µl). Após a diluição, as amostras foram novamente submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% para confirmação da homogeneidade.

3.5 Detecção de polimorfismos

3.5.1 Preparação dos *pools* de DNA

Foram preparados dois *pools* de DNA, cada um contendo quantidades equivalentes de DNA dos 14 parentais TT e CC de cada um dos cruzamentos. Desta

forma, nos *pools* de DNA estavam igualmente representados os alelos dos indivíduos das respectivas linhagens, que na etapa seguinte foram utilizados como moléculas molde para as PCRs.

3.5.2 PCR

Aproximadamente 100 ng de DNA do *pool* TT (ou CC) foram utilizados em cada reação de PCR. O volume final das reações foi de 50 µl, contendo 5 pmoles de cada um dos *primers* direto e reverso, 200 µM de cada um dos dNTPs e 2U da DNA polimerase *ThermalAce* (Invitrogen). O tamanho dos produtos amplificados na reação de PCR e a sequência dos *primers* utilizados na amplificação de cada gene são apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados nas PCRs e tamanho dos produtos resultantes da amplificação

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Tamanho do produto
Miostatina	DIRETO: 5'- AGTAGCGATGGCTCTTTGGA - 3' REVERSO: 5'- CTGGGAATGTGACAGCAAGA - 3'	2517 pb
MRF4	DIRETO: 5'- AGGACAAAATGCAGGAGG - 3' REVERSO: 5'- GGTGGTCTGTGGGTCAAAC - 3'	742 pb
Myf5	DIRETO: 5'- GGTACATCGAAAGCCTCCAG - 3' REVERSO: 5'- CTCATAGCGCCTGGTAGGTC - 3'	800 pb
MyoD	DIRETO: 5'- TACCCAGTGCTGGAGCACTA - 3' REVERSO: 5'- GTCTTGGAGCTTGGCTGAAC - 3'	2100 pb
Miogenina	DIRETO: 5'- AGGCTGAAGAAGGTGAACGA - 3' REVERSO: 5'- CACAGTGTCCGAGGGGTAAAT - 3'	~ 3000 pb

Para a amplificação dos genes Myf5 e MRF4 foi feita uma desnaturação inicial durante 3 min (95°C), seguindo-se 1 min a 55°C e 1 min a 74°C. Nos 29 ciclos subseqüentes, o tempo de desnaturação foi reduzido para 1 minuto, mantendo-se as temperaturas e os tempos de anelamento e extensão, exceto no último ciclo, no qual foi feita uma extensão mais longa (15 min). As condições para amplificação do fragmento de MyoD, miostatina e miogenina foram distintas das empregadas para os outros genes. Primeiramente foi realizada uma desnaturação por 3 min a 94°C, seguindo-se ciclos compostos por 40 s a 94°C, 40 s a 62°C e 30 s a 72°C.

3.5.3 Clonagem e seqüenciamento dos produtos de PCR

Após a amplificação, os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose e eluídos com o auxílio do *Sephaglas Band Prep Kit* (Amersham-Pharmacia). Foi realizada a clonagem dos fragmentos isolados em pSport/*E.coli* DH5 α com o *Topo Cloning Kit* (Invitrogen), conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

Os clones TT e CC foram seqüenciados utilizando os *primers* universais M13 direto e reverso com o *ABI Prism BigDye Terminator Kit* (Applied Biosystems), no seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Com isso, os fragmentos clonados de cada gene foram seqüenciados no sentido 5' - 3' e 3' - 5'.

3.5.4 Análise das seqüências

As seqüências foram editadas para a remoção da seqüência do vetor da extremidade 5', bem como para eliminar os nucleotídeos de baixa qualidade da extremidade 3'. Os programas *Phred*, *Cap3* e *Consed* (Ewing & Green, 1998; Huang & Madan, 1999; Gordon, 1998) foram usados para a verificação da qualidade das bases, montagem e visualização dos *contigs* respectivamente. As seqüências dos clones TT e CC foram alinhadas com os programas *ClustalW* e/ou *Cap3* (Huang e Madan, 1999) para identificação dos polimorfismos.

No intuito de dinamizar o processo de detecção de polimorfismos, recentemente foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP, um sistema automático, o qual realiza o alinhamento, clusterização, *Blastn* e identificação de polimorfismos pontuais, disponibilizando uma tabela com a localização e descrição de cada um dos polimorfismos, em seqüências com qualidade maior ou igual a 20. Neste sistema, as seqüências dos clones de cada gene foram submetidas pela rede, depositadas em um banco de dados e finalmente reanalisadas quanto à qualidade pelo programa *Phred* e alinhadas pelo programa *Cap3*.

3.6 Escolha dos polimorfismos e desenho de *primers* para genotipagem

Os *primers* foram desenhados com base nos *contigs* obtidos pelo alinhamento das seqüências dos clones TT e CC para todos os genes exceto para o gene MyoD, cujos *primers* foram desenhados a partir da seqüência completa do gene disponível no banco de dados do NCBI (tabela 5). As regiões flanqueadas por estes *primers* foram escolhidas segundo a densidade e freqüência de polimorfismos detectados e/ou presença de SNPs não sinônimos.

Para o desenho de *primers* foi utilizado o programa *Primer3Input* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Alguns dos *primers* listados já se encontravam disponíveis no Laboratório de Biotecnologia.

Tabela 5. Seqüência dos *primers* desenhados e testados para a genotipagem

Gene	Seqüência dos <i>primers</i>	Identificação
Miostatina	DIRETO: 5'-TGCATCCACTCTGTTACCAA - 3'	MST2D
	DIRETO: 5'- TTCTTTTTGTTCCCTGTTTCAGT- 3'	MST2DS
	REVERSO: 5'- CTGCCATTCTCGAAGCAATA - 3'	MST2R
Miogenina	DIRETO: 5' - AGGCTGAAGAAGGTGAACGA - 3'	PD 300
	REVERSO: 5'-CACAGTGTCGGAGGGGTAAT - 3';	R10
MyoD	DIRETO: 5'- ACTGGAGAGATGCCTGATGG - 3'	PDMyoD3
	DIRETO: 5'- ATCTGCCCTCCCTGAATAGC - 3'	PDSMyoD2
	REVERSO: 5'- GTCTTGAGCTTGGCTGAAC - 3'	PRMyoD
MRF4	DIRETO: 5' - AGGACAAAATGCAGGAGGTG - 3'	PD472/4
	REVERSO: 5'- GAGAGAGGGGTTAGGGAACG - 3'	MRF2S
	REVERSO: 5'- GAGGAAATGCTGTCCACGAT- 3'	MRF1R
	DIRETO: 5'- AGGCTGGATCAGCAGGACAA - 3'	PDMRF4
	REVERSO: 5'- CTCATTTCTCCACCGCCTCT - 3'	PRMRF4
	REVERSO: 5'- GGTGGTCTGTGGGTCAAAC - 3'	PR872/4
Myf5	REVERSO: 5' - GGTACATCGAAAGCCTCCAG- 3'	PR1322/5
	DIRETO: 5' - CTCATAGCGCCTGGTAGGTC- 3'	PD523/5
	REVERSO: 5' - TGGTAGCACGCTTTATTTGC - 3'	PR1522/5
	DIRETO: 5'- CTGCTCCGATGTGATGGTAA - 3'	PD623/5
	DIRETO: 5'- ATGTTGGACGGTTTGGGTTC - 3'	PDSMyf5
	REVERSO: 5'- ACGATGCTGGAGAGGCAGTC - 3'	PRMyf5
	REVERSO: 5'- TCATAGCGCCTGGTAGGTCC - 3'	PRMyf5H
	DIRETO: 5'- TCCAGCTGCTCCGATGTGAT - 3'	PDMyf5

3.7 Otimização da PCR

Três diferentes metodologias foram utilizadas para otimização das reações em decorrência das dificuldades encontradas nesta etapa do projeto. O programa do termociclador utilizado nesta etapa é apresentado na tabela 6.

Tabela 6. Programa utilizado nos termocicladores para otimização da PCR

Passos	Temperatura	Tempo
1	92°C	3 minutos
2	92°C	1 minuto
3	45-65°C	1 minuto
4	72°C	1 minuto
5	-	voltar ao passo 2 (29 vezes)
6	72°C	10 minutos
7	4°C	indefinidamente

As otimizações das reações foram realizadas inicialmente com o *PCR Optimizer Kit* (Invitrogen). Porém, as reações cujos *primers* não apresentaram resultados satisfatórios dentro das condições testadas pelo *kit* comercial, foram otimizadas por meio de testes de gradiente de temperatura e concentração de $MgCl_2$ com os tampões 10X e soluções de $MgCl_2$ comerciais, adquiridos juntamente com a *Taq* DNAPolimerase.

O *PCR Optimizer Kit* utilizado na otimização da amplificação é constituído por tampões com concentrações de magnésio e pH diferentes, sendo que todos os tampões têm em comum 300 mM de Tris-HCl e 75 mM de Sulfato de Amônio. O *kit* contém ainda dNTP *mix* na concentração de 2,5 mM para cada nucleotídeo dentre outros componentes.

Os pares de *primers* de todos os marcadores foram testados com os tampões A, B, C, D, F, J e N, referentes ao primeiro passo do protocolo do *kit* e com os demais tampões referentes ao segundo passo do protocolo, caso a otimização não tenha sido alcançada no primeiro passo (tabela 7).

Tabela 7. Conteúdo dos tampões 5X do *PCR Optimizer Kit* (Invitrogen)

Item	Composição	[] MgCl ₂ na reação
Tampão A 5X	MgCl ₂ 7,5 mM, pH 8,5	1,5 mM
Tampão B 5X	MgCl ₂ 10 mM, pH 8,5	2,0 mM
Tampão C 5X	MgCl ₂ 12,5 mM, pH 8,5	2,5 mM
Tampão D 5X	MgCl ₂ 17,5 mM, pH 8,5	3,5 mM
Tampão E 5X	MgCl ₂ 7,5 mM, pH 9,0	1,5 mM
Tampão F 5X	MgCl ₂ 10 mM, pH 9,0	2,0 mM
Tampão G 5X	MgCl ₂ 12,5 mM, pH 9,0	2,5 mM
Tampão H 5X	MgCl ₂ 17,5 mM, pH 9,0	3,5 mM
Tampão I 5X	MgCl ₂ 7,5 mM, pH 9,5	1,5 mM
Tampão J 5X	MgCl ₂ 10 mM, pH 9,5	2,0 mM
Tampão K 5X	MgCl ₂ 12,5 mM, pH 9,5	2,5 mM
Tampão L 5X	MgCl ₂ 17,5 mM, pH 9,5	3,5 mM
Tampão M 5X	MgCl ₂ 7,5 mM, pH 10	1,5 mM
Tampão N 5X	MgCl ₂ 10 mM, pH 10	2,0 mM
Tampão O 5X	MgCl ₂ 12,5 mM, pH 10	2,5 mM
Tampão P 5X	MgCl ₂ 17,5 mM, pH 10	3,5 mM

Após a realização dos testes de tampão sob temperatura de anelamento de 55°C, foram testadas outras temperaturas de anelamento, segundo protocolo do fabricante.

A otimização da PCR por gradiente de temperatura foi feita somente para alguns pares de *primers*, os quais não apresentaram resultados satisfatórios com a utilização do *kit*. Esta metodologia consistiu em submeter frações de uma mesma reação, contendo uma elevada concentração de MgCl₂ pré-estabelecida, a um gradiente de temperatura com uma amplitude de 10°C a 20°C em relação à temperatura de anelamento calculada. Após o primeiro teste, mediante a ocorrência de amplificação de produtos inespecíficos, reações com menores concentrações foram novamente submetidas ao gradiente de temperatura.

Os produtos amplificados de cada gene foram visualizados em gel de agarose 1,0% e verificados quanto ao tamanho aproximado do produto, segundo a sequência flanqueada pelos respectivos *primers*. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado com a utilização do marcador de peso molecular ϕ x *Hae* III *fragments* e o programa *Kodak 1D digital science v. 3.0.2*.

3.8 Purificação pré-seqüenciamento dos produtos da PCR

Otimizadas as condições da PCR, foram realizadas as amplificações e a purificação dos produtos, a qual consistiu na retirada dos resíduos de *primers*, dNTP e *Taq* DNApolimerase da reação, para obtenção de seqüências de melhor qualidade nos cromatogramas após o seqüenciamento.

Para esta finalidade, foi empregado o protocolo de precipitação com isopropanol: igual volume de isopropanol foi adicionado ao tubo de amostra seguindo-se 15 minutos de incubação a 25°C. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 20 minutos na rotação máxima (15000 rpm) e o sobrenadante descartado. Foram realizadas duas lavagens com 200 µl de Etanol 75%, sendo as amostras centrifugadas por 20 minutos em cada lavagem. Após descartar o sobrenadante o *pellet* foi seco em centrífuga à vácuo por 20 minutos, e então ressuscitado em 10 µl de H₂O deionizada.

As amostras purificadas foram visualizadas em gel de agarose 1,0% para verificação da concentração final dos produtos de PCR.

3.9 Seqüenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR purificados foram seqüenciados utilizando-se os respectivos *primers* diretos da reação de PCR com o *ABI Prism BigDye Terminator Kit* (Applied Biosystems), no seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

3.10 Genotipagem

Neste projeto optou-se por realizar o estudo de polimorfismos na população TC oriunda do cruzamento de machos TT e fêmeas CC. Para tanto, a genotipagem foi realizada em três fases: genotipagem da geração parental do cruzamento TC, para validação dos polimorfismos detectados; genotipagem seletiva da geração F2, para identificação dos polimorfismos de maior relevância; e genotipagem dos indivíduos F2 pertencentes às famílias informativas que apresentaram os polimorfismos de interesse.

Os *primers* selecionados para a genotipagem e suas respectivas condições de PCR otimizadas estão descritos no Anexo A.

3.10.1 Geração parental

Visando validar os polimorfismos detectados nos clones, os parentais do cruzamento TC foram genotipados por seqüenciamento dos produtos de PCR. Esta genotipagem inicial permitiu não só a identificação dos alelos segregantes presentes na população, como também a identificação de novos polimorfismos.

3.10.2 Genotipagem seletiva da geração F2

Os testes preliminares de associação entre os polimorfismos identificados nos genes candidatos e os caracteres fenotípicos foram realizados pelo método conhecido como *Selective Genotyping* descrito por Lander e Botstein (1989), comumente aplicado para mapeamento de QTL. Neste modelo, a genotipagem é realizada somente em indivíduos cujos fenótipos desviam substancialmente da média dentro da população, para determinada característica. A análise de animais de desempenho extremo, desconsiderando-se àqueles cujo desempenho se encontra no meio da curva de distribuição da população, pode reduzir substancialmente o número de indivíduos genotipados, sem que com isso haja perda de uma porção significativa da variância genética (Hillel, 1997).

Foi verificado que a característica de peso vivo aos 42 dias apresentou correlação fenotípica mais elevada com um maior número de características de desempenho e caracaça e portanto os animais foram selecionados segundo a distribuição desta característica. Para esta finalidade, foi realizada a revisão preliminar dos dados fenotípicos de todos os animais para correção de possíveis erros de digitação e descarte de valores discrepantes (*outliers*). Foram descartados também animais cujas amostras de sangue não estavam disponíveis. Com o objetivo de controlar os efeitos de sexo e ambientais, estes dados corrigidos foram agrupados de acordo com o sexo, e os valores

de peso vivo aos 42 dias de cada grupo foram ajustados para o efeito de incubação. A seleção dos animais foi feita dentro de família no intuito de evitar que alguma família não fosse representada na amostragem. Desta forma, foram genotipados 170 animais F2 (9% da população TC), incluindo 84 machos e 86 fêmeas, onde a proporção de animais selecionados nos extremos de cada família foi de 4,5% dos animais mais leves e 4,5% dos animais pesados, com uma variação de seis a dez animais por família.

A genotipagem seletiva dos indivíduos da F2 foi realizada com o objetivo de identificar os polimorfismos de maior relevância dentre os três genes, bem como selecionar todas as famílias informativas para análises futuras.

3.10.3 Genotipagem dos indivíduos F2 das famílias informativas

Para o estudo dos efeitos dos polimorfismos de cada gene, identificados na genotipagem seletiva, bem como dos efeitos de interação entre eles, foram selecionadas três famílias informativas para genotipagem. Para que os efeitos fixos de sexo e família fossem ajustados na análise estatística, foram genotipados 96 indivíduos, sendo 32 de cada família, dos quais metade eram machos e a outra metade eram fêmeas. Todos os animais foram genotipados por seqüenciamento.

3.11 Análise Estatística

3.11.1 Teste χ^2 (Qui-quadrado)

As frequências alélica e genotípica dos indivíduos dos grupos de leves e pesados, obtidas pela genotipagem seletiva, foram testadas pelo teste qui-quadrado, seguindo a equação:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^s \frac{(Fo_{ij} - Fe_{ij})^2}{Fe_{ij}}$$

em que Fo_{ij} , é a frequência observada na linha i , coluna j ; Fe_{ij} a frequência esperada na linha i , coluna j , r é o número de linhas e s , o número de colunas.

3.11.2 Análise de Variância

Foram incluídos na análise de variância os dados fenotípicos de desempenho: PN, PV35, PV41, PV42, GP, GP35, GP41, GP42, CA, EF, PU, COR, MO e CI; as características de carcaça CARC, PC, CARR, PA e GA. Foram incluídos também os dados gerados PPEIT (porcentagem de peito), PCARC (rendimento de carcaça), PGA (porcentagem de gordura abdominal), calculados a partir dos dados fenotípicos coletados.

As análises de variância para testar os efeitos de cada gene, bem como da interação entre eles foram feitas com o PROC GLM do SAS (SAS Intitute, 1996). A primeira análise de variância denominada de *Single-gene Model* foi realizada seguindo o modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + I_i + S_j + F_k + G_l + e_{ijkl}$$

Onde Y_{ijkl} representa o valor fenotípico de cada caráter, μ representa a média, I_i é o efeito de incubação, S_j , o efeito de sexo, F_k , o efeito de família, G_l se refere ao efeito do genótipo de cada sítio polimórfico de cada gene e e_{ijkl} o erro padrão.

Uma segunda análise de variância seguiu o modelo multigênico ou *Multi-gene Model* descrito por Bonvenhuis et al.(1992):

$$Y_{ijklmn} = \mu + I_i + S_j + F_k + Mstn_l + Mio_g_m + Myod_n + e_{ijklmn}$$

em que $Mstn_l$, $Miog_m$ e $Myod_n$ correspondem ao efeito de cada genótipo dos genes da miostatina, miogenina e MyoD, respectivamente.

Os modelos utilizados para a análise de variância foram ajustados para cada um dos caracteres estudados, para os quais foram testados os efeitos fixos de incubação, sexo, família e o efeito de interação entre estes. Nesta análise os efeitos fixos estatisticamente não significativos foram excluídos do modelo.

Os valores de probabilidade dos efeitos de genótipos gerados no teste qui-quadrado e na análise de variância foram classificados como altamente significativos (**), quando $P < 0,01$, significativos (*), quando $P < 0,05$ e sugestivos (†), quando $P < 0,10$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de polimorfismos

Todos os polimorfismos dos genes miostatina, miogenina, MRF4 e Myf5 foram detectados por meio do seqüenciamento dos produtos de PCR clonados, obtidos dos *pools* de DNA dos parentais das linhagens TT e CC de ambos os cruzamentos. Foram obtidas seqüências referentes tanto à extremidade 5' quanto à extremidade 3' do inserto. Devido à baixa qualidade do seqüenciamento dos clones de MyoD, a detecção de polimorfismos neste gene foi realizada diretamente pelo seqüenciamento dos produtos de PCR dos 14 parentais do cruzamento TC.

Somente os polimorfismos com qualidade ≥ 40 com frequência acima de 1% ou que se localizavam em regiões de maior relevância no exon, foram classificados como *SNPs*. Isto foi feito no intuito de excluir da análise possíveis artefatos ocasionados por erros de incorporação de bases nas reações, bem como selecionar os polimorfismos de maior relevância para a etapa de genotipagem. Na tabela 8 é apresentado o número de *SNPs* detectados em clones das linhagens TT e CC. A descrição dos *contigs* e *SNPs* identificados estão nos Anexos B, C, D e E.

Tabela 8. Número de *contigs*, *reads* e SNPs identificados em clones dos genes da miostatina, miogenina, MRF4 e Myf5

Gene	<i>Contigs</i>	nº de <i>reads</i>	<i>SNPs</i>		
			TT	CC	Total
Miostatina	2	100	11	2	19
Miogenina	4	127	21	16	37
MRF4	2	214	26	44	100
Myf5	1	42	7	12	20

Os *contigs* contendo a localização dos polimorfismos detectados pelo sequenciamento dos produtos de PCR clonados do gene da miostatina estão representados nas figuras 4 e 5.

Figura 4 - Sequência do *contig* 1 da miostatina com a localização dos polimorfismos detectados, segundo a numeração disponível no NCBI (acesso AF346599)

Figura 5 - Sequência do *contig 2* da miostatina com a localização dos polimorfismos detectados (NCBI, acesso AF346599)

O seqüenciamento dos clones da miogenina gerou quatro *contigs*, dois referentes à extremidade 5' e dois referentes à extremidade 3' do inserto. Foi realizada uma nova montagem com as seqüências dos *contigs* 1 e 2, na qual foi possível identificar outros quatro polimorfismos, caracterizados por dois sítios de substituição C=>T e dois sítios de deleção de oito pares de base. Foi verificado que todos estes sítios polimórficos fazem parte de um único alelo, o qual foi encontrado em todos os *reads* do *contig 2*. Entretanto, não foi possível inferir com precisão qual grupo de nucleotídeos estaria incluído no sítio de deleção, uma vez que há três diferentes montagens que podem ser editadas para localizar as deleções, como é mostrado na figura 6.

Montagem 1

	490	500	510	520	530	540	550
463	AATCATGGG.....G	GTCATAGAA	CCATGGG	ATCACAGAG	CCCATGGA	AATCATGGG.....G	GTCATAGAAC
482	AATCATGGGAATCACAGA	GACATGGA	ACCATGGG	ATCATAGAG	TCGTGGA	AATCATGGAA	TACATGGAA
482	AATCATGGGAATCACAGA	GW	CAT	RGAA	CCATGGG	ATCATAGAG	YCAT
	+++++++ +	+ +		+ + +		+++++++ +	+ +

Montagem 2

	490	500	510	520	530	540	550	560
471	GGTCATAG		AACCATGGGATC	ACAGAGCCAT	TGGAATCAT	GGGGTCATAG		AACCATGGGAT
490	AATCACAGAGACATGG	AACCATGGGATCAT	AGAGTCGTGGAATCAT	GGAATCACAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT
490	RRTCAYAGAGACATGG	AACCATGGGATC	AYAGAGYCR	TGGAATCAT	GGRRTCAYAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT	GGAATCACAGAGACAT
	++ +	+++++++		+ + +		++ +	++ +	+++++++

Montagem 3

	490	500	510	520	530	540	550	560
471	GGTCATAGA	-----	ACCATGGGAT	CACAGAGCCAT	GGAATCATGGGGT	CATAGA	-----	ACCATGGGAT
490	AATCACAGAG	AACATGGAA	ACCATGGGAT	CATAGAGTCGT	GGAATCATGGAAT	CACAGAG	AACATGGAA	ACCATGGGAT
490	RRTCAYAGAG	AACATGGAA	ACCATGGGAT	CAYAGAGYCR	TGGAATCATGG	RRTCAYAGAG	AACATGGAA	ACCATGGGAT
	++ +	+++++++		+ + +		++ +	+++++++	

Figura 6 - *Contigs* formados pela remontagem das seqüências dos *contigs* 1 e 2 da miogenina

Segundo dados disponíveis no banco de dados de SNPs do NCBI este polimorfismo foi caracterizado como uma deleção/inserção da seqüência de nucleotídeos [AATCACA] (acesso rs15466457) e do nucleotídeo [A] (acesso rs15466460) como descrito na montagem 1 da figura 6.

Os *contigs* contendo a localização dos polimorfismos detectados pelo sequenciamento dos produtos de PCR clonados do gene da miogenina estão representados nas figuras 7 e 8.

Figura 7 - Polimorfismos detectados nos *contigs* 1 e 2 referentes à extremidade 5'. A região CDS foi localizada pelo alinhamento dos *contigs* com a sequência disponível sob número de acesso D90157 no NCBI, realizada pelo programa Vector NTI

Figura 8 - Polimorfismos detectados nos *contigs* 3 e 4 referentes à extremidade 3'. A região CDS foi localizada pelo alinhamento dos *contigs* com a sequência disponível sob acesso D90157 no NCBI, realizada pelo programa Vector NTI

Os *contigs* contendo os polimorfismos detectados no gene MRF4 não foram representados em figuras devido ao grande número de SNPs identificados os quais se apresentaram densamente distribuídos por todo o fragmento sequenciado. O único *contig* obtido pelo sequenciamento dos clones do gene Myf5 é apresentado na figura 9.

Figura 9 - Sequência do único *contig* do gene Myf5 com a localização dos polimorfismos detectados (NCBI, acesso X73250)

Para a detecção de polimorfismos do gene MyoD foram utilizados o *primer* direto PDMyoD3 (5'-ACTGGAGAGATGCCTGATGG-3'), desenhado exclusivamente para genotipagem, e o reverso PRMyoD (5'- GTCTTGGAGCTTGGCTGAAC - 3'), utilizado na fase de clonagem. Estes *primers* amplificam um fragmento de 604 pares de base, o qual inclui uma região de 284 pares de base do intron 2 e 320 pares de base do exon 3.

Na geração parental foi possível detectar um polimorfismo caracterizado pela deleção de 13 pares de base [GGCATCCTTCACT], quando comparado à sequência de MyoD disponível no NCBI pelo acesso L34006, incluindo os nucleotídeos 6619 a 6631. Foi verificado que somente os parentais da linhagem TT possuíam esta deleção, quatro em heterozigose e um em homozigose.

O fragmento amplificado inclui ainda, no exon 3, uma região microssatélite (regiões geralmente caracterizadas como sequências de 1 a 4 nucleotídeos, repetidas em tandem). Este loco microssatélite denominado MYOD1 foi descrito por Moran (1993) e contém sete repetições consecutivas da sequência AGC, a partir do 6970º nucleotídeo.

Esta região não se apresentou polimórfica entre os indivíduos genotipados. O gene MyoD está ilustrado na figura 10.

Figura 10 - Gene MyoD de *Gallus gallus* com a localização dos *primers* e do polimorfismo caracterizado pela deleção de 13 pares de base no intron 2

4.2 Validação de polimorfismos

A validação dos polimorfismos detectados nos clones foi realizada pela genotipagem por seqüenciamento dos produtos de PCR dos parentais do cruzamento TC. As regiões selecionadas para a validação dos polimorfismos para posterior genotipagem foram escolhidas com base na densidade e frequência de polimorfismos detectados e/ou presença de SNPs não sinônimos.

4.2.1 Miostatina

Os *primers* selecionados nesta etapa amplificam todo o exon 2 e algumas bases adjacentes do intron 2, região que inclui 10 dos 19 sítios polimórficos de interesse detectados no seqüenciamento dos clones.

Na figura 11 está ilustrado o fragmento seqüenciado com a localização do único polimorfismo do tipo sinônimo encontrado nos parentais do cruzamento TC no intron 2 (acesso, AF346599).

Intron 1	TGCATCCACTCTGTTACCAATACAGTTTATGTAATATTGTAAGACATCCTACATGATCTGGAAAAAA ATTGGGTTATATATGCATATTTCTTTTGTCCCTGTTTCAGTAATTGTTCTTTCCATTCAATTTATAGC TGATTTTCTTGTACAAATGGAGGGAAAACCAAAATGTTGCTTCTTTAAGTTTAGCTCTAAAAATACAA
Exon 2	TATAACAAAGTAGTAAAGGCACAATTATGGATATACTTGAGGCAAGTCCAAAAACCTACAACGGT GTTTGTGCAGATCCTGAGACTCATTAAGCCCATGAAAGACGGTACAAGATATACTGGAATTCGATC TTTGAAACTTGACATGAACCCAGGCACTGGTATCTGGCAGAGTATTGATGTGAAGACAGTGCTGCA AAATTGGCTCAAACAGCCTGAATCCAATTTAGGCATCGAAATAAAAGCTTTTGATGAGACTGGACG
Intron 2	AGATCTTGCTGTCACATTCCCAGGACCGGTGAAGATGGATTGGTAAGTTCATTAGAAAAATCTCA TTTAAATATCATTGGAAAGGGATTAGTTTAAAGGATAAAAAATGGAAATATTGCTTCGAGAATGGC AG

Figura 11 - Localização do sítio polimórfico 4938 da miostatina: Substituição A => G, presente em parentais da linhagem CC

Neste fragmento, um único SNP no nucleotídeo 4938, caracterizado pela substituição de uma base A por uma base G, foi identificado nestes indivíduos, sendo que o alelo G foi evidenciado em cinco parentais da linhagem CC. Para facilitar sua descrição neste trabalho, este polimorfismo foi denominado A4938G, uma vez que esta identificação descreve não só a sua posição nucleotídica como também caracteriza o polimorfismo como uma substituição A=>G. O padrão dos cromatogramas para cada genótipo A//A, G//G e A//G pode ser visualizado na figura 12.

Figura 12 - Padrão dos cromatogramas dos possíveis genótipos no loco A4938G da miostatina, obtidos no sequenciamento dos produtos de PCR

4.2.2 Miogenina

Para a etapa de validação foram selecionados os polimorfismos detectados nos *contigs* 1 e 2, referente à extremidade 5' sequenciada, tendo em vista a disponibilidade de *primers* no Laboratório de Biotecnologia Animal – ESALQ/USP. Para genotipagem foram selecionados os *primers* PD300 (direto): 5'- AGGCTGAAGAAGGTGAACGA - 3', o mesmo utilizado no sequenciamento dos clones, e foi desenhado um outro *primer* reverso, R10: 5'- GTGACTCCATGATTCCAGGA – 3', os quais amplificam uma região de 525 pb.

As amostras dos 14 parentais do cruzamento TC foram sequenciadas para confirmação dos polimorfismos detectados nos clones. Após a análise realizada pelos programas *Phed/Cap3/Consed*, houve a confirmação de quatro polimorfismos anteriormente detectados (figura 13).

Figura 13 - Polimorfismos detectados na genotipagem por seqüenciamento da miogenina, na geração parental: 1 - C => T, polimorfismo miog_10 ou nucleotídeo 455 (acesso D90157, NCBI); 2 - T => C, polimorfismo miog_13; 3 - C=>T, miog_16; 4 - C => T, miog_16; 5 - Deleção [AATCACA] e [A], polimorfismo miog_17; 6 - Deleção [AATCACA] e [A], polimorfismo miog_17

Na etapa de detecção de polimorfismos, o polimorfismo miog_10 (C¹) situado na região CDS (*Coding Sequence* – região codificadora), foi encontrado somente em clones CC, caracterizado por uma substituição C=>T. Porém, segundo a seqüência de cDNA disponível no NCBI sob acesso D90157, o polimorfismo corresponde ao nucleotídeo 455, cujo consenso é uma base T. Sendo assim, na etapa de genotipagem o alelo mutante C foi encontrado em seis parentais da linhagem TT e somente em duas fêmeas da linhagem CC. Apesar deste polimorfismo estar situado em uma região codificadora, resulta em um polimorfismo sinônimo assim como os demais polimorfismos validados. Este polimorfismo foi denominado T455C.

O polimorfismo miog_13 (T²) foi encontrado em um parental CC e outro da linhagem TT. Os polimorfismo C³ e C⁴ já foram descritos no banco de dados de SNPs do NCBI sob os números de acesso rs15466453 e rs 15466455, respectivamente. No presente trabalho, foi verificado que os polimorfismos C³, C⁴ e os sítios de deleção ocorriam sempre simultaneamente e portanto representavam um único alelo. Este alelo foi encontrado somente nos parentais da linhagem TT.

4.2.3 MRF4

Para a validação dos polimorfismos foram testados ao todo seis *primers*, dois diretos e quatro reversos, em diversas combinações nas reações de acordo com a temperatura de anelamento característica de cada um. Na tabela 9 estão apresentados os *primers* com a combinação dos pares testados e tamanho predito dos fragmentos.

Tabela 9. Pares de *primers* testados na otimização de PCR do gene MRF4 para genotipagem

Identificação	Sequência	Tamanho do produto
PDMRF4 MRF2S	5'-AGGACAAAATGCAGGAGGTG-3' 5'- GAGAGAGGGGTTAGGGAACG – 3'	485 pb
PDMRF4 MRF1R	5'- AGGCTGGATCAGCAGGACAA – 3' 5'- GAGGAAATGCTGTCCACGAT- 3'	569 pb
PDMRF4 PRMRF4	5'- AGGCTGGATCAGCAGGACAA – 3' 5'- CTCATTTCTCCACCGCCTCT – 3'	616 pb
PD472/4 MRF1R	5'- AGGACAAAATGCAGGAGGTG – 3' 5'- GAGGAAATGCTGTCCACGAT- 3'	556 pb
PD472/4 PRMRF4	5'- AGGACAAAATGCAGGAGGTG – 3' 5'- CTCATTTCTCCACCGCCTCT – 3'	603 pb
PD472/4 MRF2S	5'- AGGACAAAATGCAGGAGGTG – 3' 5'- GAGAGAGGGGTTAGGGAACG – 3'	472 pb
PD472/4 PR872/4	5'- AGGACAAAATGCAGGAGGTG – 3' 5'- GGTGGTCTGTGGGTCAAAAC –3'	742 pb

A sequência completa do MRF4 de *Gallus gallus* não está disponível no NCBI, entretanto a sequência do fragmento de cDNA clonado por Fujisawa-Sehara et al. (1992) está depositada sob o número de acesso D10599. A sequência similar ao MRF4,

incluindo 3 regiões codificadoras e dois introns está depositada sob o número de acesso GeneID – 417873. A disposição dos *primers* na sequência clonada pode ser visualizada na figura 13.

Figura 14 - Ilustração do fragmento clonado do gene MRF4 e localização dos *primers* testados. As regiões CDS foram localizadas pelo alinhamento dos *contigs* com a sequência acessada pelo ID – D10599 no NCBI, realizado pelo programa Vector NTI

Finalizadas todas as fases de otimização da PCR para todos os pares de *primers* do gene MRF4, dois fatores inviabilizaram sua genotipagem. Primeiro, foi que embora as condições ideais para a PCR tenham sido alcançadas, o fragmento de interesse não era amplificado de forma homogênea para todos os indivíduos com os *primers* testados. Segundo, depois de realizadas novas alterações destas condições, para solucionar o problema anterior, não foi possível eliminar o produto amplificado inespecífico das amostras testadas.

O alto número de polimorfismos detectados nos clones TT e CC deve ser considerado como justificativa para o fato de nenhum *primer* ter amplificado adequadamente. Embora novos *primers* pudessem ser desenhados, optou-se por não

fazê-lo, uma vez que a sequência completa do gene não está disponível no NCBI, e, portanto ficaríamos limitados à sequência obtida com *contigs*, reduzindo ainda mais o número de *primers* que poderiam ser desenhados para amplificar um fragmento de 400 a 600 pares de base.

4.2.4 Myf5

Ao todo foram testados oito *primers*, quatro diretos e quatro reversos, os quais foram utilizados em diversas combinações nas reações segundo a temperatura de anelamento característica de cada um. Na tabela 10 estão apresentados os *primer*, a combinação de pares testados e tamanho predito dos fragmentos. A localização dos *primers* no gene Myf5 pode ser visualizada na figura 15.

Tabela 10 - Pares de *primers* testados na otimização de PCR do gene Myf5 para genotipagem

Identificação	Seqüência	Tamanho do produto
PDMyf5 PRMyf5H	5'- TCCAGCTGCTCCGATGTGAT- 3' 5'- TCATAGCGCCTGGTAGGTCC - 3'	704 pb
PDMyf5 PRMyf5	5'- TCCAGCTGCTCCGATGTGAT- 3' 5'- ACGATGCTGGAGAGGCAGTC - 3'	570 pb
PDSMyf5 PRMyf5H	5'- ATGTTGGACGGTTTGGGTTC - 3' 5'- TCATAGCGCCTGGTAGGTCC - 3'	579 pb
PR523/5 PRMyf5	5'- CTCATAGCGCCTGGTAGGTTC - 3' 5'- ACGATGCTGGAGAGGCAGTC -3'	663 pb
PD623/5 PRMyf5	5'- CTGCTCCGATGTGATGGTAA - 3' 5'- ACGATGCTGGAGAGGCAGTC -3'	563 pb
PDSMyf5 PR1322/5	5'- ATGTTGGACGGTTTGGGTTC - 3' 5'- GGTACATCGAAAGCCTCCAG- 3'	580 pb
PD523/5 PR1322/5	5'- CTCATAGCGCCTGGTAGGTTC - 3' 5'- GGTACATCGAAAGCCTCCAG - 3'	800 pb

Figura 15 - Gene Myf5 (GenBank, ID: X73250), contendo a localização dos *primers* testados

Embora a reação de PCR da maior parte dos pares testados tenham resultado em um produto amplificado único, estes por sua vez ao serem seqüenciados e submetidos ao *Blastn*, não correspondiam à seqüência do gene Myf5 de *Gallus gallus*.

Sabendo-se que os insertos dos clones foram isolados por eluição em gel de agarose e purificação dos produtos de PCR específicos e inespecíficos, formados pelo par de *primers* PD523/5 e PR1322/5, o mesmo resultado poderia ser obtido para a genotipagem com esta técnica. Porém, o custo da eluição dos produtos de PCR do gel de agarose para todas as amostras analisadas até o momento, seria inviável. Portanto, optou-se por dar prosseguimento às demais análises somente com os genes da miostatina, miogenina e MyoD.

4.2.5 MyoD

A deleção de 13 pares de base foi validada em indivíduos da genotipagem seletiva, onde foi possível verificar sua segregação. Este polimorfismo foi denominado

D6619-6631, nome que corresponde a uma deleção de nucleotídeos da posição 6619 a 6631 do gene MyoD. O fragmento amplificado é apresentado na figura 1.

Figura 16 - Produto de PCR seqüenciado do gene MyoD. A deleção de 13 pares de base está destacada em vermelho e a região microssatélite [AGC] em azul

A detecção de polimorfismos pelo seqüenciamento de produtos de PCR do gene MyoD se revelou bastante eficiente. Dentre as vantagens da sua aplicação estão: a praticidade, a rapidez, o baixo custo e maior número de polimorfismos válidos, em relação à clonagem. Entretanto, o principal obstáculo encontrado para a sua utilização foi a investigação de deleções e/ou inserções, uma vez que estas só podem ser nitidamente visualizadas em indivíduos homozigotos. No caso do gene da miogenina, seria impossível identificar o número de deleções presentes nos fragmentos amplificados se estes não tivessem sido clonados.

A investigação de polimorfismos nos genes da miostatina, Myf5, MRF4 e miogenina pelo seqüenciamento de clones se mostrou bastante eficaz, pois gerou um grande número de seqüências de qualidade igual ou superior a 40, permitindo a identificação de uma grande variedade de alelos, bem como a nítida visualização de deleções. Porém, muitos dos polimorfismos inicialmente detectados em clones não foram confirmados na genotipagem e, portanto não foram validados até o momento. Emara & Kim (2003) sugerem, dentre outras razões, que isto se deve a erros de incorporação de bases durante o processo de amplificação, clonagem e seqüenciamento,

e à ausência de polimorfismos nas amostras testadas usadas para validação. Embora muitos dos polimorfismos detectados nos clones não tenham sido validados, estes por sua vez não podem ser classificados como erros de incorporação de nucleotídeos, uma vez que podem pertencer aos parentais do cruzamento CT, os quais não foram genotipados neste trabalho. Por outro lado, particularmente no caso do gene MRF4, a ocorrência de erros de incorporação de bases deve ser levada em consideração. Este gene apresentou uma média de 12,5 SNPs por 100 pares de base, média muito superior às estimativas descritas na literatura para aves, as quais variam de 1,69 a 3,69 SNPs por 100 pares (Weigend & Romanov, 2001). Rothschild & Soller (1999) por sua vez, descrevem que a ocorrência de um polimorfismo a cada 700-1000pb estaria dentro de uma média aceitável. Desta forma, um típico gene candidato, considerando regiões de introns, exons e regiões regulatórias 5' e 3', pode incluir entre 5 e 20 sítios polimórficos em toda sua extensão, enquanto que o fragmento seqüenciado do MRF4 de 742 pb, apresentou 128 sítios polimórficos.

Neste contexto, a utilização de enzimas de alta fidelidade nas reações de PCR é fundamental na etapa de detecção de polimorfismos em fragmentos clonados. Outra forma bem sucedida de detecção e validação de polimorfismos na população é pelo seqüenciamento de produtos de PCR em duas ou mais gerações de uma mesma população, como foi realizado com o gene MyoD. Esta metodologia permite o acompanhamento da segregação de polimorfismos através das gerações, possibilitando a identificação de possíveis artefatos.

Os inúmeros polimorfismos detectados neste trabalho poderiam contribuir para a melhoria da resolução no mapeamento de QTL da população estudada com o fornecimento de marcadores SNPs para a identificação de QTNs, assim como para novas abordagens voltadas para a análise de genes candidatos.

4.3 Análise Estatística

Os polimorfismos validados foram utilizados como marcadores nas três fases de genotipagem: genotipagem da geração parental do cruzamento TC, para validação dos

polimorfismos detectados; genotipagem seletiva da geração F2, para identificação dos polimorfismos de maior relevância; e genotipagem dos indivíduos F2 pertencentes às famílias informativas, para avaliação dos efeitos de genótipo. Tendo em vista que a finalização da etapa de validação somente foi possível para os genes da miostatina, miogenina e MyoD, os genes Myf5 e MRF4 não puderam ser genotipados e conseqüentemente não foram incluídos nas análises estatísticas. Os polimorfismos utilizados na genotipagem são apresentados na tabela 11.

Tabela 11. Genes e respectivos loco selecionados para a etapa de genotipagem

Gene	Polimorfismo	Localização	Identificação do loco
miostatina	A=>G	nucleotídeo 4.938 (acesso AF346599)	A4938G
miogenina	T=>C	nucleotídeo 455 (acesso D90157)	T455C
	T=>C	nucleotídeo 283, <i>contig</i> 2 miogenina	miog_13
	C=>T ^a	nucleotídeo 431, <i>contig</i> 2 miogenina	miog_16
MyoD	deleção 13 pares de base	nucleotídeos 6619-6631 (L34006)	D6619-6631

4.3.1 Seleção dos animais para genotipagem seletiva

A característica escolhida para a seleção dos animais de desempenho extremo foi a de peso vivo aos 42 dias de idade (PV42). As correlações fenotípicas entre este caráter e as principais características de desempenho e carcaça para os 2063 animais F2 do cruzamento TC, são apresentadas na tabela 12 e 13.

Tabela 12. Correlações fenotípicas entre PV42 e características de desempenho de 2063 aves da geração F2 do cruzamento TC

Caráter	PV42	PV35	PV41	GP	CA	CI
PV42	1	0,86	0,99	0,66	-0,09	0,44
PV35		1	0,86	0,38	0,01	0,47
PV41			1	0,86	-0,11	0,43
GP				1	-0,32	0,23
CA					1	-0,04
CI						1

PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; CA - conversão alimentar; CI - comprimento do intestino.

Tabela 13. Correlações fenotípicas entre PV42 e características de carcaça de 2063 aves da geração F2 do cruzamento TC

Caráter	PV42	PEIT	PC	CARC	GA	FI	COR
PV42	1	0,79	0,87	0,84	0,61	0,68	0,48
PEIT		1	0,83	0,95	0,53	0,59	0,59
PC			1	0,9	0,62	0,67	0,67
CARC				1	0,61	0,64	0,64
GA					1	0,48	0,48
FI						1	0,42
COR							1

PV42 - peso vivo aos 42 dias de idade; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; FI - peso do fígado; COR - peso do coração;

Após a revisão preliminar dos dados fenotípicos o número amostral de animais foi reduzido para um total de 1860 aves, as quais foram divididas em 925 fêmeas e 934 machos. Foram genotipados um total de 170 animais, representando 9% do total de indivíduos F2 do cruzamento TC.

As médias e desvios-padrão da característica de PV42 ajustada nos grupos de animais leves e pesados foram $801,5 \pm 93,8$ g e $1328,5 \pm 127,8$ g, respectivamente.

4.3.2 Test χ^2 da genotipagem seletiva

Os resultados do teste qui-quadrado para a hipótese de homogeneidade alélica entre o grupo de animais leves e pesados, para os genes da miostatina, miogenina e MyoD estão descritos na tabela 14.

Tabela 14. Frequências alélicas e probabilidades do teste qui-quadrado para cada loco genotipado

Gene	Loco	Alelos	leves	pesados	Probabilidade do χ^2
Miostatina	A4938G	A	0,364706	0,332353	0,0890269
		G	0,129412	0,173529	
Miogenina	T455C	T	0,331361	0,340237	0,84782473
		C	0,16568	0,162722	
	miog_13	T	0,435294	0,447059	0,50075624
		C	0,064706	0,052941	
	miog_16	T	0,111765	0,117647	0,796429
		C	0,388235	0,382353	
MyoD	D6619-6631	C	0,424837	0,405229	0,72606193
		D	0,091503	0,078431	

Segundo o resultado do teste qui-quadrado, foi verificado que o polimorfismo do gene da miostatina apresentou maior relevância em relação à característica de peso vivo aos 42 dias ($P=0,089$). O estabelecimento da estratégia de genotipagem da geração F2 foi feito com base nesta análise, uma vez que possibilitou a seleção das famílias informativas para o loco de maior interesse, o loco A4938G.

4.3.3 Genotipagem dos indivíduos F2 das famílias informativas

Foram selecionadas todas as famílias informativas para o loco da miostatina, incluindo ao todo três famílias: 7713, 7972 e 7709. Foram selecionados ao acaso 32

indivíduos de cada família com números iguais de machos e fêmeas. A estatística descritiva dos caracteres estudados nos 96 indivíduos genotipados está apresentada na tabela 15. Na tabela 16 está a descrição dos dados fenotípicos discriminados por família.

Tabela 15. Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos 96 animais das famílias informativas

Caráter	Média	DP	CV
PN (g)	44,04	4,44	10,08
PV35 (g)	818,72	107,93	13,18
PV41 (g)	1045,56	138,98	13,29
PV42 (g)	1012,32	139,79	13,81
GP (g)	226,84	48,65	21,45
GP35 (g)	774,68	107,82	13,92
GP41 (g)	1001,53	138,51	13,83
GP42 (g)	968,29	139,16	14,37
CA (kg ração/kg pv)	2,66	0,43	16,17
EF	0,39	0,06	15,38
PA (g)	84,08	11,42	13,58
PC (g)	214,03	36,97	17,27
PEIT (g)	159,18	26,11	16,40
PPEIT (%)	15,70	1,02	6,50
CARR (g)	192,69	30,99	16,08
CARC (g)	649,98	100,22	15,42
PCARC (%)	64,09	1,95	3,04
GA (g)	18,91	6,98	36,91
PGA (%)	1,84	0,58	31,52
FI (g)	27,11	4,16	15,34
COR (g)	6,19	1,28	20,68
PU (g)	8,15	1,99	24,42
MO (g)	28,03	3,77	13,45
CI (cm)	160,3	12,96	8,08

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso da carcaça residual; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

Tabela 16. Média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) dos 96 animais por família

Família Caráter	7709			7713			7972		
	Média	Desvio	CV	Média	Desvio	CV	Média	Desvio	CV
PN (g)	41,3	2,3	5,6	41,7	2,6	6,2	49,2	2,8	5,7
PV35 (g)	852,4	83,1	9,7	784,4	120,9	15,4	819,4	108,6	13,3
PV41 (g)	1073,3	108,7	10,1	997,8	156,8	15,7	1065,7	138,7	13,0
PV42 (g)	1042,8	106,8	10,2	955,4	151,9	15,9	1038,8	142,7	13,7
GP (g)	220,9	45,1	20,4	213,3	44,5	20,9	246,3	51,2	20,8
GP35 (g)	811,1	82,4	10,2	742,7	120,2	16,2	770,2	109,2	14,2
GP41 (g)	1032,0	108,0	10,5	956,1	156,3	16,3	1016,5	139,3	13,7
GP42 (g)	1001,6	106,0	10,6	913,7	151,2	16,6	989,6	143,3	14,5
CA (kg ração/kg pv)	2,7	0,4	15,7	2,8	0,5	16,9	2,5	0,4	15,0
EF	0,4	0,1	15,8	0,4	0,1	13,5	0,4	0,1	15,0
PA (g)	87,6	8,8	10,0	79,4	12,1	15,3	85,3	11,8	13,8
PC (g)	217,6	34,0	15,6	200,7	36,9	18,4	223,8	37,1	16,6
PEIT (g)	167,2	21,8	13,0	153,9	28,5	18,5	156,4	26,5	16,9
PPEIT (%)	16,0	1,0	6,2	16,1	0,8	4,9	15,0	0,9	6,1
CARR (g)	198,3	23,5	11,9	182,4	33,7	18,5	197,4	33,0	16,7
CARC (g)	670,7	78,9	11,8	616,4	108,5	17,6	662,8	104,8	15,8
PCARC (%)	64,3	2,5	3,9	64,4	1,5	2,3	63,6	1,7	2,7
GA (g)	20,3	6,7	32,9	14,3	5,1	35,8	22,1	6,6	29,8
PGA (%)	1,9	0,5	27,5	1,5	0,4	28,6	2,1	0,6	27,2
FI (g)	28,0	4,5	16,2	25,8	3,9	15,0	27,5	3,8	13,9
COR (g)	5,8	1,1	18,0	6,3	1,4	21,8	6,4	1,3	21,0
PU (g)	7,8	2,0	25,4	7,9	1,8	22,5	8,7	2,2	24,8
MO (g)	28,6	3,7	12,8	26,9	3,5	13,0	28,6	4,0	14,0
CI (cm)	162,8	14,0	8,6	155,9	12,1	7,8	162,3	11,9	7,4

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso da carcaça residual; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

4.3.4 Análise de variância

Modelo de único gene (*Single-Gene Model*)

Nesta análise foram estudados os locos A4938G da miostatina, D6619-6631 do gene MyoD e os três locos da miogenina T455C, miog_13 e miog_16. Foi possível identificar a presença de todos os possíveis genótipos dentro da amostra para os locos da miostatina e MyoD. No gene da miogenina foi constatada a presença de somente dois genótipos em cada um dos três locos dentro da amostra. A frequência dos genótipos para cada loco é apresentada na tabela 17.

Tabela 17. Frequência de genótipos na amostra para um total de 86 observações válidas para os genes da miostatina, miogenina e MyoD

Gene	Loco	Genótipos	Frequência
Miostatina	A4938G	1 (AA)	27
		2 (AG)	45
		3 (GG)	14
Miogenina	T455C	1 (TT)	36
		2 (TC)	50
	miog_13	1 (TT)	67
		2 (TC)	19
	miog_16	1 (CC)	56
		2 (CT)	30
MyoD	D6619-6631	1 (CC)	28
		2 (CD)	50
		3 (DD)	8

Visto que o gene da miogenina teve três locos genotipados, foram realizadas análises de variância seguindo o modelo de único gene para cada um isoladamente, assim como para os genes da miostatina e MyoD.

Segundo Rothschild & Soller (1999), se uma sequência possui n locos dialélicos, o número total de diferentes haplótipos intragênicos nesta sequência é 2^n . Sendo assim, a análise dos três alelos da miogenina como um único loco permitiu a identificação de cinco haplótipos intragênicos ou “alelos de sequência” (Anexo F). Entretanto, na análise multigênica foram utilizados unicamente os dados da genotipagem do loco T455C, uma vez que este apresentou maior relevância na análise do modelo de único gene.

As probabilidades F da soma de quadrados tipo III do SAS pelo grupo de modelos de único gene (*Single-gene Model*), para o gene da miostatina, MyoD e o loco T455C da miogenina, estão descritas na tabela 18, 19 e 20, respectivamente. As probabilidades F dos demais locos do gene da miogenina estão descritas no Anexo F.

Tabela 18. Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco A4938G do gene da miostatina

Caráter	CV	Probabilidade	R^2
PN	4,14	0,6551	0,8840
PV35	9,93	0,8116	0,5303
PV41	9,26	0,8315	0,6083
PV42	9,41	0,9459	0,6168
GP	15,38	0,7173	0,5914
GP35	10,49	0,8036	0,5312
GP41	9,66	0,8224	0,6067
GP42	9,84	0,6145	0,9405
CA	12,92	0,8509	0,3643
EF	12,47	0,8932	0,3733
PA	9,16	0,9098	0,6161
PC	12,16	0,9071	0,5820
PEIT	11,90	0,9990	0,5628
PPEIT	5,02	0,2824	0,6122
CARR	12,40	0,9786	0,5263
CARC	10,84	0,9155	0,5949
PCARC	2,86	0,5812	0,3071
GA	29,34	0,4456	0,4646
PGA	24,28	0,2968	0,4955
FI	13,79	0,9624	0,3163
COR	17,38	0,6618	0,4964
PU	22,51	0,3902	0,2945
MO	11,42	0,6492	0,4228
CI	7,06	0,8933	0,3408

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso da carcaça residual; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

Tabela 19. Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco D6619-6631 do gene MyoD

Caráter	CV	Probabilidade	R^2
PN	4,10	0,3711	0,8863
PV35	9,90	0,6549	0,5332
PV41	9,26	0,8455	0,6081
PV42	9,39	0,8245	0,6183
GP	15,13	0,2220	0,6047
GP35	10,46	0,6923	0,5333
GP41	9,67	0,8681	0,6061
GP42	9,82	0,8506	0,6157
CA	12,94	0,9425	0,3624
EF	12,46	0,8421	0,3743
PA	9,16	0,9158	0,6160
PC	12,14	0,7964	0,5835
PEIT	11,85	0,7695	0,5661
PPEIT	5,07	0,5041	0,6043
CARR	12,36	0,7775	0,5295
CARC	10,80	0,7444	0,5973
PCARC	2,85	0,4960	0,3102
GA	29,49	0,6367	0,4591
PGA	24,49	0,5384	0,4870
FI	13,60	0,3568	0,3352
COR	17,47	0,9053	0,4915
PU	22,56	0,4619	0,2911
MO	11,37	0,4908	0,4273
CI	6,90	0,1749	0,3704

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso da carcaça residual; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

Tabela 20. Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco T455C do gene da miogenina

Caráter	CV	Média		Probabilidade	R^2
		genótipo T/T	genótipo T/C		
PN	4,07	44,14	44,48	0,1819	0,8859
PV35	9,73	798,60	827,47	0,1357	0,5424
PV41	8,97	1.018,93	1.063,63	0,0510 [†]	0,6272
PV42	9,03	978,81	1.028,59	0,0263 [*]	0,6425
GP	14,88	219,48	236,47	0,0368 [*]	0,6120
GP35	10,29	754,88	782,86	0,1479	0,5423
GP41	9,37	975,21	1.019,02	0,0557 [†]	0,6248
GP42	9,44	935,08	983,99	0,0291 [*]	0,6394
CA	12,68	2,70	2,59	0,1592	0,3788
EF	12,13	0,38	0,40	0,0750 [†]	0,3986
PA	8,70	81,02	85,61	0,0099 ^{**}	0,6493
PC	11,83	206,50	217,31	0,0752 [†]	0,5990
PEIT	11,52	154,88	163,15	0,0647 [†]	0,5838
PPEIT	5,08	15,64	15,77	0,8311	0,5950
CARR	11,66	181,29	196,65	0,0056 ^{**}	0,5755
CARC	10,39	625,01	662,26	0,0245 [*]	0,6224
PCARC	2,82	63,72	64,26	0,2140	0,3115
GA	28,54	16,49	19,31	0,0320 [*]	0,4863
PGA	24,05	1,67	1,85	0,0935 [†]	0,4981
FI	13,30	25,72	27,52	0,0373 [*]	0,3559
COR	17,25	6,07	6,31	0,3713	0,4962
PU	21,88	7,53	8,49	0,0262 [*]	0,3239
MO	11,15	26,96	28,31	0,0703 [†]	0,4419
CI	6,99	158,33	160,15	0,4925	0,3431

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso da carcaça residual; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

** significativo a $P \leq 0,01$; * significativo a $P \leq 0,05$ e [†] significativo a $P \leq 0,10$.

Os genótipos dos genes da miostatina e MyoD não apresentaram efeito significativo sobre nenhum dos caracteres estudados. Houve efeito estatisticamente significativo do loco T455C da miogenina nos caracteres PA e CARR a 1%, e caracteres PV42, GP, GPN42, CARC, GA, FI e PU a 5%.

O loco miog_13 não apresentou efeito estatisticamente significativo sobre nenhum dos caracteres, enquanto que o loco miog_16 afetou o caractere EF ($P < 0,05$). O loco intragênico gerado pelos três polimorfismos da miogenina afetaram os caracteres CARR ($P < 0,01$), CARC e PU ($P < 0,05$).

Modelo multigênico (*Multi-gene Model*)

A análise multigênica quando comparada à análise de um único gene tem como objetivo avaliar todas as fontes de variação do fenótipo incluindo os efeitos fixos de genótipo de todos os genes. Em geral, esta análise tende a reduzir a estimativa do efeito do genótipo dos genes isoladamente, uma vez que diminui o número de graus de liberdade do resíduo (Bovenhuis et al, 1992). Os resultados da análise de variância no modelo multigênico são apresentados na tabela 21.

Tabela 21. Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV) e coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo multigênico

Caráter	CV	Miostatina	Miogenina	MyoD	R^2
PN	4,12	0,6257	0,2524	0,4283	0,8911
PV35	9,95	0,7873	0,1773	0,8150	0,5487
PV41	9,18	0,8060	0,0578 [†]	0,8595	0,6312
PV42	9,28	0,9222	0,0359 [*]	0,9745	0,6437
GP	14,75	0,6805	0,0199 [*]	0,0948	0,6403
GP35	10,53	0,7806	0,1889	0,8438	0,5482
GP41	9,60	0,7975	0,0618 [†]	0,8676	0,6288
GP42	9,71	0,9177	0,0387 [*]	0,9846	0,6405
CA	13,01	0,9055	0,1754	0,8943	0,3826
EF	12,43	0,9394	0,0852 [†]	0,7895	0,4036
PA	8,88	0,8556	0,0084 ^{**}	0,7281	0,6543
PC	12,12	0,8584	0,0826 [†]	0,8929	0,6024
PEIT	11,85	0,9958	0,0899 [†]	0,9272	0,5848
PPEIT	5,09	0,3092	0,9915	0,5313	0,6213
CARR	11,96	0,9439	0,0075 ^{**}	0,8730	0,5783
CARC	10,65	0,8707	0,0324 [*]	0,8988	0,6254
PCARC	2,86	0,5922	0,2000	0,6043	0,3347
GA	28,90	0,4957	0,0509 [†]	0,6401	0,5023
PGA	24,15	0,3140	0,1434	0,5327	0,5222
FI	13,46	0,8312	0,0419 [*]	0,3764	0,3761
COR	17,64	0,6205	0,3510	0,8574	0,5057
PU	21,83	0,2944	0,0164 [*]	0,4430	0,3644
MO	11,33	0,8099	0,0976 [†]	0,5960	0,4552
CI	7,00	0,8839	0,4198	0,1654	0,3787

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso da carcaça residual; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

** significativo a $P \leq 0,01$, * significativo a $P \leq 0,05$, [†] significativo a $P \leq 0,10$.

Sabendo-se que a análise do modelo de um único gene para os genes da miostatina e MyoD não revelou qualquer associação genótipo-fenótipo, a análise multigênica confirmou este resultado, evidenciando o efeito de genótipo do loco T455C do gene da miogenina sobre algumas das características quantitativas de desempenho e carcaça.

Os efeitos de interação entre os genótipos dos locos analisados dois a dois não foram estatisticamente significativos para nenhuma das características estudadas e portanto não foram incluídos no modelo.

A importância dos genes da miostatina e MyoD para o desenvolvimento muscular é evidente. Contudo, não houve associação dos polimorfismos estudados com nenhuma das características fenotípicas, no entanto vale ressaltar que muitos outros polimorfismos podem ser explorados em outras regiões destes genes, as quais estejam de fato exercendo uma maior influência sobre sua função biológica.

4.3.5 Miostatina e o mapeamento de QTLs no cromossomo 7

Apesar do polimorfismo do gene da miostatina avaliado neste trabalho não ter apresentado efeito significativo sobre as características quantitativas estudadas, resultados descritos na literatura sugerem que a miostatina ou outros genes presentes na mesma região cromossômica estão influenciando características quantitativas relacionadas não só ao desenvolvimento do tecido muscular como também do tecido adiposo. Em um estudo realizado por Zhiliang et al. (2003) com o gene da miostatina em frangos, polimorfismos presentes na região regulatória foram associados a características de peso e porcentagem da gordura abdominal, peso ao nascimento, peso e porcentagem de músculos peitorais. No cromossomo 7, QTLs para características de peso da gordura abdominal ajustado para peso de carcaça e gordura da pele ajustada para peso da gordura abdominal, foram mapeados por Ikeobi et al. (2002) entre os marcadores LEI0064 e ROS0019. Embora grande parte dos genes localizados entre estes marcadores não tenham sido identificados até o momento, sabe-se que o gene da miostatina se encontra próximo ao marcador LEI0064 (www.ensembl.org), situado na posição de 165 cM do mapa genético consenso da galinha (poultry.mph.msu.edu).

4.3.6 MyoD e o mapeamento de QTLs no cromossomo 5

O gene MyoD está situado no cromossomo 5, entre os marcadores ADL0247 e MCW0193 (www.ensembl.org) localizados nas posições de 34 cM e 50 cM do mapa genético consenso (poultry.mph.msu.edu), respectivamente. QTLs associados a peso da gordura abdominal, peso da gordura abdominal ajustado para peso da carcaça e gordura da pele ajustada para peso da gordura abdominal foram mapeados neste cromossomo (Ikeobi et al., 2002), porém nenhum QTL foi mapeado entre os marcadores que flanqueiam este gene. O marcador MYOD1, localizado na sequência do gene não está presente no mapa de ligação consenso e até o momento não foi utilizado em estudos de mapeamento de QTL.

4.3.7 Genotipagem seletiva na análise de genes candidatos

A metodologia de genotipagem seletiva descrita por Lander & Botstein (1989) e recomendada por Rothschild & Soller (1999) para o estudo de associação de genes candidatos se mostrou inadequada para a identificação dos genes candidatos funcionais neste trabalho. Os resultados obtidos pelo teste qui-quadrado foram contraditórios àqueles obtidos pela análise de variância para todos os genes genotipados na geração F2, em especial para o gene da miostatina. O resultado obtido com este gene no teste qui-quadrado sugeriu que o loco A4938G apresentava maior relevância por indicar diferença na frequência do alelo G entre os grupos de animais leves e pesados ($P = 0,089$) segundo a distribuição da característica PV42. Porém, a análise de variância no modelo de único gene revelou um resultado inesperado, pois não apresentou qualquer tendência de associação dos genótipos com este caractere ($P = 0,9459$). Possivelmente a redução do número de famílias genotipadas para a análise de variância pode ter levado a este resultado contraditório, uma vez que há a possibilidade de existir um efeito de interação entre família e genótipo. Entretanto, este efeito só poderia ser detectado com a genotipagem deste loco em todas as famílias.

4.3.8 Efeito da miogenina sobre as características de desempenho e carcaça

A massa muscular de um indivíduo é determinada pelo número e tamanho das miofibras. O número de células precursoras do músculo é estabelecido ainda na fase pré-natal em que o desenvolvimento muscular é controlado por fatores miogênicos e de crescimento (Te Pas, 2004). Sendo assim, um indivíduo possui um número limitado de fibras musculares após o nascimento, momento a partir do qual o crescimento muscular é decorrente da hipertrofia das miofibras. No desenvolvimento muscular, a miogenina atua na fase de diferenciação dos mioblastos e sua expressão ocorre mediante a inibição da proliferação celular mediada pela miostatina, evento imprescindível para que possa haver diferenciação celular (Thomas et al., 2000). Este gene tem se revelado de grande importância na produção de carne devido ao fato da sua expressão limitar a proliferação de novas células precursoras durante a miogênese (Te Pas, 2004). Em estudos realizados com aves, embriões com maior capacidade de desenvolvimento muscular de uma linhagem selecionada para corte apresentaram um atraso na expressão deste gene quando comparados à linhagem de postura (Alvares, 2001). Este atraso poderia permitir que a proliferação celular continuasse por mais tempo, levando a um aumento no número de mioblastos e conseqüentemente do número de miofibras (Alvares, 2001). Estudos de associação deste gene com características quantitativas de desempenho e carcaça têm sido realizados em populações comerciais de suínos e têm mostrado que este gene apresenta efeitos significativos em uma série de caracteres de crescimento e carcaça (Te Pas et al., 1999; Te Pas, 2004).

O gene da miogenina está situado no microcromossomo 32, no qual QTLs não foram mapeados até o momento. No presente estudo, embora a miogenina tenha sido associada aos caracteres PV42 ($P = 0,0263$), GP42 ($P = 0,0291$), GP ($P = 0,0368$), CARC ($P = 0,0245$), PA ($P = 0,0099$), CARR ($P = 0,0056$) e GA ($P = 0,0320$), não é possível afirmar que este gene seja de fato responsável pelo seu efeito quantitativo. Sempre haverá a possibilidade de que o gene estudado não seja o gene que realmente esteja causando a diferença na característica, mas esteja somente ligado ao QTL (Rothschild & Soller, 1999). Em geral, as características quantitativas são determinadas

por muitos genes os quais podem exercer efeitos pleiotrópicos ou de epistasia. Muitas vezes, o estudo isolado de um único gene pode levar a resultados contraditórios quando analisados em populações diferentes, pois desconsidera todas as demais variáveis envolvidas na formação da característica. Deve-se destacar que as bases genéticas envolvidas na variação das características quantitativas são complexas, o que dificulta a identificação vários genes os quais podem explicar grande parte da variação do caráter.

Associações de genes candidatos são tipicamente descobertas em gerações específicas de uma população específica. Conseqüentemente, há sempre a possibilidade de que os efeitos sejam limitados à determinada população, ou mesmo a uma determinada geração. Por exemplo, o gene candidato na população estudada pode estar em transiente desequilíbrio de ligação com um dos atuais QTLs, localizado a alguma distância deste, ou mesmo em outro cromossomo afetando a variação do fenótipo (Rothschild & Soller, 1999). Quando o efeito do gene candidato é devido a um desequilíbrio de ligação com um gene próximo, este efeito pode-se limitar a uma determinada população. O mesmo pode acontecer se o efeito do gene candidato é causado pela interação de alelos com um *background* genético específico da população estudada (Rothschild & Soller, 1999). Desta forma, apesar dos resultados obtidos com o marcador T455C da miogenina terem sido significativos, a validação deste polimorfismo como marcador deve ser confirmado em uma ou mais gerações futuras da mesma população, em outras populações da mesma linhagem ou mesmo em outras linhagens. Vale ressaltar que neste trabalho o marcador T455C foi analisado dentro de uma população referência de delineamento experimental específico para que fosse alcançado um desequilíbrio de ligação entre os locos de interesse.

Deve-se considerar também que os locos estudados nos genes da miostatina e MyoD, assim como a miogenina podem revelar resultados diferentes se avaliados em outras populações. Desta forma, os resultados obtidos na avaliação dos efeitos destes polimorfismos como marcadores associados a características de desempenho e carcaça podem se aplicar somente à população estudada neste trabalho.

5 CONCLUSÃO

- Foram identificados polimorfismos em fragmentos clonados dos genes da miostatina, Myf5, MRF4 e miogenina, e pelo seqüenciamento dos produtos de PCR do gene MyoD em parentais do cruzamento TC. Entretanto, não foi possível a validação destes nos genes Myf5 e MRF4.
- No gene da miostatina, nenhum dos polimorfismos detectados em clones foram validados em parentais do cruzamento TC, sendo que um novo polimorfismo denominado A4938G foi descoberto em parentais da linhagem CC de postura. No gene da miogenina foi possível validar quatro sítios polimórficos detectados previamente em clones, dos quais dois foram identificados somente em parentais da linhagem TT. No fragmento estudado do gene MyoD, foi validado um único polimorfismo caracterizado pela deleção de 13 pares de base, o qual foi encontrado somente em parentais da linhagem TT de corte.
- O estudo dos polimorfismos validados dos genes MyoD, miogenina e miostatina resultou na identificação de um marcador no gene da miogenina, o qual apresentou efeito significativo na variação dos caracteres: peso vivo ao 42 dias, ganho de peso do nascimento aos 42 dias de idade, ganho de peso dos 35 aos 42 dias de idade, peso da carcaça, das asas, peso da carcaça residual, peso da gordura abdominal, fígado e pulmão.

- Não foi verificado efeito de interação entre os genes MyoD, miogenina e miostatina sobre as características quantitativas.

ANEXOS

ANEXO A. Reações de PCR otimizadas para a genotipagem.

Reação otimizada para os *primers* MST2D/MST2R para temperatura de anelamento de 55°C, utilizados na a genotipagem da miostatina.

Reagentes	1x (25 µl)
H ₂ O _{miliQ}	10,3 µl
Tampão F*	5,0 µl
P _D (2pmoles/µl)	2,5 µl
P _R (2pmoles/µl)	2,5 µl
dNTP (10mM)	1,0 µl
Taq polimerase	0,2 µl
DNA(20ng/µl)	5,0 µl

* PCR Optimizer *kit*

Reação otimizada para os *primers* PD300/R10 para temperatura de anelamento de 58°C, utilizados na genotipagem da miogenina.

Reagentes	1x (25 µl)
H ₂ O _{miliQ}	10,3 µl
Tampão F*	5,0 µl
P _D (2pmoles/µl)	2,0 µl
P _R (2pmoles/µl)	2,0 µl
dNTP (10mM)	1,0 µl
Taq polimerase	0,2 µl
DNA(20ng/µl)	5,0 µl

* PCR Optimizer *kit*

Reação otimizada para os *primers* PDMyoD3/PRMyoD para temperatura de anelamento de 65°C, utilizados na genotipagem do gene MyoD.

Reagentes	1x (25 µl)
H ₂ O _{miliQ}	9,7 µl
Tampão 10x	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	2,0
P _D (2pmoles/µl)	2,0 µl
P _R (2pmoles/µl)	2,0 µl
dNTP (10mM)	1,0 µl
Taq polimerase	0,3 µl
DNA(20ng/µl)	5,0 µl

ANEXO B. Polimorfismos detectados pelo sequenciamento de clones do gene da miostatina.

Polimorfismos detectados no *contig* referente a extremidade 3'- 5' do gene da miostatina, o qual inclui 49 *reads*. A posição é referente a numeração da sequência do *contig*. A identificação dos polimorfismos é referente a numeração dos nucleotídeos na sequência completa do gene, disponível no *GenBank* sob ID - AF346599.

Contig 1:

CTGGGAATGTGACAGCAAGATCTCGTCCAGTCTCATCAAAAGCTTTATTTTCGATGCCTAAATTGGATTCAAGGCTGTT
TGAGCCAATTTTGCAGCACTGTCTTCACATCAATACTCTGCCAGATACCAGTGCCTGGGTTCATGTCAAGTTTCAAAG
ATCGAATCCAGTATATCTTGTACCGTCTTTCATGGGCTTAATGAGTCTCAGGATCTGCACAAACACCGTTGTAGGTTT
TTGGACTTGCTCAAGTATATCCATAATTGTGCCTTTACTACTTTGTTATATTGTATTTAGAGCTAAACTTAAAGAAG
CAACATTTTGGTTTTCCCTCCATTTGTACAAGAAATCAGCTATAAATGAATGGAAAGAACAATTACTGAACAGGG
AACAAAAAGAAATATGCATATATAACCAATTTTTTCCAGATCATGTAGGATGTCTTACAATATTACATAAACTGTA
TTGGTAACAGAGTGGATGCAATATCATTCAATTTCTGTACTTTACATTCTACAGCAAATCTAATCATTATGCTGTCACC
TACAAGTAACATTCTGTGACAAGGAAGTATGGTTGTTTTGTAAGCAGGCTAAAAGAAAGTTTGGCTAACCATTTTCT
AAGTAAGTGTAGCTGATCCCTTGCGCTCTGTAGGCTATGCGGAGTGAGCGATGTGTACAGGCAGAAATTCAGGAATA
TGATAGCAGAGAAAGAAAGCACTGCAGTGGGACCCC

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
4830	CC	57	41	A	G	1
4789	CC e TT	57	82	G	C	2
4770	TT	59	101	C	T	1
4717	TT	52	154	A	G	1
4600	TT	62	271	T	C	1
4576	TT	43	295	T	A	1
4571	TT	62	300	C	T	1
4544	TT	62	329	T	Deleção	1
4542	TT	57	331	T	Deleção	1
4525	TT	68	346	G	A	1
4405	CC e TT	59	466	T	G	14
4360	TT	48	511	T	C	18

Polimorfismos detectados no *contig* referente a extremidade 5'- 3'do gene da miostatina, o qual inclui 51 *reads*. A posição é referente a numeração da sequência do *contig*. A identificação dos polimorfismos é referente a numeração do gene, disponível no *GenBank* sob ID - AF346599.

Contig 2:

AGGGCGTTTTGAATTTAGCCGCCGGAATTCCCCCTTAGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCAC
 AACCGAGACGATTATCACAATGCCTACGGAGTGTAAGTAACAACCTGTGCTTTTCGTCTCGCACCGCTCCTCTGAGA
 GTTGTCTCTGTGCTGTAGAGCCTCACAACCTCTCTCAGGCTCTCCCAACAGGCTGCTGGCTGGAGTCTGCCGGAGGG
 AGGGAGGAGAGTGTATTTCTAAAGGATTTGAGTCAGGTTCAAATGACCGTGCTGCAAGCCTTTGTTTTACTGTTCAAT
 TGTTCGGCTCCTTGTAACGTGTGTGCCCTGTAGCACACTTAAGATTTGCCAATTGCTTTAGAAAGCAAAAGGAGATCC
 GCAGTTCAGTTGGCTCTGTTATTGCGGCATTGAGGGCATTCCCTATTGCAGATAGAAAATGCAAGTGCAGCTAATAAG
 ATAAGTGTGTTTTCTGCATGACATTCCACCTGTGTGTGCTTAAGAGCAATAGAAACGAGTAGAAATACAGCTTAG
 AGCAGGGACCCGCTAAACTACAGCGTGTACAGCAAGTGTAAGCATAGAGTTAAATCCTTGCTTCTCTGCTGATCCCA
 TGAGCCAGCACCCACCTCTAAGTTAAACTATGTATTTAAAGCAGATCTACGTGTAACAGATTTAAATGCTAAAG
 TGTCCACATTATAGCAATCAGCTCCAGTAGTCGTGCCAAGGAAGAATGAGGCATTTACTGAATGAGCAGATTCTAGTT
 ATCTTCTTAGTGCTAACATCTGCTACG

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
2374	CC e TT	46	61	C	T	17
2440	TT	57	127	C	T	3
2489	CC e TT	44	176	G	A	3
2740	CC e TT	57	427	G	A	3
2841	CC	30	528	G	A	9
2870	CC e TT	39	557	C	T	12
2883	TT	43	570	C	T	3

ANEXO C. Polimorfismos detectados pelo seqüenciamento de clones do gene da miogenina.

Polimorfismos detectados no *contig* 1 da extremidade 5', de cinco *reads*, do gene da miogenina. A posição é referente ao tamanho do fragmento seqüenciado.

Contig 1:

GGCCGCGAATTCGTCCTTAGGCTGAAGAAGGTGAACGAAGCCTTCGAGGCTCTGAAACGCAGCACTCTGCTCAACCC
CAACCAGCGGCTGCCAAGGTGGAGATCCTGCGCAGCGCCATCCAGTACATCGAGCGCCTGCAGAGCCTGCTCAGCA
GCCTCAACCAGCAGGAGCGGAGCAGAGGGAGCTGCGCTACCGCCCCGCTGCACCACAACCTGCTGTGAGTGTGGGG
ATGGGTGGGGATGGGGGGCAGGAGCCGGGTGGGTGGTGATGGAGGGACGGGGTGGTGATGCTCAGGTTGTTGTCC
CTGTGGGCGGGTGTGGTGGGTGATGGGCTGATGGCCGTTGCATTGAGCAGAGTGGGTGGTGGTGCTTGGTGGGGA
GTGGGAAGGCTTAAGTCGTAGAAATGATCGTAGAACCATGGGATCACAGAGCCATGGAATCATGGGGTCATAGAACC
ATGGGATCATAGAGTCATGGAATCATGGAATCACAGAGACATGGAACCATGGGATCATAGAGTCGTGGAATCATGGA
ATCACAGAGACATGGAACCATGGGATCATAGAGCCATGGAATCATGGGGTCATAGAGCCACGCAATCATACAGTCAC
GGAATCATACAGTCATAAAATCATAGGACCATAGAATCATGGAATCATAGAACCATGGACTCACAGAACCATGGAAT
CATGGCACCATAGGATGGGTGGGTGGATCTCAAAGATCTCCAGTTCCAATC

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
miog_1	TT	54	84	G	A	1
miog_2	TT	54	113	G	A	1
miog_3	CC	43	150	C	T	1
miog_4	CC	43	239	G	A	1
miog_5	CC	52	349	C	T	1
miog_6	TT	35	513	G	A	1
miog_7	CC	37	628	T	C	1

Polimorfismos detectados no *contig* 2 da extremidade 5', de sete *reads*, do gene da miogenina. A posição é referente ao tamanho do fragmento seqüenciado.

Contig 2:

GGCTGAAGAAGGTGAACGAAGCCTTCGAGGCTCTGAAACGCAGCACTCTGCTCAACCCCAACCAGCGGCTGCCAAG
GTGGAGATCCTGCGCAGCGCCATCCAGTACATCGAGCGCCTGCAGAGCCTGCTCAGCAGCCTCAACCAGCAGGAGCG
CGAGCAGAGGGAGCTGCGCTACCGCCCCGCTGCACCACAACCTGCTGTGAGTGTGGGGATGGGTGGGGATGGGGGG
CAGGAGCCGGGTGGGTGGTGATGGAGGGACGGGGTGGTGATGCTCAGGTTGTTGTCCCTGTGGGCGGGTGTGGTG
GGTGATGGGCTGATGGCCGTTGCATTGAGCAGAGTGGGTGGTGCTTGGTGGGGAGTGGGAAGGCTTAAGTCGT
AGAAATGATCGTAGAACCATGGGATCACAGAGCCATGGAATCATGGGGTCATAGAACCATGGGATCACAGAGCCAT
GGAATCATGGGGTCATAGAACCATGGGATCACAGAGCCATGGAATCATGGGGTCATAGAACCATGGGATCACAGAG
CCATGGAATCATGGGGTCATAGAACCATGGGATCATAGAGTCATGGAATCATGGAATCACAG

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
miog_8	TT	48	58	C	T	1
miog_9	CC	57	91	G	A	1
miog_10	CC	52	155	C	T	3
miog_11	TT	57	171	C	T	1
miog_12	TT	57	238	C	T	2
miog_13	CC	50	283	T	C	1
miog_14	CC	57	293	G	A	1
miog_15	CC	46	486	G	T	1

Polimorfismos detectados nno *contig* 3 da extremidade 3', de 39 *reads*, do gene da miogenina. A posição é referente ao tamanho do fragmento sequenciado.

Contig 3:

GGCCGCGAATTCGCCCTTCACAGTGTGCGAGGGGTAATTATGATTTCAGCTGCTGGATCCTTCCAGCATCACCATCC
 CACCCCGTTTCAGCTCAGAGAGCCGCGGGGCTTTGCGCCAGCTCAGTTTTGGACCCGCTCCTCTGGGAACGTCACGG
 CCACGTCTCCACGGCGATGCTCTCCACGATGGAGGAGAGCGAGTGGAGGTTGCGGTCTCTGCCTGGTCATCGCTCA
 GGAGGTGATCTGAGAGAGGAGGGGGAGGGCAATGGGATGGTGACCCACGACCCTACTCTGTGTGACCGCACTGAT
 GTGGGGATCCGCTCCCAGATCCCGTCCTGAGGACTGAGACCTTTCCCCAGAGGTGGCAACGGGCAGTGAACTTGGG
 GAAGCTTTTAGGGGTGGGAGAGGCAGCTCTGTGCGGGTGCTCTGTGCTGCAGGGCTGGGCTATGGGGCAGGCACAG
 ATGAACCCCTAATGGGACAGGGATGTGGAGCTGCTGCAGGCTGCTTCCAGCACATCAGGCAATGGGAGAAGCCTGAG
 TGCCTCAAGGAGTGCTGGAGGGTTCACCAACAGTGGGGTGGGGGGAGGACAAGGGTCCTCTGTCCCTGGCTGT
 GGGTTTTGGTTAGGGATGCTCACCCCCACCACTGTGGTGTCCCTGAAATGGATGCTGAG

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
miog_18	CC	57	124	T	C	1
miog_19	CC	41	129	A	C	1
miog_20	CC	52	136	C	T	1
miog_21	CC	43	140	G	A	1
miog_22	TT	57	149	G	C	1
miog_23	CC	62	155	C	T	1
miog_24	CC	52	156	C	T	2
miog_25	TT	57	196	C	A	1
miog_26	TT	62	209	C	T	1
miog_27	CC	43	215	G	A	2
miog_28	TT	57	219	C	T	2
miog_29	TT	62	224	C	G	1

Polimorfismos detectados no *contig* 4 da extremidade 3', de 76 reads, do gene da miogenina. A posição é referente ao tamanho do fragmento sequenciado.

Contig 4:

CCGGCCGCGAATTCGCCCTTCACAGTGTCTGGAGGGGTAATTATGATTTCAGCTGCTGGATCCTTCCAGCATCACCAT
 CCCACCCGTTTCCAGCTCAGAGAGCCGCGGGGCTTTGCGCCAGCTCAGTTTGGACCCGTCCTCTGGGAACGTCAC
 GGCCACGTCTCCACGGCGATGCTCTCCACGATGGAGGAGAGCGAGTGGAGGTTGCGGTCTCTGCCTGGTCGTCGCT
 CAGGAGGTGATCTGAGAGAGGAGGGGGAGGGCAATGGGATGGTGACCCACGACCCTACTCTGTGTGACCACACTG
 ATGTGGGGATCCGCTCCAGATTCCGTCTGAGGGCTGAGACCTTCCCCAGAGATGGCAACGGGCAGTGAAACTTG
 GGAAGCTTTAGGGGGTGGGAGAGGCAGCTCTGTGCGGGTGCTCTGTGCTGCAGGGCTGGGCTATGGGGCAGGCAC
 AGATGAACCCTTAATGGGACAGGGATGTGGAGCTGCTGCAGGCTGCTTCCAGCACATCAGGCAATGGGAGAAGCCTG
 AGTGCCTCAAGGAGTGCTGGAGGGTTCACCAACAGTGGGGTGGGGGGAGGACAAGGGTCCTCTGTCCCTGGC
 TGTGGGTTTGGTTAGGGATGCTACCCCCACCACTGTGGTGCTCCCTGAGATGGATGCTGAGGAAGGGGAGTTCCTT
 ACCTGCGGGG

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
miog_30	TT	54	145	A	G	1
miog_31	TT	54	150	T	C	1
miog_32	TT	57	152	C	T	1
miog_33	TT	33	174	G	A	1
miog_34	TT	62	179	G	A	2
miog_35	TT	35	203	A	G	1
miog_36	TT	52	216	G	A	1
miog_37	TT	57	225	C	T	1
miog_38	TT	27	229	C	T	2
miog_39	TT	42	242	A	G	1

Os polimorfismos miog_19, miog_23 e miog_24 também foram detectados neste *contig*, todos na linhagem TT, e portanto não foram listados novamente.

ANEXO D. Polimorfismos detectados pelo seqüenciamento de clones do gene MRF4.

Polimorfismos detectados no *contig* da extremidade 5'- 3' de 9 *reads*, do gene MRF4. A posição do polimorfismo é dada em referência a numeração das bases do *contig*.

Contig 1:

CGCGAATTCGCCCTTGGTGGTTTGTGGGTCAAACTTCGAGAAAACAAAACGGGAGATGCGGAGAGGGGTGAGGAA
 AGAGTCCGTGCGGCTCGGGTCTCCGAGGGCCGTTCCGCCGGGGGAGCGTGCCCCGAGGCGGCCGCGGCCGCGCC
 GCTCATTTCTCCACCGCTTCTCCGCGCCGGGCAGCTTGGGCTCGTCGGAGGAAATGCTGTCCACGATGGAGGAGAGG
 CAGCGCAGACTGCTGGAGGCCGACGACTCCACCATGGAGCCCCCTGCTCGGCGGGAGAGAGGGGTTAGGGAGCGGG
 CGCGGCCGGAACGAGGCCGCGGGGAGCCGCCGAGGGGCGGGAGCGCCGGGCTGTGAGCGAGCGCCGGGCGCGGC
 GGCCGTTACCTGCTTTGGGGCTGCCCCCAACGCGCGGGAATGGTCGGAAGCGCTGTGCCAGTCGGAGCCGAGGTG
 CTCAGGAAGTCGGAGCCGGGGACCTGCGGCGGGGCGCGGGGAGAGGGGACGCTGCGTTAGCGAGGCGAGCGGCGGC
 GGGGCGGCACGTTACCCCAACCCCCCTTCCCGCCCTGCGCTTCCCCCCCCACCCCC

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
mrf4_1	CC	37	60	G	A	2
mrf4_2	CC	48	64	A	T	2
mrf4_3	CC	59	88	C	T	2
mrf4_4	CC	54	232	G	A	2
mrf4_5	CC	62	285	G	A	2
mrf4_6	CC	52	294	G	A	1
mrf4_7	CC	57	326	C	T	1
mrf4_8	CC	57	331	G	T	1
mrf4_9	CC	57	347	G	T	4
mrf4_10	CC	43	453	C	T	2

Polimorfismos detectados no *contig* 2 da extremidade 3'- 5' de 205 *reads*, do gene MRF4. A posição do polimorfismo é dada em referência a numeração das bases do *contig*.

Contig 2:

GTTTAAACGCGAATTCGCCCTTGGTGGTCTGTGGGTCAAACTTCGAGAAAACAAAACGGGAGATACGGTGAGGGGT
GAGGAAAGAGTCCGTGCGGCTCGGGTCTCCGAGGGCCGTTCCGCCGGGGGAGCGTGCCCCGAGGCGGCCGCGCCG
CCGCGACGCTCATTTCTCCACCGCTCTTCCGCGCCGGGCAGCTTGGGCTCGTCGGAGGAAATGCTGTCCACGATGGA
GGAGAGGCAGCGCAGGCTGCTGGAGGCCGACACTCCACCATGGAGCCCCCTGCTCGGCGGGAGAGAGGGGTTAGG
GAGCGGGCGCGCCGCAACGAGGCCGCGGGAGCCGCCGCTGGGGCGGGAGCGCCGGGCTGTGAGCGAGCGCCGG
GCGCGGGCGGCCGTTACCTGCTTTGGGGCTGCCCCCAGCGCGCGGGAATGGTCGGAAGCGCTGTGCCAGTCGGAGCC
GCAGGTGCTCAGGAAGTCGGAGCCGGGGACCTGCGGCGGGGCGCGGGGAGAGGGGACGCTGCGTTAGCGAGGCGAG
CGGCGGCGGGGCGCGCACGTTACCCCAACCCCCCTTCCCGCCCCCTGCGCTCCCCCCCCACCCCCCGCGGCCGTCAG
CCCCCTGTCGGGGGGAGGAGGAGGGGAAGGAGGGAGGGGAGCGCGGGCCCGCAGCTGGGTGCCGAGGGAGCGGG
CCGCCGCCGTGCTTACGTTTCCCTGCTTGGGGCTGAAGCTGAAGGGGTCCGCCGCCACCTCCTGCATTTTGTCTTAAG
GGCGAATTCGCGG

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
mrf4_11	TT	57	74	G	T	3
mrf4_12	CC e TT	68	107	C	G	9
mrf4_13	CC e TT	41	108	G	A	9
mrf4_14	CC e TT	68	109	A	G	7
mrf4_15	TT	68	121	C	T	3
mrf4_16	CC	43	130	G	A	4
mrf4_17	CC e TT	53	147	C	G	3
mrf4_18	CC	68	151	C	G	6
mrf4_19	CC e TT	68	169	C	A	6
mrf4_20	TT	57	173	A	G	3
mrf4_21	TT	68	176	G	A	4
mrf4_22	CC	43	178	C	T	7
mrf4_23	CC e TT	68	189	C	G	6
mrf4_24	CC e TT	48	192	G	A	4
mrf4_25	CC e TT	68	193	C	T	3
mrf4_26	CC	44	195	G	A	5
mrf4_27	CC e TT	68	196	C	G	5
mrf4_28	CC e TT	41	202	C	T	3
mrf4_29	CC e TT	59	224	A	T	3
mrf4_30	CC	50	238	G	A	4
mrf4_31	CC	57	239	C	T	5
mrf4_32	CC e TT	68	247	G	A	11
mrf4_33	CC e TT	41	250	G	T	4

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
mrf4_34	TT	57	258	C	T	3
mrf4_35	CC e TT	50	260	G	T	3
mrf4_36	CC e TT	57	261	A	T	5
mrf4_37	CC	57	265	C	G	4
mrf4_38	CC	68	266	T	G	7
mrf4_39	CC	59	279	C	A	4
mrf4_40	TT	68	301	G	T	3
mrf4_41	TT	50	307	G	A	4
mrf4_42	TT	68	310	G	A	4
mrf4_43	CC e TT	42	311	C	T	3
mrf4_44	TT	68	320	C	T	3
mrf4_45	CC	57	323	G	A	3
mrf4_46	TT	57	327	C	T	4
mrf4_47	CC e TT	50	328	G	A	6
mrf4_48	CC	59	331	G	A	3
mrf4_49	CC	48	332	C	T	3
mrf4_50	CC e TT	59	334	G	T	3
mrf4_51	CC e TT	57	339	G	A	8
mrf4_52	CC e TT	68	344	G	A	8
mrf4_53	CC e TT	52	349	T	A	8
mrf4_54	CC e TT	68	353	G	T	3
mrf4_55	CC e TT	68	354	C	T	3
mrf4_56	CC e TT	68	374	C	T	10
mrf4_57	CC e TT	68	379	G	A	5
mrf4_58	CC e TT	57	380	C	T	4
mrf4_59	TT	57	385	C	A	3
mrf4_60	CC e TT	51	386	G	C	3
mrf4_61	CC	68	390	C	T	3
mrf4_62	CC e TT	51	392	G	A	4
mrf4_63	CC e TT	68	400	C	A	5
mrf4_64	CC e TT	50	402	G	A	5
mrf4_65	CC e TT	68	410	G	A	8
mrf4_66	CC e TT	54	411	C	A	6
mrf4_67	CC e TT	68	421	G	A	9
mrf4_68	TT	50	426	C	A	3
mrf4_69	CC e TT	62	438	G	A	4
mrf4_70	CC e TT	57	454	C	G	3
mrf4_71	CC e TT	57	459	C	T	3
mrf4_72	CC e TT	68	468	C	T	11
mrf4_73	TT	68	472	G	C	5
mrf4_74	CC e TT	41	473	G	A	3
mrf4_75	TT	62	476	G	A	4

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
mrf4_76	CC e TT	48	482	G	A	3
mrf4_77	CC e TT	68	483	C	T	7
mrf4_78	CC e TT	57	493	G	A	6
mrf4_79	TT	47	494	C	T	5
mrf4_80	TT	57	502	C	T	5
mrf4_81	CC e TT	52	503	G	T	3
mrf4_82	TT	57	516	A	G	3
mrf4_83	CC e TT	59	522	C	T	4
mrf4_84	CC e TT	57	539	G	A	3
mrf4_85	CC e TT	68	542	G	A	5
mrf4_86	CC	48	550	C	T	3
mrf4_87	CC	48	554	C	A	4
mrf4_88	TT	54	569	C	T	3
mrf4_89	CC e TT	59	580	C	A	10
mrf4_90	CC e TT	50	585	C	A	9
mrf4_91	CC e TT	48	586	T	C	6
mrf4_92	CC e TT	47	588	C	G	3
mrf4_93	CC e TT	57	594	C	A	4
mrf4_94	CC e TT	57	597	C	A	3
mrf4_95	CC e TT	57	662	C	T	5
mrf4_96	CC	43	732	A	G	3
mrf4_97	CC	57	735	G	T	3
mrf4_98	CC e TT	57	739	C	G	5
mrf4_99	CC	48	743	G	T	4
mrf4_100	TT	41	756	T	A	4

ANEXO C. Polimorfismos detectados pelo seqüenciamento de clones do gene Myf5.

Polimorfismos detectados no *contig* gerado pelo seqüenciamento da extremidade 5'- 3' de 42 *reads*, do gene Myf5. A posição dos polimorfismos é dada em referência a numeração das bases do *contig*.

Contig:

GGCCGCGAATTCGCCCTTGGTACATCGAAAGCTTCCAGGAGCTCTTGAGGGAACAGGTGGAGAACTACTATCACCTG
CCGGGACAGAGCTGCTCCGAGCCCACCAGCCCCAGCTCCAGCTGCTCCGATGTGATGGTAAGAGCAGGGCAGGGTGA
GGGGCAGCTCACGATGGGCTCGAGCAAGGGCCCTCGGTTTTGGGACTTCGGGAAAAGGTGGATAGCTTGGGTAAAT
CTCAAAAATGTTGGACGGTTGGGTTCACCGGCTCTTTCTGGAGCTGAGCGTGCACATGGGCTTTGGGGCACCCA
ACACGCGCCCCGGGCCCTGCTCGCCCTTTGTCCCTGCTTGGGGCCGTGCGTGGGGAGGGAGGCGCGACCCGGCTG
GAGCTCTACCGGGACGCTTCGGGGGGCTGCGGGGGCGGACGGGCGGCACTGGCCCTCGCTGTCTTGCAGGCGGAC
TGCGGCAGCCCGGTCTGCGCGGCGAGAGGCAGCAGCTTCGAGGCGGGCTACTGCCCCGAGATGCCCCACGTAAGGC
CGGCGGCGGGCGGGGGCGGGGGCGGCCGGCGGGCGGGGTGCGGGCTGGGCGGCCCGCGGTAAGCGGCTCGCCC
CGGTGCCAGGTACGCGACGGAGCAGAGTGGCGCGCTGTCCAGCCTGGACTGCCTCTCCAGCATCGTGGACCGCTC
TCTCCGGCGGAGGAGCCGGGGTGCCCTCCGTCACGCGGGCTCCCTCTCGCCAGGCGCCAGCATCGACTCGGGGCC
CGGGACGCCCGGTCTGCGCGCGCCCCGACGACCTACCAGGCGCTATGAGGGGCCGGGGCCACCGCCGGTTCAAAAA
ATGACCCCGGCTGCCTCTCGTCCCGCGCCCCGAAAACCTCTCGGGCGGGAGGGAAAACCCCGGCTCCGCTGCCGT
CGGGGTTGGAGGCGACGCCCGCGCCGAGCAGCCCCGGGGCTCGGGACGCGTGTGCTGCCGTGGAACCCCGCTG
CAAAAAAGCGTGCTACCAAAGGGCGAATTCGCGG

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
680	TT	53	176	G	A	4
690	TT	68	186	C	T	4
696	CC e TT	39	192	T	C	4
697	CC e TT	20	193	T	A	4
698	CC e TT	41	194	T	G	4
726	TT	32	222	T	G	2
733	CC	48	229	A	T	2
756	TT	28	252	T	G	2
800	CC e TT	68	296	C	A	2
847	CC e TT	25	354	G	A	2
883	TT	28	381	C	T	2
891	CC e TT	57	389	G	C	2
916	TT	68	415	G	A	2
923	CC e TT	59	422	C	A	4
930	CC e TT	68	429	G	A	2
965	CC e TT	37	463	C	G	2

Identificação	Linhagem	Qualidade	Posição	Consenso	Mutante	Frequência
1021	TT	30	519	C	G	5
1045	CC e TT	41	543	G	A	2
1046	TT	59	544	C	A	2
1059	TT	36	557	G	A	2

ANEXO F. Valores de probabilidade F da análise de variância dos polimorfismos miog_13, miog_16 e dos haplótipos obtidos pela análise dos três locos validados.

Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco miog_13 da miogenina.

Caracteres	CV	Probabilidade	R^2
PN	4,14	0,9257	0,8823
PV35	9,89	0,9983	0,5275
PV41	9,21	0,8612	0,6063
PV42	9,34	0,7530	0,6167
GP	15,30	0,5205	0,5899
GP35	10,44	0,9893	0,5283
GP41	9,62	0,8509	0,6047
GP42	9,77	0,7428	0,6144
CA	12,85	0,7826	0,3620
EF	12,40	0,9991	0,3713
PA	9,07	0,3995	0,6189
PC	12,10	0,9119	0,5809
PEIT	11,80	0,7710	0,5634
PPEIT	5,08	0,7924	0,5951
CARR	12,29	0,5963	0,5279
CARC	29,21	0,2652	0,4617
PCARC	24,38	0,3516	0,4843
GA	10,77	0,8480	0,5941
PGA	2,86	0,6540	0,2985
FI	13,59	0,2670	0,3273
COR	17,25	0,3735	0,4961
PU	22,56	0,4630	0,2810
MO	11,19	0,1018	0,4372
CI	7,01	0,6811	0,3403

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso das costelas; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

** significativo a $P \leq 0,01$; * significativo a $P \leq 0,05$ e † significativo a $P \leq 0,10$.

Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) de acordo com o modelo de um único gene para o loco *miog_16* da *miogenina*.

Caracteres	CV	Probabilidade	R^2
PN	4,04	0,1018	0,8877
PV35	9,84	0,3990	0,5323
PV41	9,13	0,2502	0,6136
PV42	9,21	0,1527	0,6273
GP	15,14	0,1686	0,5984
GP35	10,40	0,4358	0,5324
GP41	9,54	0,2733	0,6112
GP42	9,64	0,1693	0,6242
CA	12,57	0,0702	0,38997
EF	12,04	0,0397	0,4074
PA	8,96	0,1207	0,6278
PC	11,89	0,1156	0,5951
PEIT	11,71	0,2864	0,5699
PPEIT	5,08	0,9346	0,5947
CARR	12,06	0,0859	0,5457
CARC	29,38	0,5240	0,4553
PCARC	24,51	0,7803	0,4786
GA	10,60	0,1308	0,6070
PGA	2,84	0,2700	0,3083
FI	13,58	0,2528	0,3280
COR	17,08	0,1474	0,5062
PU	22,54	0,3952	0,2828
MO	11,33	0,3193	0,4237
CI	6,95	0,2514	0,3508

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso das costelas; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

** significativo a $P \leq 0,01$; * significativo a $P \leq 0,05$ e † significativo a $P \leq 0,10$.

Valores de probabilidade do teste F, coeficiente de variação (CV), coeficiente de determinação (R^2) da análise de variância dos haplótipos, levando-se em consideração os três locos da miogenina. Ao todo foram encontrados cinco genótipos na população.

Caracteres	CV	Probabilidade	R^2
PN	4,14	0,5492	0,8868
PV35	9,70	0,1557	0,5674
PV41	8,95	0,0836	0,6393
PV42	9,14	0,0683	0,6465
GP	15,11	0,2966	0,5999
GP35	10,26	0,1699	0,5670
GP41	9,36	0,0917	0,6367
GP42	9,57	0,0761	0,6432
CA	12,72	0,4023	0,3845
EF	12,23	0,3500	0,3969
PA	8,97	0,0680	0,6415
PC	12,10	0,2515	0,5933
PEIT	11,42	0,0698	0,6088
PPEIT	4,99	0,4906	0,6160
CARR	11,55	0,0095	0,6001
CARC	28,61	0,0859	0,4876
PCARC	23,75	0,1239	0,5157
GA	10,39	0,0396	0,6377
PGA	2,76	0,1991	0,3691
FI	13,53	0,2805	0,3649
COR	17,00	0,4964	0,5191
PU	21,17	0,0135	0,3988
MO	11,41	0,5816	0,4408
CI	7,23	0,5750	0,3651

PN - peso ao nascimento; PV35, PV41, PV42 - peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; GP - ganho de peso dos 35 aos 42 dias; GP35, GP41 e GP42 - ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, respectivamente; CA - conversão alimentar; EF - eficiência alimentar; PA - peso da asa; PC - peso da coxa; PEIT - peso do peito; PPEIT - porcentagem de peito; CARR - peso das costelas; CARC - peso da carcaça; PCARC - porcentagem de carcaça; GA - peso da gordura abdominal; PGA - porcentagem de gordura; FI - peso do fígado; COR - peso do coração; PU - peso do pulmão; MO - peso da moela; CI - comprimento do intestino.

** significativo a $P \leq 0,01$; * significativo a $P \leq 0,05$ e † significativo a $P \leq 0,10$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARES, L.E. Quantificação da expressão dos fatores miogênicos e de Pax-3 durante o desenvolvimento embrionário de aves. Rio Claro, 2001. 132p. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho”.
- AMILLS, M.; JIMÉNEZ, N.; VILLALBA, D.; TOR, M.; MOLINA, E.; CUBILÓ, D.; MARCOS, C.; FRANCESCH, A.; SÀNCHEZ, A.; ESTANY, J. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. **Poultry Science**, v.82, p.1485-1493, 2003.
- ANDERSON, L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H.; KNOTT, S.A; JOHANSSON, M.; ANDERSON, K.; ANDERSON-EKLUND, L.; EDFORS-LILJA, I.; FREDHOLM, M.; HANSSON, I. HAKANSSON, J.; LUNDSTROM, K. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.263, p.1771-1774, 1994.
- ARNOLD, H.H.; BRAUN, T. Genetics of muscle determination and development. **Current Topics in Developmental Biology**, v.48, p.129-164, 2000.
- BLAGDEN, C.S.; HUGHES, S.M. Extrinsic influences on limb muscle organization. **Cell Tissue Research**, v.296, p.141-150, 1999.

- BOARDMAN, P.E.J.; SANZ-EZQUERRO, I.M.; OVERTON, D.W.; BURT, D.W.; BOSCH, E.; FONG, W.T.; BROWN, W.R.A.; TICLE, S.A; WILSON, S.A.; HUBBARD, S.J. A comprehensive collection of chicken cDNA. **Current Biology**, v.12, p.1965-1969, 2002.
- BORYCKI, A.G.; STRUNK, K.; SAVARY, R.; EMERSON, C.P. JUNIOR . Distinct signal/response mechanisms regulate pax 1 and QmyoD activation in sclerotomal and myotomal lineages of quail somites. **Developmental Biology**, v.185, p.185-200, 1997.
- BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J. A. M.; KORVER, S. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v.75, p.2549-2559, 1992.
- BRAND-SABERI, B.; CHRIST, B. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. Review article. **Cell Tissue Research**, v.296, p.199-212, 1999.
- BRAUN, T. & ARNOLD, H.H. Inactivation of myf-6 and myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.14, p.1176-1186, 1995.
- BRAUN, T.; RUDNICKI, M.A.; ARNOLD, H.H.; JAENISCH, R. Target inactivation of the muscle regulatory gene Myf5 results in abnormal rib development and perinatal death. **Cell**, v.71, p.369-382, 1992.
- BRAUN, T.; BUSHHAUSEN-DENKER, G.; BOBER, E.; TANNICH, E.; ARNOLD, H.H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T $\frac{1}{2}$ fibroblasts. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.8, p. 701-709, 1989.

- BRAUN, T.; BOBER, E.; WINTER, B.; ROSENTHAL, N.; ARNOLD, H.H. Myf-6, a new member of the human gene family of myogenic determination factors: evidence for a gene cluster on chromosome 12. **European Molecular Biology Organization Journal**, v.9, p.821-831, 1990.
- BROOKES, A. J. The essence of SNP. **Gene**, v.234, p.177-186, 1999.
- BRYNE, P.F.; MCMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, v.7, p.24-27, 1996.
- BUCKNGHAM, M. Skeletal muscle formation in vertebrates. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.11, p.440-448, 2001.
- BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILLAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, v.202, p.59-58, 2003.
- BUMSTEAD, N.; PALYGA, J. A preliminary linkage map of the chicken genome. **Genomics**, v.3, p.690-697, 1992.
- BURT, D. W. Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, v.58, p.5-13, 2002.
- CAPDEVILA, J.; IZPISUÁ BELMONTE, J.C. Extracellular modulation of Hedgehog, Wnt and TGF- β signalling pathways during embryonic development. **Current Opinion in Genetics and Development**, v.9, p.427-433, 1999.
- CASTELHANO-BARBOSA, E.C. Estudo da expressão espacial e temporal do gene da miostatina durante o desenvolvimento embrinário da galinha (*Gallus gallus*). Piracicaba, 2001. 78p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

- CHIRST, B.; ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and Embryology**, v.191, p.381-396, 1995.
- CHRIST, B.; BRAND-SABERI, B. Limb muscle development. **International Journal of Developmental Biology**, v.46, p.905-914, 2002.
- CHRIST, B.; JACOB H. J.; JACOB, M. On the origin and development of ventro-lateral abdominal muscle in avian embryo. An experimental and ultrastructural study. **Anatomy and Embryology**, v.186, p.505-510, 1983.
- CINNAMON, Y.; KAHANE, N.; BACHELET, I.; KALCHEIM, C. The sub-lip domain - a distinct pathway for myotome precursors that demonstrate rostral-caudal migration. **Development**, v.128, p.341-351, 2001.
- COOPER, D. N.; KARAWCZAK, M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. **Human Genetics**, v.83, p.181-188, 1989.
- CRITTENDEN, L.; PROVENCHER, L.; SANTANGELO, L.; LEVIN, I.; ABPLANALP, H.; BRILES, R.; BRILES, W.E.; DODGSON, J. Characterization of a Red Jungle Fowl backcross reference population for molecular mapping of the chicken genome. **Poultry Science**, v.72, p.334-348, 1993.
- DAVIS, R.L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A.B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. **Cell**, v.51, p.987-1000, 1987.
- DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural traits. **Nature Reviews Genetics**, v.3, p.22-32, 2002.
- DE VRIES, A.G.; SOSNICKI, A.; GARNIER, J.P.; PLASTOW, G.S. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. **Meat Science**, v.49, p.S245-S255, suppl. 1, 1998.

- DENETCLAW, W.F.JR.; ORDAHL, C.P. The growth of the dermomyotome and formation of early myotome lineages in thoracolumbar somites of chicken embryos. **Development**, v.127, p.893-905, 2000.
- DUNN, I.C.; MIAO, Y.W.; MORRIS, A.; ROMANOV, M.N.; WILSON, P.W.; WADDINGTON, D. A study of association between genetic markers in candidate genes and reproductive traits in one generation of a commercial broiler breeder hen population. **Heredity**, v.92, p.128-134, 2004
- EDMONSON, D.G.; OLSON, E.N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. **Genes Development**, v.3, p. 628-640, 1989.
- EMARA, M.G.; KIM, H. Genetic markers and their application in poultry breeding. **Poultry Science**, v.82, p.952 –957, 2003.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II, Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.
- FENG, X.P.; KUHNLEIN, U.; AGGREY, S.E.; GAVORA, J.S.; ZADWORNÝ, D. Trait association of genetic markers in the growth hormone and growth hormone receptor genes in a White Leghorn strain. **Poultry Science**, v.76, p.1770-1775, 1997.
- FUJISAWA-SEHARA, A.; NABESHIMA, Y.; HOSODA, Y.; OBINATA, T.; NABESHIMA, Y. Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.25, p.15219-15223, 1990.
- FUJISAWA-SEHARA, A.; NABESHIMA, Y.; KOMIYA, T.; UETSUKI, T.; ASAKURA, A.; NABESHIMA, Y. Differential trans-activation of muscle-specific regulatory elements including the myosin light chain box by chicken MyoD, myogenin, and MRF4. **Journal Biological Chemistry**, v.267, n.14, p.10031-10038, 1992.

- GEORGES, M. Recent progress in livestock genomics and potential impact on breeding programs. **Theriogenology**, v.55, p.15-21, 2001.
- GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 7. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2003. 750p.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.
- GROBET , L.; ROYO, L.J.; PONCELET, D.; PIROTTIN, D.; BROUWRES, B.; RIQUET, J.; SCHOBERLEIN, A.; DUNNER, S.; MENISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscle phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v.17, p.71-74, 1997.
- GROENEN, M.A.M.; CROOJMANS, R.P.M.A.; VEENENDAAL, A.; CHENG, H.H.; SIWEK, M.; VAN DER POEL, J.J. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. **Genomics**, v.49, p.265-274, 1998.
- GROENEN, M.A.M.; CHENG, H.H.; BUMSTEAD, N.; CRITTENDEN, L.; DODGSON, J.; HILLE, J.; LAMONT, S.; DE LEON, A.P.; SOLLER, M.; TAKAHASHI, H.; VIGNAL, A. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research**, v.10, p.137-147, 2000.
- GUSTAFSSON, M.K.; PAN, H.; PINNEY, D.F.; LIU, Y.; LEWANDOWSKI, A. Myf5 is a direct target of long-range Shh signaling and Gli regulation for muscle specification. **Genes Development**, v.16, p.114-126, 2002.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p.49-92, 1951.

- HASTY,P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J. H.; EDMONDSON, D. G.; VENUTI, J. M.; OLSON, E.; KLEIN, W. H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a target mutation in the *myogenin* gene. **Nature**, v.364, p.501-506, 1993.
- HILLEL, J. Map-based quantitative trait locus identification. **Poultry Science**, v. 76, p.1115-1120, 1997.
- HUANG, X.; MADAN, A. Cap3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v.9, p.868-877, 1999.
- HUTT, F.B. Sex-linked dwarfism in the fowl. **Journal of Heredity**, v.50, p.209-221, 1959.
- IKEOBI, C.O.N; WOOLLIAMS, J.A.; MORRICE, D.R.; LAW, A.; WINDSOR, D.; BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. **Animal Genetics**, v.33, p.428-435, 2002.
- JI, S.; LOSINSKI, R.L.; CORNELIUS, S.G.; FRANK, G.R.; WILLIS, G.M.; GERRARD, D.E.; DEPREUX, F.F.; SPURLOCK, M.E. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. **American Journal of Physiology**, v.275, p.1265-1273, 1998.
- KENNEDY, B. W.; QUINTON, M.; VAN ARENDONK, J. A. M. Estimation of effects of single genes on quantitative trait locus. **Journal of Animal Science**, v.70, p.2000-2012, 1992.
- KRAMER, J.; MALEK, M.; LAMONT, S.J. Association of twelve candidate gene polymorphisms and response to challenge with *Salmonella enteritidis* in poultry. **Animal Genetics**, v.34, p.339-348, 2003.
- KUHLEIN, U.; PARSANEJAD, R.; ZADWORN, D.; AGGREY, S.E. The dynamics of the genotype-phenotype association. **Poultry Science**, v.82, p.876-881, 2003

- KUHNLEIN, U.; NI, L.; WEIGEND, S.; GAVORA, J.S.; FAIRFULL, R.W.; ZADWORNÝ, D. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, p.116-123, 1997.
- LADJALI-MOHAMMEDI, K.; BITGOOD, J.J.; TIXIER-BOICHARD, M.; PONCE DE LEON, F. A. International system for standardized avian karyotypes (ISSAK): standardized banded karyotypes of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.86, p.271-276, 1999.
- LANDER, E. S.; BOLTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, p. 185-199, Jan., 1989.
- LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; SCHMIDT, G.S.; JAENISCH, F.R.F.; SAATKAMP, M.G.; BASSI, L.J.; COUTINHO, L.L. Peso e características de carcaça em linhagens utilizadas no desenvolvimento de populações referência para detecção de QTL em aves. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, suppl. 2, p.73, 2000.
- LINVILLE, R.C.; POMP, D.; JOHNSON, R.K.; ROTHCHILD, M.F. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. **Journal of Animal Science**, v.79, p.60-67, 2001.
- LUDOLPH, D.C.; KONIECZNY, S.F. Transcription factors families: muscling in on the myogenic program. **FASEB Journal**, v.9, p.1595-1604, 1995.
- MACKAY, T.F. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Reviews of Genetics**, v.35, p.303-339, 2001
- MALEK, M.; LAMONT, S.J. Association of INOS, TRAIL, TGF- β , TGF- β 3, and IgL genes with response to *Salmonella enteritidis* in poultry. **Genetic Selection and Evolution**, v.35, suppl.1, p.S99-S111, 2003.

- MALEK, M.; HASENSTEIN, J.R.; LAMONT, S.J. Analysis of chicken TLR4, CD28, MIF, MD-2, and LITAF genes in a *Salmonella enteritidis* resorce population. **Poultry Science**, v.83, p.544-549, 2004.
- MCPHERRON, A.C.; LEE, S.-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.94, p.12457-12461, 1997.
- MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M., LEE, S.-J. Regulation of skeletal muscle mas in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, v.387, p.83-90, 1997.
- MEGENEY, L.A.; KABLAR, B.; GARRET, K.; ANDERSON, J.E.; RUDNICKI, M.A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **Genes Development**, v.10, p.1173-1183, 1996.
- MINER, J.H.; WOLD, B. Herculin, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. **Proceedings of National Academy of Science of the USA**, v.87, p.1089-1093, 1990.
- MORAN, C. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. **Journal of Heredity**, v.84, n.4, p.274-280, 1993.
- MORRISSON, M.; PITEL, F.; FILLON, V.; POUZADOUX, A.; BERGE, R.; ZOOROB, R.; AUFRAY, C.; GELLIN, J.; VIGNAL, A. Integration of chicken cytogenetic and genetic maps: 18 new polymorphic markers isolated from BAC and PAC clones. **Animal Genetics**, v.29, p.348-355, 1998.
- MOTT, I.; IVARIE, R. Expression of myostatin is not altered in lines of poultry exhibinting myofiber hyper- and hypoplasia. **Poultry Science**, v.81, p.799-804, 2002.

- NABESHIMA, Y.; HANAOKA, K.; HAYASAKA, M.; ESUMI, E.; LI, S. NANOKA, I.; NABESHIMA, Y. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. **Nature**, v.364, p.532-535, 1993.
- NAGARAJA, S.C.; AGGREY, S.E.; YAO, J.; ZADWORN, D.; FAIRFULL, R.W.; KUHNLEIN, U. Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. **The Journal of Heredity**, v.91, n.2, p.150-156, 2000.
- OLSON, E.N. MyoD family: a paradigm for development. **Genes and Development**, v.4, p.1454, 1990.
- OLSON E.N., PERRY M.; SCHULZ R.A. Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors. **Developmental Biology**, v.172, p.2-14, 1995.
- PATAPOUTIAN, A.; YOON, J.K.; MINER, J.H.; WANG, S.; STARK, K.; WOLD, B. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. **Development**, v.121, n.10, p.3347-3358, 1995.
- PERRY, R.S.; RUDNICK, M.A. Molecular mechanism regulating myogenic determination and differentiation. **Science**, v.5, p.d750-d767, 2000.
- PICARD, B.; LEFAUCHEUR, L.; BERRI, C.; DUCLOS, M.J. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. **Reproduction Nutrition and Development**, v.42, p.415-431, 2002.
- PORQUIÉ, O. Vertebrate Somitogenesis. **Annual Reviews Cell of Developmental Biology**, v.17, p.311-350, 2001.
- POULTRY GENOME NEWSLETTER. Draft chicken genome sequence released, abril, n.2, p.1-4, 2004.

- POWNALL, M.E.; GUSTAFSSON, M.K.; EMERSON, C.P.JUNIOR. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. **Annual Reviews of Cell Developmental Biology**, v.18, p.747-783, 2002.
- PURI, P.L.; SARTORELLI, V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins and post-transcriptional modification. **Journal of Cellular Physiology**, v.185, p.155-173, 2000.
- REHFELDT, C.; FIEDLER, I.; DIETL, G.; ENDER, K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. **Livestock Production Science**, v.66, p.177-188, 2000.
- RHODES, S.; KONIECZNY, S.F. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. **Genes Development**, v.3, p.2050-2061, 1989.
- ROTHSCHILD, M.F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling of economic importance in domestic livestock. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, Viçosa - MG. **Anais**. Viçosa: UFV, 1999. p.219-242.
- RUDNICKI, M.A.; BRAUN, T.; HINUMA, S.; JAENISCH, R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf5 and results in apparently normal muscle developments. **Cell**, v.71, p.383-390, 1992.
- RUDNICKI, M.A.; SCHNEGELSBERG, P.N.J.; STEAD, R.H.; BRAUN, T.; ARNOLD, H.H.; JAENISCH, R. MyoD or Myf5 is required in a functionally redundant manner for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v.75, p.1351-1359, 1993.
- SABOURIN, L.A.; RUDNICKI, M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**, v.57, p.16-25, 2000.

- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 4, n.12, p.5463-55467, 1977.
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: Statistics. Cary,. p.955, 1997
- SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; MATTHEWS, K.J. Myostatin, a transforming growth factor-b superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. **Journal of Cell Physiology**, v.180, p.1-9, 1999.
- SHORT, T. H.; ROTHSCHILD, M. F.; SOUTHWOOD, O. I.; MCLAREN, D. G.; DE VRIES, A.; VAN DER STEEN, H.; ECKARDT, G. R.; TUGGLE, C. K.; HELM, J.; VASKE, D. A.; MILEHAM, A. J.; PLASTOW, G.S. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. **Journal of Animal Science**, v.75, n.12, p.3138-3142, 1997.
- SMITH, J.; PATON, I.R.; BRULEY, C.K.; WINDSOR, D.; BURKE, D.; PONCE DE LEON, F.A. Integration of genetic and physical maps of the chicken macrochromosomes. **Animal Genetics**, v.31, p.20-27, 2000.
- SOURDIOUX, M.; BREVELET, C.; DELABROSSE, Y.; DOUAIRE, M. Association of fatty acid synthase gene and malic enzyme gene polymorphisms with fatness in turkeys. **Poultry Science**, v.78, p.651-1657, 1999.
- STOCKDALE, F. S.; NIKOVITS, W. JUNIOR.; CHRIST, B. Molecular and cellular biology of avian somite development. **Developmental Dynamics**, v.219, p.304-321, 2000.
- TAJBAKHSH, S.; BOBER, E.; BABINET, C.; POURNIN, S; ARNOLD, H.; BUCKINGHAM, M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. **Developmental Dynamics**, v.206,n.3, p.291-300, 1996a.

- TAJBAKHSH, S.; ROCANCOURT, D.; BUCKINGHAM, M. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. **Nature**, v.384, n.6606, p.266-70, 1996b.
- TAYLOR, S.M.; JONES, P.A. Multiple new phenotypes induced in 10T $\frac{1}{2}$ and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. **Cell**, v.17, p.771-779, 1979.
- TE PAS, M.F.W. Candidate genes for meat quality – the MRF genes. **Animal Science and Reports**, v.22, n.1, p.115-118, 2004.
- TE PAS, M.F.W.; SOUMILLION, A.; HARDERS, F.L.; VERBURG, F.J.; VAN DEN BOSCH, T.J. GALESLOOT, P.; MEUWISSEN, T.H.E. Influences of myogenin genotype on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness and lean weight of pigs. **Journal of Animal Science**, v.77, p. 2352-2356, 1999.
- THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.275, p.40235-40243, 2000.
- TIXIER-BOICHARD, M. From phenotype to genotype: major genes in poultry. **World's Poultry Science Journal** , v.58, n.1, p.65-75, 2002.
- TOBITA-TERAMOTO, T.; JANG, G.Y.; KINO, K; SALTER, D.W.; BRUMBAUGH, J.; AKIYAMA, T. Autosomal albino chicken mutation (ca/ca) detetes hexanucleotides (-GACTGG817) at copperbinding site of tyrosinase gene. **Poultry Science**, v. 78, p.46-50, 2000.
- VIGNAL, A. Genomics and the genetic improvement of broiler chicken. **Outlook on Agriculture**, v.33, n.2, p.79-84, 2004.

- VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v.34, p.275-305, 2002.
- VINCENT, A.L.; EVANS, G.; SHORT, T.H.; SOUTHWOOD, O.I.; PLASTOW, G.S.; TOGGLE, C.K.; ROTHSCCHILD, M.F. The prolactin receptor gene is associated with increased litter size in pigs. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO. LIVESTOCK. PRODUCTION, 6., Armidale, 1998. **Proceedings**. Armidale: NSW, 1998. v.27, p.15-18.
- WEIGEND, S.; ROMANOV, M.N. Current strategies for assessment and evaluation of genetic diversity in chicken resources. **World's Poultry Science Journal**, v.57, p.275-288, 2001.
- WEINTRAUB, H.; DAVIS, R.; TAPSCOTT, S.; THAYER, M.; KRAUSE, M.; BENEZRA, R.; BLACKWELL, T.K.; TURNER, D.; RUPP, R.; HOLLENBERG, S.; ZHUANG, Y.; LASSAR, A. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. **Science**, v.251, p.761-766, 1991.
- WRIGHT, W.E.; SASSOON, D.A., LIN, V.K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. **Cell**, v.56, p.607-617, 1989.
- ZHILIANG, G.; ZHU,D.; LI, N.; LI, H.; DENG, X.; WU, C. The single nucleotide polymorphisms of the chicken myostatin gene are associated with skeletal muscle and adipose growth. **Science in China Series C-life Sciences**, v.47, n.1, p.25-30, 2004.