**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs)
associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28
de *Gallus gallus*.**

Marcel Ambo

**Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Agronomia. Área de concentração:
Ciência Animal e Pastagens**

**Piracicaba
2007**

Marcel Ambo
Licenciado em Ciências – Habilitada em Biologia

Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 de *Gallus gallus*.

Orientador:
Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

Piracicaba
2007

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

Ambo, Marcel

Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 de *Gallus gallus* / Marcel Ambo. - Piracicaba, 2007.
82 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.
Bibliografia.

1. Cromossomos 2. Galinhas - Desempenho 3. Mapeamento genético 4. Marcador molecular 5. Melhoramento genético animal 6. Traços quantitativos I. Título

CDD 636.5082

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

“Em uma alma absolutamente livre
De todos os pensamentos e emoções
Nem mesmo o tigre encontra espaço
Para cravar suas garras afiadas”
Um monge taoísta

Dedico,

Aos meus pais Celso e Marivete pela extrema
dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pela oportunidade, orientação e confiança.

À Prof^a. Dra. Ana Sílvia Alves Meira Tavares Moura, pela orientação, paciência e apoio durante todo o projeto.

À Dra. Mônica Corrêa Ledur, pela colaboração que foram essenciais para o andamento do projeto.

À Raquel de Lello Rocha Campos pela oportunidade, confiança, paciência, respeito e amizade.

À Fapesp pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Suínos e Aves, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento deste trabalho.

Às Doutoradas Deborah C. Ruy, Érika E. Elias Baron e Kátia Nones, pessoas muito queridas que foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Ao colega Millor, que proporcionou ensinamentos e orientações que foram muito valiosas.

À colega Clarissa Boschiero, pela amizade e troca de experiências.

Aos técnicos do laboratório de Biotecnologia Animal Jorge Luiz Ferreira de Andrade e Nirlei Aparecida Silva pela grande amizade e apoio durante todos estes anos de estudo.

À Helena Javiel Alves, pela orientação, amizade e boas conversas.

À Lilian Giotto Zaros pela colaboração, ajuda e momentos de descontração.

Ao colega Luis Fernando Pinto, pela ajuda e orientação com as análises estatísticas e cromossomo Z.

A todos os colegas do laboratório de Biotecnologia Animal pela troca de experiências e convívio, que sem dúvida contribuíram muito para o desenvolvimento e conclusão deste projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Marcadores microssatélites.....	13
2.2 Mapa de ligação	14
2.3 Genoma da galinha e o Mapa Consenso	15
2.4 Mapeamento de QTLs.....	17
2.5 Trabalhos de mapeamento de QTLs	20
2.6 Aplicação dos QTLs em programas de melhoramento (MAS)	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 População experimental.....	27
3.2 Colheita de dados fenotípicos e de amostras de sangue.....	29
3.3 Extração e quantificação de DNA.....	29
3.4 Escolha dos marcadores microssatélites	30
3.5 Amplificação de microssatélites por PCR.....	32
3.6 Genotipagem	34
3.7 Mapas de ligação	35
3.8 Análise de Mapeamento de QTLs	35
4 Resultados e Discussão	38
4.1 Extração de DNA.....	38
4.2 Amplificação por PCR	40
4.3 Seleção dos marcadores informativos e genotipagem	45
4.4 Mapa de Ligação.....	49
4.5 Análise de mapeamento de QTLs	60
5 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXOS	78

RESUMO

Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 de *Gallus gallus*

A partir de uma linha macho de corte e outra de postura, foi desenvolvida uma população experimental F_2 com objetivo de mapear locos de características quantitativas (QTLs) para características de interesse comercial. Foi gerado um total de 2.063 animais F_2 em 17 incubações que foram criados como frangos de corte até a 6ª semana de idade, quando foram avaliadas seis características de desempenho. As famílias utilizadas para o estudo, foram as que obtiveram maior número de marcadores microsatélites informativos em trabalhos anteriores envolvendo os cromossomos 1 a 5 com a mesma população. Vinte marcadores dos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 foram testados nos indivíduos parentais e F_1 das famílias escolhidas para checar se eram ou não informativos. Após a genotipagem das 5 famílias escolhidas, foram construídos os mapas de ligação e realizada a análise de mapeamento de QTL por intervalo para cada cromossomo utilizando o método de regressão e o modelo genético F_2 . Dois modelos foram testados: um incluindo apenas o efeito aditivo do QTL e outro modelo que incluiu também o efeito de dominância. Caso fosse identificado QTL com nível de significância no mínimo sugestivo no genoma, os modelos foram confrontados para confirmar o efeito de dominância do QTL. Foram conduzidas também análises complementares com o intuito de detectar interação do QTL x sexo e QTL x família. Foram estimados a porcentagem da variância fenotípica e o intervalo de confiança para cada QTL. No cromossomo 26 foi mapeado QTL significativo a 5% no cromossomo para ganho de peso dos 35 aos 41 dias, e no cromossomo 27 foi identificado, para a característica peso vivo aos 35 dias um QTL sugestivo no genoma. Os QTL localizados nos cromossomo 26 e 27 foram localizados a 0.0 e 103.0 cM e explicaram 1,95 e 2,03% da variação fenotípica, respectivamente.

Palavras chave: Locos de características quantitativas; Marcadores microsatélites; Melhoramento animal; *Gallus gallus*

ABSTRACT

Mapping QTLs on chicken chromosome 19, 23, 24, 26, 27 and 28 affecting performance traits

With the objective of mapping quantitative trait loci (QTLs) for economically valuable characteristics, an F_2 chicken population was developed by crossing a broiler sire line and a layer dam line. A total of 2,063 F_2 chickens from 17 incubations were reared as broilers and slaughtered at 6 week of age, when six performance traits were measured. Five families were chosen for this study based on previous work to determine the most informative families. Twenty markers from chromosomes 19, 23, 24, 26, 27 and 28 were tested in the parental and F_1 chickens from the chosen families to select the informative markers. After genotyping parental, F_1 and F_2 chickens, the linkage maps were constructed and QTL Interval mapping analysis was conducted for each chromosome using regression methods and the F_2 genetic model. Two different models were tested: one including only the additive effect of the QTL and another model that also included the dominance effect. If at least a genome-wide suggestive QTL was detected, they were compared through standard F tests to confirm the dominance effect of the QTL. Complementary analyses were conducted to investigate the existence of QTL x sex and QTL x family interactions. The percentage of the phenotypic variance explained by the QTL and the confidence intervals were estimated for each QTL. A 5% chromosome-wide significant QTL for weight gain from 35 to 41 d was mapped to chromosome 26 and a QTL that exceeded the genome-wide suggestive threshold for body weight at 35 d was mapped to chromosome 27. This QTL positioned at 103 cM explained 2.03% of the phenotypic variance of the trait and presented a confidence interval from 0 to 111 cM.

Key words: Quantitative trait loci; Microsatellite markers; Animal improvement; *Gallus gallus*

1 INTRODUÇÃO

Ao analisar os dados de produção e exportação mundiais de carne de frango, observa-se que o Brasil lidera junto com países como EUA, China, União Européia e México o mercado internacional de carne de frango. Os dados da União Brasileira de Avicultura (UBA) registraram no ano de 2006 um aumento de 6,43% em relação a 2005 na produção mundial de carne de frango passando de 9.297 para 9.895 milhões de toneladas. Lembrando que o ano de 2005 foi muito importante para o cenário de produção onde houve um incremento na ordem de 9,46% (8.494 para 9.297 milhões de toneladas). O Brasil hoje é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, perdendo para os EUA e China, que são os líderes mundiais de acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF).

As exportações brasileiras de frango registraram em 2005 um recorde histórico, totalizando 2.845 milhões de toneladas de carne, com crescimento de 15% em relação a 2004, levando o setor para o sexto lugar no *ranking* geral dos países exportadores de carne de frango. Este alto desempenho também se deve aos focos de gripe aviária nos principais concorrentes internacionais do Brasil, que abriu maior espaço para a venda do produto, provocando no final de 2005 o início de uma retração no mercado de consumo.

Por isso a necessidade do Brasil em trabalhar no sentido de estabelecer metas como a abertura de novos mercados e a ampliação das exportações nos países que possuem relação comercial já estabelecida torna-se essencial para a manutenção e maior desenvolvimento do setor avícola do país no mundo. Somado a estes fatores observa-se também, que o desenvolvimento necessário para cumprir com a demanda interna e externa depende de muitos fatores, entre eles avanços na produção de insumos (por exemplo grãos), e tecnologias tanto na área industrial como genética.

A indústria nacional vem recebendo contribuições cada vez mais significativas dos programas de melhoramento genético, aliadas as novas técnicas de Biologia molecular, com o objetivo de aumentar ainda mais os ganhos já obtidos com o melhoramento tradicional elevando com isso a competitividade.

Além destes fatores houve um avanço nas áreas de instalações, equipamentos, manejo, nutrição, sanidade e principalmente em melhoramento genético das linhagens e híbridos comerciais empregando métodos baseados no fenótipo (genética quantitativa), que também contribuíram para o progresso atual que o Brasil vem apresentando. Entretanto, associado às melhorias das características de produção através do melhoramento animal, surgiram algumas respostas indesejáveis, como aumento de doenças metabólicas, carne de baixa qualidade (PSE – do inglês *pale, soft, exsudative*: pálida, flácida e exsudativa), redução de fertilidade, resistência e doenças metabólicas, e em frangos de corte aumento de incidência de osteoporose (BURT, 2002).

Segundo o autor citado, a genética molecular pode melhorar as características obtidas sem prejudicar os ganhos já obtidos nas características de produção, pois com o uso de ferramentas moleculares é possível identificar genes que controlam características quantitativas de importância econômica auxiliando e acelerando programas de melhoramento animal, principalmente para características difíceis de serem medidas, de alto custo de avaliação, de baixa herdabilidade ou limitadas pelo sexo.

Utilizando a tecnologia do DNA recombinante e a reação em cadeia da polimerase (“Polimerase Chain Reaction” – PCR), foram desenvolvidas técnicas que permitiram a identificação de vários tipos de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma de várias espécies, possibilitando associação com características quantitativas e, conseqüente, sua utilização em seleção assistida por marcadores (*Marker Assisted Selection* - MAS).

Um mapa consenso do genoma de aves construído a partir dos mapas de ligação de 3 populações referência (Compton, East Lansing e Wageningen) foi publicado por Groenen et al., (2000); onde em um trabalho de revisão publicado por Schmidt et al., (2005) foram atualizados o número de marcadores (de 1.889 para 2.261) juntamente com o tamanho de genoma, que passou de 3.800 cM para 4.200 cM. Informações mais específicas estão no site (ARKdb:<http://www.thearkdb.org/>). Os marcadores microssatélites posicionados no mapa consenso em intervalos regulares ao longo dos cromossomos, associados às características fenotípicas de interesse em

populações planejadas, permitem o estudo de mapeamento de QTLs. A partir destes estudos, torna-se mais fácil a localização de genes nestas regiões que apresentam efeitos nas características quantitativas de interesse, contribuindo conseqüentemente para uma seleção mais refinada.

Nos cromossomos estudados nesta dissertação, trabalhos anteriores mapearam vários QTLs para peso vivo e ganho de peso. Portanto novos estudos utilizando outras populações são importantes para confirmação e mapeamento de novos QTLs de importância econômica.

A Embrapa Suínos e Aves, em parceria com a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), desenvolveram uma população F2 experimental a partir de cruzamentos recíprocos de linhagens de corte e postura, que foram utilizadas para identificar marcadores associados a características desempenho, nas condições de clima e manejo do Brasil.

Este estudo teve como objetivos construir um mapa de ligação dos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 da galinha e mapear QTLs neste cromossomo para características de desempenho, concluindo parte da varredura do genoma da galinha.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As várias linhas e raças da galinha doméstica atual são oriundas de seu ancestral selvagem, o *Red Junglefowl*, que foi fruto da domesticação, que se acredita ter iniciado há 8.000 anos atrás no sudoeste da Ásia (YAMADA, 1998; FUMIHITO et al., 1994). Inicialmente a ave era utilizada para sacrifícios, como ave de importância religiosa ou briga de galo. Os romanos foram os responsáveis pela sua inserção na agricultura, criando raças especializadas, incluindo animais com as duas finalidades, corte e postura. Com o declínio do império a criação das aves domésticas entrou em colapso e uma seleção sistemática muito pouco significativa foi realizada por muitos séculos, com exceção dos galos para luta. A linha Leghorn foi derivada do mediterrâneo e foi sendo desenvolvida até o século XIX. Já a atual White Leghorn é uma raça de postura selecionada para eficiência (menor consumo e maior produção de ovos), e seu tamanho chega a ser duas vezes maior em relação ao ancestral *Red Junglefowl* (KERJE et al., 2003).

Nos dias de hoje a produção da galinha (*Gallus gallus*), tornou-se tão difundida pelo mundo que é o mais importante animal de produção, com crescimento rápido, sendo a principal fonte de proteína animal para a maioria das populações. Além disso, é muito utilizada para estudos evolutivos, de regulação gênica e doenças como câncer (GROENEN et al., 2000; McPHERSON et al., 2002; JENSEN, 2005; WICKER et al., 2005).

A galinha possui curto intervalo entre gerações, capacidade de gerar grandes famílias de irmãos completos e hemácias nucleadas que proporciona grande quantidade de DNA para estudos. Também possui um genoma relativamente pequeno comparado aos mamíferos (CROOIJMANS et al., 1996; GROENEN et al., 1998; McPHERSON et al., 2002).

Devido a estes fatores, torna-se mais viável o desenvolvimento de estudos de genética molecular para auxiliar na identificação e funcionamento de genes controladores de características quantitativas, gerando assim resultados que poderão ser úteis em programas melhoramento assistido por marcadores (MAS). Com isso, seleções baseadas no fenótipo, inserção de determinadas características de uma

população para outra e predição do desempenho e heterose da progênie resultante dos cruzamentos serão mais facilmente realizados (DEKKERS; HOSPITAL., 2002).

De acordo com Burt (2002) a contribuição da biotecnologia na produção animal atingirá seu pico em 20 anos, e não trará ganhos genéticos muito significativos devido ao limite biológico dos organismos. Porém existem fatores importantes como as novas exigências do mercado consumidor e diminuição dos custos de produção que farão com que a indústria se adapte e estimule os estudos, melhorando assim características difíceis de serem selecionadas pelos métodos convencionais. Selecionando animais para aumentar a resistência a doenças, por exemplo, é possível reduzir custos com vacinas e antibióticos.

2.1 Marcadores microssatélites

A história dos marcadores se iniciou na década de 60, através do estudo em genética e melhoramento, controlados por genes associados a caracteres morfológicos (marcadores morfológicos), que devido a problemas como número limitado de marcadores e restrição a poucas espécies como tomate e milho, foram sendo substituídos pelos marcadores isoenzimáticos, que revolucionou a forma de estudo.

Associados as novas técnicas de biologia molecular, foi possível detectar polimorfismo genético diretamente no DNA, sendo as enzimas de restrição às primeiras ferramentas utilizadas (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*). Foram desenvolvidas posteriormente várias outras técnicas, como VNTR (*Variable number of tandem repeats*), RAPD (*Random amplified polymorphic*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), microssatélites e SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*).

Por meio da reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), os microssatélites, pequenas seqüências específicas de 20 a 30 pares de bases, se anelam ao trecho de DNA desejado por complementaridade, flanqueando-o. Após a reação, milhões de cópias do segmento de DNA serão produzidos, e dependendo do loco, pode haver um ou mais de um produto amplificado que possua tamanho molecular diferente, chamado de alelo (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

A única desvantagem dos microssatélites é o trabalho necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores, porém, devido aos últimos avanços realizados em estudos com a galinha, existe um grande número destes marcadores disponíveis.

Com a utilização dos marcadores microssatélites torna-se possível identificar genótipos antes que as características se manifestem, acelerando como resultado, o processo de seleção.

Os marcadores microssatélites são codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados. São também multialélicos, onde numa determinada população vários alelos de um loco podem ser detectados e discriminados. Por isso, é o tipo de marcador que possui a maior quantidade de informação de polimorfismo (PIC- Polymorphism Information Content) (NONES, 2004).

2.2 Mapa de ligação

O mapa de ligação é um instrumento essencial para o mapeamento de QTLs. Um mapa de ligação é construído utilizando-se a taxa de recombinação como um indicador quantitativo de distância entre dois marcadores, onde quanto maior a distância, maior a probabilidade das cromátides não-irmãs se cruzarem na região entre os marcadores e produzir um maior número de recombinantes. Uma vez determinada a frequência de recombinantes obtém-se a medida em distância entre os marcadores, onde 1% equivale a 1 centiMorgan (cM) (GRIFFITHS et al., 1998).

Segundo Weller (2001) apesar do valor correspondente a 1 cM ser aproximadamente 1 milhão de pares de base, existem regiões dos mapas físicos que possuem alta e baixa frequência de recombinação que são afetadas por outros fatores, como sexo dos animais selecionados ou espécie estudada, que podem causar diferenças no tamanho do mapa genético por exemplo.

De acordo com Schmid et al., (2005), os mapas de ligação publicados em 2000 (GROENEN et al., 2000) são o ponto central de referência para o desenvolvimento de todos os mapas da galinha, que se baseia na combinação das informações de três diferentes populações: (CRITTENDEN et al., 1993), Compton (BUMSTEAD; PALYGA, 1992) e Wageningen (GROENEN et al., 1998).

Desde aquela época os mapas de ligação consenso sofreram um modesto aumento no número de marcadores e tamanho total, passando de 1.889 loci (distribuídos em 51 grupos de ligação) e tamanho do genoma de 3.800 cM, para 2.261 loci (em 53 grupos de ligação) e tamanho total de 4.200 cM.

East Lansing e Wageningen são as duas populações referências ainda ativamente utilizadas para o mapeamento de QTLs. Embora as informações dos marcadores oriundos dos estudos de mapeamento em outras populações possam ser utilizadas para adicionar um número maior no mapa consenso, a ordem exata entre os mesmos torna-se mais difícil de estimar.

Quanto ao tipo de marcador, os microssatélites e AFLPs são os que predominam no mapa consenso. Porém nos dois últimos anos o número de marcadores SNPs aumentaram bastante, e a expectativa é que em pouco tempo se tornem predominante.

Os cromossomos das aves eram classificados há pouco tempo como macro e microcromossomos. Essa definição em dois grupos, entretanto pode ser diferente em número na literatura, variando entre 6 a 10 pares de macrocromossomos incluindo o Z, e W na fêmea heterogamética. Entretanto Schmid et al., (2005) propuseram um sistema que não faz distinção entre os diferentes tamanhos, não os classificando segundo esta ordem. Portanto os cromossomos de 1 a 10 mais os sexuais são classificados como grupo A. Os cromossomos 11 ao 16 são do grupo B e junto com o grupo D, que são compostos pelos cromossomos 33 a 38 formam os menores. E o grupo C é o maior deles, contendo os cromossomos 17 a 32.

2.3 Genoma da galinha e o Mapa Consenso

Em 2004 foi publicado o resultado de seqüenciamento do genoma de *Gallus gallus* (HILLIER et al., 2004), cujo DNA utilizado para o seqüenciamento foi extraído de uma espécie ancestral (*Red Junglefowl*) de onde derivaram todas as várias raças e linhagens de galinhas domésticas hoje conhecidas. O conhecimento do genoma de uma espécie permite obter uma melhor compreensão da estrutura, evolução e arranjo dos genes, assim como a comparação com outros organismos.

Os microcromossomos representam aproximadamente 30% do genoma e possuem alguns fatores que os diferenciam dos macrocromossomos, como por exemplo, uma maior densidade de genes em relação aos macrocromossomos e alta quantidade das bases nitrogenadas guanina e citosina e baixa de timina e adenina. Outra característica importante dos microcromossomos é que eles possuem taxa de 2,8 cM/Mb, enquanto que os macrocromossomos 6,4 cM/Mb. Nos seres humanos esta taxa varia entre 1 a 2 cM/Mb (SCHIMD et al., 2005).

A partir dos estudos dos cromossomos tornou-se possível a construção de mapas de ligação e mapeamento de QTLs envolvendo todo o genoma do animal. Para isso foi criado um mapa consenso a partir de três populações referência (Wageningen, Compton e East Lansing), desenvolvidas a partir de linhagens divergentes. O mapa consenso é bastante importante, pois fornece informações sobre os marcadores (posição, ordem e tamanho do espaçamento entre eles, por exemplo) sendo uma ferramenta essencial na melhor escolha de marcadores, juntamente com a comparação em outras populações, contribuindo para melhor mapeamento de QTLs. A cada ano, o mapa consenso da galinha torna-se mais denso, com um número de marcadores cada vez maior em quantidade e tipos, distribuídos em intervalos regulares ao longo dos cromossomos, facilitando cada vez mais o trabalho de identificação genes de importância comercial.

Mais detalhes sobre os mapas consenso de todos os cromossomos está disponível na página eletrônica do *Chicken Genome Project*, da Universidade de Michigan (<http://poultry.mph.msu.edu/>) e no *Roslin Institute* da Escócia (www.thearkdb.org).

2.4 Mapeamento de QTLs

As características herdáveis consideradas importantes economicamente, são oriundas da ação conjunta de vários genes, e são denominadas quantitativas ou poligênicas. Produtividade, precocidade e crescimento, são exemplos de características herdadas de forma quantitativa (FERREIRA; GRATAPAGLIA., 1998). Mackay (2001), afirma que a maioria das características econômicas importantes em animais domésticos é quantitativa e embora influenciada por muitos genes, não são igualmente influenciados por todos eles, ou seja, alguns terão efeitos maiores e outros menores. Esta hipótese explica que um grande número de genes de pequeno efeito está segregando para produzir uma característica quantitativa (GRIFFITHS et al., 1998).

A associação entre marcadores que estão segregando e valores fenotípicos da característica de interesse sugerem que um gene controlando algum componente desta característica está localizado próximo a estes marcadores (LIU, 1998).

O princípio básico do mapeamento de QTLs é que os marcadores moleculares devem estar ligados aos locos que controlam a característica de interesse, para que na segregação esses marcadores sejam passados de uma geração para outra junto com o gene que afeta a característica selecionada (ARÚS et al., 1993)

O mapeamento de QTLs no genoma só é possível se houver desequilíbrio de ligação entre o marcador e o QTL, que aumenta o poder do teste estatístico no momento de correlacionar o QTL com as características fenotípicas de interesse. Para garantir o desequilíbrio de ligação são utilizados delineamentos experimentais a partir de cruzamentos de linhagens divergentes, formando gerações F_1 e F_2 . (VAN der BEEK et al., 1995).

Estes cruzamentos controlados buscam maximizar o desequilíbrio de ligação permitindo acompanhar um alelo de interesse por meio de marcadores. Se houver uma diferença na média do fenótipo entre as classes genotípicas do marcador, infere-se que existe um QTL ligado aqueles marcadores, ou seja, as classes genotípicas dos marcadores segregam em conjunto com os alelos de um QTL de interesse (FALCONER; MACKAY., 1996).

Os mesmos autores também afirmam que o número de QTLs mapeados sempre são subestimados. Se houver dois QTLs muito próximos há chances de aparecer como apenas um, se estiverem ligados por associação (ligação entre alelos favoráveis a característica no mesmo loco), ou até não serem mapeados se estiverem ligados por repulsão (ligação entre um alelo favorável em um loco e um desfavorável no outro).

Lander e Botstein (1989) elucidaram através do método da máxima verossimilhança, o mapeamento por intervalos entre dois marcadores, permitindo detectar a presença de QTL em populações endogâmicas. As informações dos efeitos aditivos ("a") e dominância ("d") são associados aos genótipos dos marcadores que flanqueiam a região, distribuindo os dados do fenótipo nas classes genotípicas dos marcadores.

Haley e Knott (1992) demonstraram também que uma análise de quadrados mínimos poderia ser aplicada com sucesso em mapeamento por intervalos, fornecendo estimativas muito semelhantes aos obtidos pela máxima verossimilhança. São fornecidos os valores dos efeitos de "a" e "d", soma de quadrados, quadrados médios de regressão e desvios; resultando na posição mais provável do QTL e as melhores estimativas de seus efeitos. Além disso, o método proposto por estes autores possui algumas vantagens em relação à máxima verossimilhança como utilização de modelos mais complexos, com demanda computacional menos exigente, viabilização de técnicas de bootstrap (CHURCHIL; DOERGE, 1994) e permutação (VISSCHER et al., 1996), utilizadas para determinar o intervalo de confiança e o nível de significância genômico.

Na análise tipo F_2 , descrita por De Koning e colaboradores (1999) os efeitos aditivos e de dominância são calculados na população como um todo, supondo que os alelos do QTL estejam fixados nas linhagens parentais, e os QTLs mapeados explicam a variação genética entre as linhas fundadoras.

Para um programa de mapeamento de QTLs ser bem sucedido são necessários dois importantes fatores: utilização de marcadores informativos, e uma estrutura populacional adequada com variação genética suficiente para detectar a segregação entre o QTL e o marcador (DEEB; LAMONT., 2002). De acordo com Hillel

(1997) quando uma característica possui caráter de herança poligênica, como é o caso da maioria daquelas controladas por QTLs, é preciso garantir variação genética suficiente na população experimental.

A maioria dos estudos de mapeamento de QTLs tem sido realizados a partir de cruzamentos de linhagens ou raças genéticas fenotipicamente divergentes (DE KONING et al., 2003).

Existem poucas populações para estudos de QTLs no mundo, e a partir delas vários autores desenvolveram estudos sobre muitos grupos de características importantes na avicultura, sendo elas: entre linhas de corte e postura, entre linhas de corte e entre linhas de postura.

O cruzamento entre linhas endogâmicas apresenta algumas vantagens, como o conhecimento do genótipo dos parentais, fase de ligação e o número de alelos do suposto QTL (SILVA et al., 2005).

O objetivo do mapeamento de QTLs é realizar através de múltiplos testes estatísticos, a verificação de qual ou quais marcadores estão associados ao QTL. Este conjunto de testes necessita de um nível de significância genômico, o qual é obtido seguindo metodologias solidamente elucidadas.

O limiar de significância adequado deve ser obtido em função do tamanho do genoma e do número de cromossomos (SLATE, 2005). Segundo Lander e Krugliak (1995), existem três níveis de significância a serem considerados. O primeiro deles, significância por ligação sugestiva, corresponde a um falso positivo em uma varredura genômica completa. O segundo e terceiro, significância a 5 e 1% corresponde a uma ligação significativa e altamente significativa de ocorrência de uma ligação em uma varredura genômica.

Churchill e Doerge (1994) afirmaram que para obtenção de um nível de significância genômico são realizadas “n” permutações, e para cada uma delas a maior razão de F é anotada, e o total de valores de F são ordenados. Os autores afirmam que quanto maior os números de permutações mais precisos são os resultados. Um total de mil permutações é recomendado para obtenção de um nível de significância de 5% e dez mil para 1%.

O nível de significância também pode ser expresso através do valor de LOD, que indica na escala logarítmica, a razão entre a probabilidade dos dados observados terem surgido assumindo a presença de um QTL, sobre a probabilidade de sua ausência. Um QTL é significativo quando o LOD excede o valor três, indicando que esta probabilidade de ocorrência é 1.000 vezes maior (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998).

Para determinar o intervalo de confiança de um QTL, o método de reamostragem “*bootstrap*” (VISSCHER et al., 1996) comumente utilizado em conjunto com o mapeamento por intervalo é empregado. Os autores afirmam que quanto maior a evidência de um QTL estar presente em uma determinada região, menor o intervalo de confiança. Segundo o mesmo autor, a amplitude do intervalo depende do tamanho da população e do efeito do QTL. Já foram comparadas populações com 200 e 500 indivíduos, e o intervalo de confiança foi bem menor para a população com mais animais.

2.5 Trabalhos de mapeamento de QTLs

Na literatura existem diversos trabalhos de autores que mapearam QTLs para vários grupos de características, principalmente as que são valorizadas no mercado, como desempenho. Os principais trabalhos mapearam QTLs para peso vivo em diferentes idades dos animais, também para crescimento, peso de partes, porcentagem de gordura, peso de gordura, características de ovos, entre outros (van KAAM et al., 1999, SEWALEN et al., 2002, IKEOBI et al., 2002, JENNEN et al., 2004, KERJE et al., 2003, SASAKI et al., 2004, SCHREIWEIS, et al., 2005, JACOBSSON et al., 2005, PARK et al., 2005).

Na Tabela 1 abaixo, estão listados os principais QTLs encontrados para os cromossomos estudados, segundo o trabalho de revisão de Abasht et al., 2006, que considerou os menores níveis de significância, como os QTLs com ligação sugestiva no genoma e no cromossomo. Além das características de desempenho também estão descritos QTLs relacionados a característica de gordura.

Sewalen et al., (2002) mapearam QTLs para peso vivo a 3, 6 e 9 semanas de idade, utilizando um total de 546 animais F_2 . Foi detectado no cromossomo 27 QTL com ligação sugestiva no genoma para peso vivo a 6 semanas de idade juntamente com outro QTL para peso vivo a 9 semanas de idade com ligação significativa a 5% no genoma. Não foram estimados os intervalos de confiança (IC).

Tabela 1 - Informações sobre os principais QTLs mapeados nos cromossomos estudados, segundo a revisão de Abasht et al., (2006). Também estão representadas informações sobre o nível de significância, posição do QTL, marcadores flanqueadores e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL para cada característica

(continua)

Característica	Chr.	Posição (cM)	Nº Marcadores	Marcadores flanqueadores	R²	Autores
Consumo alimentar 23-48 dias	26 [†]	16	-	-	-	van Kaam et al., 1999
Peso vivo 3 semanas	Z ^{**}	127	3	LEI0111-LEI0075	4.7	Sewalen et al., 2002
Peso vivo 6 semanas	27 [†]	0	1	ROS0071	-	
	Z [†]	127	3	LEI0111-LEI0075	-	
Peso vivo 9 semanas	27 ^{**}	0	1	ROS0071	4.0	
Peso gordura abdominal	28 [*]	17	2	ROS0095-ADL0299	3.5	Ikeobi et al., 2002
	Z [†]	127	3	LEI0111-LEI0075	-	
Gordura abdominal	28 [*]	17	2	ROS0095-ADL0299	3.84	
	Z [†]	127	3	LEI0111-LEI0075	-	
Peso gordura da pele	28 [†]	0	2	ROS0095-ADL0299	-	
Gordura da pele	28 [*]	0	2	ROS0095-ADL0299	3.64	
% gordura abdominal	27 [†]	0	3	MCW0076-MCW0146	-	Jennen et al., 2003

Tabela 1 - Informações sobre os principais QTLs mapeados nos cromossomos estudados, segundo a revisão de Abasht et al., (2006). Também estão representadas informações sobre o nível de significância, posição do QTL, marcadores flaqueadores e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL para cada característica

(conclusão)

Característica	Chr.	Posição (cM)	Nº Marcadores	Marcadores flaqueadores	R²	Autores
Peso corporal 112 dias idade	27**	7	2	MCW0300-MCW0328	2.7	Kerje et al., 2003
Peso corporal 200 dias idade	27**	20	2	MCW0300-MCW0328	3.1	
Crescimento 46-112 dias idade	27**	9	2	MCW0300-MCW0328	2.7	
Peso corporal 200 dias idade	Z*	22	6	-	2.3	
Crescimento 112-200 dias idade	Z*	22	6	-	2.2	
Peso vivo 239 dias idade	27*	0	-	ADL0376	6.0	Sasaki et al., 2004
Peso vivo 35 dias idade	27**	40	-	COL1A1-ADL0376	8.4	
Peso vivo 55 dias idade	27**	49	-	COL1A1-ADL0376	6.3	
% gordura abdominal	27 [†]	11	3	MCW0076-ADL0376	-	Jennen et al., 2005
Peso vivo 5 semanas	27 [†]	9	3	MCW0076-ADL0376	-	
% gordura intramuscular	27 [†]	23	3	MCW0328-ADL0376	-	
Peso vivo 14 dias de idade	28 [†]	0	-	MCW0227	1.4	Jacobsson et al., 2005
Peso das canelas	27**	5	-	MCW0076-MCW0292	6.6	Park et al., 2005

** Nível de significância 1% no genoma; * Significativo a 5% no genoma; [†] Ligação sugestiva no cromossomo ou genoma, dependendo dos resultados do trabalho de cada autor.

Quatrocentos e quarenta e dois animais F_2 divididos em 30 famílias, obtidas do cruzamento de uma linha macho de corte com uma de postura foram utilizadas por Ikeobi et al., (2002) para mapear QTLs para característica de gordura. Um total de 103 marcadores microssatélites foi utilizado em 26 grupos de ligação, cuja análise de mapeamento identificou com nível de significância a 5% no genoma QTLs para peso da gordura abdominal, gordura abdominal e gordura na pele. Um QTL com ligação sugestiva para peso da gordura na pele também foi identificado na análise.

Kerje e colaboradores em 2003 desenvolveram uma população experimental de 851 animais F_2 a partir do cruzamento entre um macho *Red junglefowl* com três fêmeas *white leghorn*, para mapeamento de QTLs que afetam crescimento e produção de ovos. Utilizando o método de análise descrito por Haley et al., (1994) foram identificados QTLs significativos a 1% no genoma para peso corporal aos 112º e 200º dias de idade, além de outro QTL para crescimento dos 46º aos 112º dias de idade no cromossomo 27. No cromossomo Z foram identificados QTLs com 5% de significância no genoma para peso corporal aos 200 dias de idade e crescimento dos 112 aos 200 dias de idade.

No trabalho de Sasaki et al., (2004) sobre QTLs que afetam características de peso vivo e produção de ovos em um cruzamento de galinhas F_2 , foram testados 498 marcadores e 265 animais F_2 . Utilizando mapeamento por intervalo do programa Map Manager QTX b18 foram mapeados um QTL no cromossomo 27 para peso vivo com nível de significância 5% no genoma, e no cromossomo Z para a mesma característica.

Um estudo sobre localização de QTLs que influenciam gordura, cruzando duas linhas geneticamente diferentes de galinhas de corte originárias da raça *White Plymouth Rock*, foi desenvolvida por Jennen e colaboradores em 2004. No cromossomo 27 foi detectado QTL entre os marcadores MCW0076 e MCW0146, com ligação sugestiva para porcentagem da gordura abdominal a nove semanas de idade na posição 0 cM. Outro trabalho publicado pelo mesmo autor no ano de 2005, também sobre QTLs que afetam gordura, foi mapeado no cromossomo 27 QTL para peso vivo a 5 semanas de idade com ligação sugestiva no cromossomo, utilizando 1006 animais F_2 e 22 marcadores.

Schreiweis e colaboradores (2005) estudando a importância das fraturas ósseas decorrentes da osteoporose no fim da fase produtiva de ovos das galinhas poedeiras mapearam QTLs a 1% de significância no genoma para peso vivo aos 35 e 55 dias de idade no cromossomo 27, em uma população experimental de 508 animais F_2 , delineada para identificação de locos de características quantitativas associados à força e mineralização óssea. Foram utilizados 120 marcadores microssatélites.

2.6 Aplicação dos QTLs em programas de melhoramento (MAS)

De acordo com Dekkers (2004), com o avanço ocorrido nas últimas décadas na genética molecular, foi possível identificar múltiplos genes ou marcadores genéticos associados a genes que afetam características de interesse na produção animal, incluindo os QTL responsáveis pelo desenvolvimento de características importantes. A validação e implementação em programas de melhoramento das regiões ou genes responsáveis por determinada característica depende da integração dos vários estudos realizados, o que se torna bastante dificultoso devido a grande variação existente entre eles.

A seleção assistida por marcadores através dos dados gerados a partir do estudo de locos de características quantitativas possui o potencial de aumentar a precisão da seleção nos programas de melhoramento animal, particularmente para características difíceis de serem mensuradas, como por exemplo, resistência a doenças, reprodução e carcaça (SASAKI et al., 2004).

Os efeitos da seleção assistida por marcadores no melhoramento genético são difíceis de quantificar mesmo sob condições experimentais, e vários aspectos são muito estudados antes da validação de um marcador genético para determinada finalidade, sendo eles: O desenvolvimento do marcador e mapeamento de QTL; avaliação assistida do marcador genético (procedimento onde são necessárias várias mudanças no modelo genético animal); estimação de componentes de variância e extensivos recursos computacionais; implementação logística; etapa muito importante devido a alta exigência para geração de dados fenotípicos; genotipagem; avaliação genética e seleção dentro de família e ganho genético, onde são estudados

oportunidades de se obter os ganhos a partir dos conhecimentos do QTL específico e sua associação com marcadores, juntamente com a relação das populações utilizadas e seus dados fenotípicos. E por fim a comercialização, onde são estabelecidas e discutidas as oportunidades de propriedade intelectual e patente (DEKKERS, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População experimental

O planejamento e desenvolvimento da população experimental utilizada neste estudo foi realizado pela Embrapa Suínos e Aves, Concórdia SC, a partir da seleção de duas linhas distintas de *Gallus gallus*, uma de corte (TT) e outra de postura (CC). Ambas foram selecionadas por várias gerações para características valorizadas no mercado (aumento da musculatura, por exemplo) utilizando cruzamentos entre diferentes raças: linha de corte TT originou-se do cruzamento das raças Cornish, Hampshire e White Plymouth Rock, e a de postura CC da raça White Leghorn. A linha macho TT, ou de corte foi selecionada por seis gerações desde sua formação em 1985, com objetivo de melhorar peso corporal, conversão alimentar, rendimento de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, reduzir doenças metabólicas e gordura abdominal. Já a linhagem de postura foi selecionada por oito gerações, desde 1989, para melhorar a produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e redução do peso corporal.

Para a formação da população para estudos de QTL, foram feitos cruzamentos recíprocos entre as linhagens na proporção de um macho para uma fêmea. Sete machos (TT) foram acasalados com sete fêmeas (CC) e mantidos em gaiolas individuais, com controle de pedigree. Os ovos foram identificados para possibilitar o anelamento ao nascer dos pintos da primeira geração, chamados de F_1 . Esta geração (TC) constou de sete famílias obtidas do cruzamento de machos de corte com fêmeas de postura. A segunda geração, chamada de F_2 , foi desenvolvida a partir da seleção de um macho e três fêmeas ao acaso das sete famílias da geração F_1 . Cada macho F_1 fecundou três fêmeas F_1 , através de inseminação artificial, evitando-se parentes próximos. Um total de sete machos e vinte e uma fêmeas F_1 gerou cerca de cem pintos F_2 por família de F_1 em dezessete incubações, com intervalos de quinze dias entre elas, durante aproximadamente oito meses, totalizando 2.063 aves F_2 , metade de

cada sexo (Tabela 1). Essa geração F_2 foi anelada, submetida a controle individual de pedigree e avaliada para várias características de desempenho. As aves foram criadas como frangos de corte, recebendo ração e água à vontade; foram mantidas em *boxes* coletivos até os 35 dias de idade, quando cada ave foi pesada e alojada em gaiola individual para teste de conversão alimentar dos 35 aos 41 dias.

Neste estudo foram feitas as genotipagens de cinco famílias F_2 com os marcadores microssatélites dos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28. Estas famílias foram selecionadas com base em estudos anteriores nos cromossomos 1 ao 5, devido ao maior número de marcadores informativos encontrados na genotipagem seletiva (BARON et al. 2003; NONES et al. 2003 e RUY et al. 2003). Também foram realizados estudos nos cromossomos 6 a 8, 11 e 13, tornando o presente trabalho um complemento para concluir a varredura do genoma da galinha para características de desempenho.

Nas Tabelas 1 e 2 são apresentadas a estrutura da população referência e as relações de parentesco, respectivamente:

Tabela 2 - Número de aves por geração do cruzamento TC

Geração	Machos	Fêmeas	Total
Parental	7	7	14
F_1	7	20 ^a	27
F_2	1.039	1.024	2.063

^a Houve perda por morte de uma fêmea F_1

Tabela 3 - Relações de parentesco nas famílias originadas do cruzamento TC

Casais Parentais: macho TT fêmea CC (nº casal)	<u>5649</u> 886 (1)	<u>5661</u> 88 (2)	<u>5561</u> 570 (3)	<u>6232</u> 332 (4)	<u>5921</u> 37 (5)	<u>6037</u> 241 (6)	<u>5596</u> 05 (7)
Nº de F_2 gerados por mãe (Nº da mãe F_1)	100 (7761) 77 (7810)* 100 (7978)*	96 (7749) 97 (7816)* 100 (7709)	99 (7972) 100 (7812) 108 (7992)	73 (7765)* 100 (7971)* 97 (7798)	95 (7713) 104 (7980) 101 (7755)	102 (7722) 100 (7771) 80 (7987)	88 (7805) 103 (7736) 102 (7743)

Os números apresentados para machos e fêmeas são equivalentes aos anéis das aves. * Famílias que estão sendo utilizadas neste estudo

3.2 Colheita de dados fenotípicos e de amostras de sangue

As características fenotípicas utilizadas para avaliar o desempenho foram: peso ao nascer (pnas), peso aos 35 (pv35) e 41 (pv41) dias de idade, ganho de peso dos 35 aos 41 dias (gp35-41), consumo de ração (cr35-41), e eficiência alimentar dos 35 aos 41 (ef35-41) dias de idade. Os dados fenotípicos foram armazenados no banco de dados do setor de melhoramento da Embrapa Suínos e Aves para posteriores estudos.

Para a colheita das amostras de sangue, foram utilizados tubos contendo anti-coagulante EDTA 10%. As amostras foram armazenadas em freezer a -70 °C. Dos animais parentais foram colhidas três amostras de sangue (de aproximadamente 1,6 mL cada/semana) da veia braquial totalizando 05 mL. Dos indivíduos F₁ e F₂ o sangue foi coletado durante o abate após o corte na veia jugular.

Os abates dos animais se encerraram em agosto de 2000, porém a organização e a separação das alíquotas de sangue se estenderam até março de 2001. Terminada esta etapa, partes das alíquotas foram enviadas para Esalq/USP (Piracicaba, São Paulo) e a outra parte foi mantida em estoque na Embrapa Suínos e Aves para posteriores estudos.

3.3 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das amostras de sangue das famílias utilizadas neste estudo foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal da Esalq/USP.

Para os indivíduos parentais (P) e F₁ houve a necessidade de fazer a extração utilizando proteinase K (Anexo 1), devido a qualidade inferior do sangue e pequena quantidade de DNA obtida quando extraído utilizando DNAzol.

A extração do DNA dos indivíduos F₂ foi realizada utilizando o reagente à base de guanidina tiocianato, DNAzol[®] (Invitrogen Life Technologies, Anexo 2), que promove a lise e liberação do conteúdo celular por meio de sua ação detergente. O protocolo original foi modificado e ajustado para as condições do laboratório (CAMPOS et al., 2003).

Primeiro adicionou-se em um tubo eppendorff contendo 5 μ L de sangue, 500 μ L do reagente DNAzol[®] (homogeneizar bem a solução), seguido da adição de etanol absoluto, que resultou na precipitação do DNA. Posteriormente “pescou-se” o DNA (*pellet*) com a micropipeta, descartou-se o sobrenadante e retornou o DNA ao interior do tubo, lavando as amostras com etanol 95% e centrifugando por 10 minutos a 1.400 g duas vezes. Terminadas as duas lavagens, foi feita a secagem dos tubos à temperatura ambiente por 10 minutos, ressuspensão do DNA com 150 μ L de água ultrapura e incubação a 37 °C por 4 horas.

Concluída a extração, foi realizada a quantificação do DNA em espectrofotômetro (modelo HITACHI-U2000) e a diluição em água ultrapura para uma concentração padrão (20 ng/ μ L). As amostras foram testadas em gel de agarose 1% para verificar a integridade e qualidade do DNA.

3.4 Escolha dos marcadores microssatélites

Os primeiros iniciadores (primers) utilizados para amplificar marcadores microssatélites neste estudo fazem parte do “kit 7”, um dos integrantes de uma série de outros “kits” contendo vários iniciadores distribuídos gratuitamente pela *Michigan State University* através do projeto “Chicken Genome Project”. Este “kit” possui um total de 12 iniciadores, distribuídos nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 que foram listados na Tabela 4, juntamente com o restante dos marcadores adicionados posteriormente para adensar mais os cromossomos ou substituir os que não geraram produto de PCR.

Cada um possui sua respectiva posição em centiMorgans (cM) e durante o projeto foram adicionados mais 8 iniciadores doados pelo Roslin Institute. Quando houve baixo nível de polimorfismo, ou não houve amplificação por PCR de algum marcador, esses foram descartados e substituídos. Na Tabela 5 estão presentes todos os iniciadores que produziram fragmentos amplificados por PCR, e prosseguiram até a análise de mapeamento de QTL.

Tabela 4 - Total de marcadores utilizados no projeto, o número do cromossomo, a quantidade de iniciadores estabelecidos e a posição em centimorgans de cada um segundo o mapa consenso (SCHMIDT, 2005). Os assinalados correspondem aos marcadores doados posteriormente pela Roslin Institute

Cromossomos (Tamanho)	Marcador	Posição (cM)
19 (40 cM)	MCW0094	9
	* MCW0278	27
	MCW0287	40
23 (13 cM)	ADL0262	0
	LEI0090	15
24 (58 cM)	ROS0302	20
	MCW0301	48
	* LEI0069	58
26 (67 cM)	ROS0314	20
	MCW0209	36
	* LEI0074	67
27 (69 cM)	* MCW0076	00
	MCW0300	11
	* ROS0059	34
	* MCW0328	47
	ADL0376	67
28 (75 cM)	ABR0341	24
	* ADL0284	25
	MCW0204E	± 40-56
	* ADL0299	60

* corresponde a marcadores novos inseridos posteriormente

Tabela 5 - Total de marcadores que funcionaram após os testes de otimização, prosseguindo até a etapa de genotipagem e análise de QTLs para características de desempenho

(conclusão)

Cromossomos (Tamanho)	Marcador	Posição (cM)
19	MCW0094	9
(40 cM)	MCW0287	40
23	ADL0262	0
(13 cM)	LEI0090	15
24	ROS0302	20
(58 cM)	MCW0301	48
	* LEI0069	58
26	ROS0314	20
(67 cM)	* LEI0074	67
27	MCW0300	11
(69 cM)	* MCW0328	47
	ADL0376	67
28	ABR0341	24
(75 cM)	* ADL0284	25
	MCW0204E	± 40-56

* corresponde a marcadores novos inseridos posteriormente

Maiores detalhes sobre os marcadores utilizados, como seqüência dos iniciadores, tamanho do produto amplificado, temperatura de anelamento e condições de amplificação, podem ser obtidos na página do *Chicken Genome Project*. <http://www.genome.iastate.edu/chickmap/>.

3.5 Amplificação de microssatélites por PCR

Para solubilizar os iniciadores liofilizados na concentração padrão de 25 pmoles/ μ L foi utilizado T.E. (Tris - EDTA), e nas reações de PCR utilizou-se água Milli-Q para diluição em concentração padrão de 2,5 pmoles/ μ L. Os protocolos de PCR utilizados neste trabalho foram os mesmos empregados nos estudos anteriores (Baron

et al. 2004, Nones et al. 2004 e Ruy et al. 2004), porém algumas alterações foram necessárias no decorrer do projeto, devido a mudanças nas condições de otimização, como a reposição de novas alíquotas de soluções de reagentes que altera o protocolo otimizado. Outro fator veio com a utilização constante do DNA das famílias e dos marcadores, que ocorreu uma diminuição natural da qualidade da reação, que precisa ser corrigida através de mudanças nas concentrações dos reagentes, ou reposição do DNA na placa em último caso.

Nas tabelas 6 e 7 abaixo estão descritos em detalhes os programas de amplificação utilizado no termociclador e o protocolo da PCR:

Tabela 6 - Programa utilizado pelo termociclador para amplificação do DNA (PCR)

Condições utilizadas para marcadores MCW, LEI, ADL e ROS	
1	95 °C por 2 minutos
2	95 °C por 1 minuto
3	45 a 67 °C por 1 minuto*
4	72 °C por 1 minuto
5	Repetir passos 2 ao 4 (29 vezes)
6	72 °C por 10 minutos
7	10 °C indefinidamente
8	fim

*A temperatura de anelamento variou dependendo do marcador

Tabela 7 - Protocolo da reação de PCR para os marcadores microssatélites

Reagentes	LEI, MCW, ADL, ROS (μL)	
	(1)	(2)
Água ultrapura	9,4	5,64
Tampão (10x)	2,5	1,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,3	1,38
dNTP(10 mM)	1,0	0,6
Primer R (2,5 pmoles/μL)	2,0*	1,2
Primer F (2,5 pmoles/μL)	2,0*	1,2
Taq DNA pol (5 U/μL)	0,8	0,48
DNA (20 ng/μL)	5,0	3,0
Volume Total	25,0	15,0

(1) Protocolo ajustado para volume final de 25 μL, (2) Protocolo ajustado para volume final de 15 μL,

* Dependendo do Marcador

Devido aos vários testes realizados para otimizar as reações da PCR, foi necessário gastar uma quantidade considerável dos primers, levando a diminuição do volume final da reação de 25 μ L para 15 μ L.

3.6 Genotipagem

Primeiramente, foram genotipados os animais P e F₁ das cinco famílias selecionadas, com a finalidade de identificar os marcadores que possuíam maior diversidade de alelos e, conseqüentemente, conferir uma maior possibilidade de acompanhamento da segregação dos mesmos através das gerações de cada família. Para estes marcadores informativos, foram realizadas as genotipagens de aproximadamente oitenta e quatro animais F₂ por família no seqüenciador e genotipador automático MegaBACE 1000, utilizando o programa *Genetic Profiler* (ambos da GE HealthCare) para identificação, análise do tamanho dos fragmentos amplificados e verificação da segregação correta dos alelos.

As amostras de DNA dos animais foram mantidas e organizadas em placas de noventa e seis poços, de modo que os indivíduos F₂ e os parentais (P) de cada família F₁ ficassem na mesma placa. Os 10 animais parentais utilizados nas placas das cinco famílias serviram como controle interno, para evitar erros causados pela diferença de migração dos alelos dos diferentes marcadores nos capilares do equipamento. Alguns parentais foram repetidos nas placas para aumentar a segurança e diminuir a chance de alelos errados nas famílias.

Para realização da genotipagem, combinou-se o produto da PCR de três a quatro marcadores, com base na fluorescência do iniciador e no tamanho do fragmento amplificado, de modo que não houvesse sobreposição com relação ao tamanho. O marcador interno de peso molecular ET-ROX 400 (GE HealthCare) foi adicionado aos marcadores onde forneceu os picos padrão para orientação do tamanho e posição do marcador, tornando possível a análise do fragmento. Todos os genótipos foram conferidos manualmente.

3.7 Mapas de ligação

Os dados dos genótipos referentes aos marcadores de cada cromossomo foram reunidos em uma planilha e posteriormente submetidos à análise de ligação multiponto com o auxílio do programa CRI-MAP (GREEN et al., 1990), determinando assim as distâncias entre marcadores (mapa de ligação). Foram realizados em seguida os procedimentos de análise do mapa de ligação utilizando as seguintes ferramentas disponibilizadas pelo programa: *Twopoint*, que testou a possibilidade de haver ou não ligação entre cada par de marcadores, gerando valores de LOD com probabilidade de ocorrência de ligação, *build* que determinou a ligação entre os marcadores e os ordenou de acordo com a taxa de recombinação, fixando primeiro os marcadores com maior taxa de recombinação, inserindo posteriormente o restante dos marcadores; e o procedimento *flips* conferiu os valores de LOD enquanto era alterada a ordem de cada par de marcadores, fixando os outros. Para comprovação de ligação foi aceito um valor de LOD superior a 2, que sugere que a hipótese dos marcadores estarem ligados é 100 vezes mais verossímil (provável) que a hipótese de não estarem ligados. A última análise, *chrompic* mostrou a fase de ligação dos marcadores alinhados no cromossomo para cada indivíduo. Esta opção foi executada para identificar animais que tinham a possibilidade de apresentaram duplas ou triplas recombinações, os quais foram reexaminados nos respectivos eletroferogramas.

3.8 Análise de Mapeamento de QTLs

O método de análise empregado para o mapeamento de QTLs por intervalos foi o mesmo proposto por Haley et al. (1994) que se baseia em regressão linear e estimação de quadrados-mínimos. A opção análise F_2 do programa QTL Express (SEATON et al., 2002) foi escolhida porque este modelo foi desenvolvido para pedigree de três gerações, além de permitir análise de QTL a partir do cruzamento de linhagens não-consangüíneas. Na primeira etapa da análise foi calculada a probabilidade de um indivíduo F_2 possuir cada um dos genótipos do QTL a cada centiMorgan na dependência do genótipo dos marcadores. Em seguida modelos

lineares para efeito aditivo (a) e aditivo + dominância (a+d) de um QTL numa determinada posição foram ajustados através de quadrados mínimos para cada característica. O efeito aditivo é estimado através da metade da diferença entre os valores dos F₂ homozigotos para os alelos do QTL provenientes da linhagem de corte e de postura e o efeito de dominância a diferença entre os valores dos heterozigotos e a média dos homozigotos.

A análise F₂ pressupõe que o QTL tem alelos alternativos fixos nas linhagens fundadoras de corte e de postura, apesar delas poderem compartilhar alelos dos marcadores. O modelo incluiu os efeitos fixos de família, sexo e incubação para todas as características avaliadas, independente da característica considerada, utilizando a covariável peso vivo aos 35 dias somente para as seguintes características: gp35-41, cr35-41 e ef35-41.

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

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

Onde r é a contribuição de um cromossomo, obtida dividindo-se o comprimento do cromossomo (ou segmento) estudado pelo comprimento do genoma autossômico. A partir de 10.000 permutações realizadas na análise de QTL, foram obtidos empiricamente, segundo Churchill e Doerge (1994), os valores de F que correspondiam aos níveis de significância sugestivo e 5% de detectar QTLs em algum lugar em todo o genoma, para cada característica. Caso o teste estatístico F na análise

inicial excedesse o valor limiar (*threshold*) de sugestivo no genoma, as interações do QTL com os efeitos fixos de sexo e família eram testadas. Em seguida foi calculada a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL a partir do modelo mais apropriado e estimado o intervalo de confiança a partir da opção *bootstrap with resampling* do programa *QTL Express*.

4 Resultados e Discussão

4.1 Extração de DNA

Projetos de mapeamento de QTL necessitam de DNA de boa qualidade e em quantidade suficiente para várias amplificações, pois além de facilitar as reações de padronização por PCR, existem situações onde o número de testes e procedimentos exigem uma demanda maior de DNA, sendo uma etapa de grande importância.

Existem atualmente muitas metodologias para extração de DNA a partir do sangue, porém o custo e a qualidade final dos mesmos podem ser diferentes.

Nos estudos realizados com os cromossomos 1 ao 7, foram testados vários protocolos de extração de DNA com o objetivo de obter produto final de qualidade e em quantidade suficiente para utilização nas reações de PCR. O reagente DNAzol[®] foi escolhido para a extração devido à rapidez, praticidade de uso e alta quantidade de produto final gerado, sendo necessárias algumas modificações para economizar reagente e tempo (CAMPOS et al., 2003). As amostras que apresentaram difícil extração com o DNAzol[®] (sangue muito coagulado por exemplo) ou pouca quantidade de DNA final extraído, foi utilizado o protocolo de extração com proteinase K.

Após o procedimento, todas as amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro para determinar a concentração inicial e posterior padronização de 20 ng/ μ L, juntamente com a verificação da qualidade da extração por meio da quantificação das proteínas e impurezas que não foram eliminadas no processo e que são detectadas pela relação dos comprimentos de onda 260/280 nm do aparelho. Em seguida foram aplicadas em gel de agarose 1% para verificar a integridade e qualidade do DNA (Figuras 1 e 2):

Figura 1 - Eletroforese das amostras de DNA de animais P e F_1 extraídas e aplicadas em gel de agarose (1,0%). Na primeira e última canaleta foi aplicado como padrão de peso molecular, o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações de 100 e 200 ng, respectivamente

Figura 2 - Amostras de DNA de indivíduos F_2 da família 7810, extraídas e aplicadas em gel de agarose (1,0%) sob eletroforese. Nas primeiras e últimas canaletas, foi aplicado como padrão de peso molecular o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações 100 e 200 ng, respectivamente

Figura 3 - Amostras de DNA de animais F_2 da família 7978, extraídas e aplicadas em gel de agarose (1,0%) sob eletroforese. Nas primeiras e últimas canaletas, foi aplicado como padrão de peso molecular o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações de 100 e 200 ng

Figura 4 - Eletroforese das amostras de DNA de indivíduos F_2 da família 7971, extraídas e aplicadas em gel de agarose (1,0%). Nas primeiras e últimas canaletas, foi aplicado como padrão de peso molecular o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações de 100 e 200 ng

Figura 5 - Gel de agarose (1,0%) contendo as amostras de DNA extraídas de animais F_2 da família 7765. Nas primeiras e últimas canaletas, foi aplicado como padrão de peso molecular o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações de 100 e 200 ng, respectivamente

4.2 Amplificação por PCR

Devido ao grande número de marcadores, e com objetivo de economizar tempo e soluções, os testes para otimização foram feitos em baterias. Três amostras de DNA de animais F_2 que obtiveram bons resultados em testes anteriores e um controle positivo foram utilizados para um teste inicial à 55 °C. Os que obtiveram boa amplificação passaram para a fase seguinte: a PCR das amostras dos indivíduos parentais e F_1 das 5 famílias selecionadas. Os marcadores que não amplificaram foram analisados individualmente e submetidos a mudanças nas condições de reação, como aumento da concentração de *primers*, por exemplo.

Quando a temperatura de anelamento teve de ser modificada, os marcadores que apresentavam o mesmo problema foram agrupados e a PCR foi refeita, sob as novas condições estabelecidas.

Nesta etapa, são testadas muitas modificações no protocolo para obter bons resultados, mas isto demanda muito tempo e não há certeza da garantia de otimização. Portanto, selecionar outros marcadores localizados nas mesmas regiões cromossômicas para não correr o risco de ficar com um grande intervalo caso o marcador em questão não amplifique, seria o ideal. Zhu et al. (2001) encontraram o mesmo problema ao testarem diferentes temperaturas de anelamento e concentrações de magnésio (Mg^{++}) na amplificação de seus marcadores. O resultado foi cerca de dois terços do total que não produziram quantidades satisfatórias de produto de PCR, restando como melhor opção descartá-los e substituí-los.

No decorrer do trabalho foram gastas quantidades consideráveis das soluções de primers devido as constantes mudanças no protocolo de reação para mantê-los funcionando corretamente. Portanto, para genotipar o restante das famílias com os marcadores cuja disponibilidade era pequena, foi necessário reduzir o volume final da reação.

Dos 08 marcadores doados pelo Roslin Institute, Escócia, 04 (MCW0278, MCW0076, ROS0059 e ADL0299) falhou, e 4 foram amplificados com sucesso (LEI0069, LEI0074, MCW0328 e ADL0284). Estes iniciadores não foram liofilizados na origem e foram transportados já diluídos. Quando chegaram ao Brasil ficaram bloqueados na alfândega e não se sabe sob quais condições foram mantidos durante aproximadamente dois meses.

Após a reação de PCR, verificou-se a qualidade do produto amplificado em gel de agarose 2% antes da etapa de genotipagem. Este teste permitiu identificar, através dos padrões de migração das bandas no gel, possíveis problemas que tenham ocorrido, solucionando-os até a otimização. Por exemplo, se um gel de agarose 2% contendo as amostras de um marcador qualquer apresentasse bandas inespecíficas, haveria possibilidade de a temperatura ideal na etapa de anelamento do primer na fita de DNA-alvo estar errada. Isto, por sua vez, ocasionaria a perda da especificidade do primer no momento da ligação por complementaridade das bases, gerando cópias de tamanhos diferentes. A insuficiência de reagentes no mix, como o cloreto de magnésio, cofator da enzima Taq DNA polimerase também poderia desequilibrar a reação,

diminuindo sua atividade e produzindo poucas cópias do fragmento desejado, visualizando no gel de agarose somente uma banda fraca e pouco nítida.

Os exemplos abaixo representam amplificações bem sucedidas, com formação de bandas bem definidas, sem rastro e com alta intensidade (Figuras 6, 7 e 8), além de uma PCR com pouco produto amplificado e com formação de dímeros de primer (Figura 9).

Já nas figuras 10 e 11 são observados dois exemplos distintos de PCR em gradiente de temperatura, onde foi possível determinar a condição ideal de anelamento de um marcador e de outro não. Uma faixa de temperatura é selecionada (por exemplo, de 52 a 61 °C) e três amostras, uma delas o controle negativo é amplificada para uma temperatura.

Figura 6 - Indivíduos da família 7765 genotipados com o marcador ABR0341 do cromossomo 28 (à esquerda) e MCW0328 do cromossomo 27 (à direita). O tamanho de bandas esperado foi 229-247 pb e 255-267 pb, respectivamente. O marcador de peso molecular ϕ X-174/*Hae* III (Invitrogen Life Technology) foi aplicado entre as amostras

Figura 7 - Marcador MCW0094 (cromossomo 19) amplificado para indivíduos da família 7816 (à esquerda), padrão esperado de bandas 70-100 pb. O outro marcador do cromossomo 24, MCW0301 (à direita), possui fragmento de 266-284 pb. Entre os marcadores foi aplicado o peso molecular ϕ X-174/*Hae* III (Invitrogen Life Technology)

Figura 8 - PCR dos iniciadores ADL0376 e MCW0300 do cromossomo 27. O exemplo demonstra duas reações de PCR que apresentaram pouco produto de PCR (bandas com intensidade fraca). Além disso, no marcador ADL0376 houve formação dímeros de primer, causados pela temperatura errada ou tampão com pH fora do ideal

Gradiente MCW0301

Figura 9 - Teste de otimização do marcador MCW0301, submetido a um gradiente de temperatura de 53 °C (duas primeiras bandas) à 65 °C (duas últimas bandas). Foram utilizados duas amostras de DNA e um controle negativo em cada temperatura de anelamento. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular øX174 RF DNA/*Hae* III

Gradiente MCW0278

Figura 10 - Um dos testes de otimização em gradiente de temperatura (48 – 63°C) do marcador MCW0278 do cromossomo 19. Foram utilizadas 03 amostras de DNA por temperatura, sendo uma delas o controle positivo. Na primeira canaleta foi aplicado marcador de peso molecular øX174 RF DNA/*Hae*

4.3 Seleção dos marcadores informativos e genotipagem

A seleção foi feita a partir da genotipagem dos animais parentais e F_1 das famílias selecionadas, para os marcadores que obtiveram sucesso nos testes de amplificação. Dos 20 marcadores inicialmente selecionados, 04 (MCW0278, MCW0209, ROS0059, ADL0299) não amplificaram, e 01 (MCW0076) geraram somente 01 alelo na genotipagem, sendo então descartado. Na Tabela 7 estão presentes todos os marcadores que foram utilizados na genotipagem dos indivíduos F_2 e as respectivas informações sobre tamanho, número de alelos e marcação fluorescente.

Tabela 8 - Número de alelos gerados por marcador, tamanho em pares de base e a fluorescência dos marcadores utilizados para genotipagem dos indivíduos F_2 das cinco famílias

Cromossomos (Tamanho)	Marcador	Nº Alelos	Tamanho (*pb)	Marcação
19 (40 cM)	MCW0094	04	70-100	FAM
	MCW0287	05	237-258	FAM
23 (13 cM)	ADL0262	03	100-115	FAM
	LEI0090	04	200-220	HEX
24 (58 cM)	ROS0302	03	91-115	FAM
	MCW0301	04	266-284	HEX
	• LEI0069	03	235-265	FAM
26 (67 cM)	ROS0314	03	128-142	FAM
	• LEI0074	04	300-320	FAM
27 (69 cM)	MCW0300	02	123-130	FAM
	• MCW0328	03	255-267	FAM
	ADL0376	03	170-185	FAM
28 (75 cM)	ABR0341	04	229-247	FAM
	• ADL0284	06	137-254	HEX
	MCW0204E	02	91-103	HEX

*pares de base; • Marcadores inseridos posteriormente

A classificação sugerida por Zhu et al., (2001) foi adotada para selecionar os marcadores considerados informativos quando pelo menos um dos indivíduos de cada par F_1 foi heterozigoto e o outro F_1 apresentou genótipo diferente para o mesmo loco. Em adição, Zhu e colaboradores postularam neste mesmo trabalho, que em populações não endogâmicas grande parte dos locos não são informativos, reduzindo o poder de detecção de QTLs.

Por isso, aumentar o número de famílias utilizadas aumenta as chances de obtenção de informação em determinado loco. Crooijmans et al. (1996), ressaltaram a importância de análises preliminares baseadas em polimorfismo dentro das linhas utilizadas em estudos de ligação e associação, pois os marcadores podem ser polimórficos em uma linha e monomórficos em outra.

As Figuras 11, 12 e 13 representam os resultados de uma genotipagem feita no seqüenciador automático Mega BACE1000, visualizada e trabalhada no

programa *Genetic Profiler* (GE HealthCare). As figuras mostram o formato de saída dos dados de cada animal, como são comparados os alelos entre os animais da mesma família e onde são retirados os dados brutos de genótipo.

As informações de cada indivíduo foram tabuladas e transformadas em planilhas para construção dos mapas de ligação e análise de mapeamento de QTL.

Figura 11 - Representação da saída dos dados do programa *Genetic Profiler* do marcador MCW0246 da família 7978

Figura 12 - Os picos ilustrados são do marcador MCW0331 da família 7971. Gráficos 1 a 3 representaram indivíduos parentais, que eram homozigotos para o marcador. O animal F_1 (número 4) também se mostrou homozigoto

por família e o número de cada animal juntamente com seu parentesco (pai e mãe). A Figura 15 abaixo ilustra um exemplo da planilha.

Através do método da máxima verossimilhança, o programa utiliza a função de Kosambi para transformar a fração de recombinação em distâncias em centiMorgans (cM). Os marcadores são ordenados e posicionados nos mapas de ligação e posteriormente comparados com o mapa consenso 2005, para serem utilizados na análise de mapeamento de QTLs.

Cada mapa gerado neste estudo recebeu o nome de EMBRAPA e foi utilizado o mapa consenso 2005 (SCHMID et al., 2005) para comparação, que foi derivado de três populações referência: East Lansing (CRITTENDEN et al., 1993), Compton (BUMSTEAD; PALYGA, 1992) e Wageningen (GROENEN et al., 1998).

Todos os marcadores inseridos em seus respectivos cromossomos não apresentaram alteração na ordem ou inversão, de acordo com o mapa consenso. As representações gráficas foram feitas com a utilização do programa *MapChart* versão 2.1 (VOORRIPS, 2002) .

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	5											
2	2											
3	Adi262	Lei90										
4	familia7810											
5	77											
6	5649	0	0	1								
7	0	0	207	209								
8	886	0	0	0								
9	105	107	207	215								
10	6232	0	0	1								
11	110	110	207	217								
12	332	0	0	0								
13	105	107	209	209								
14	7716	886	5649	1								
15	105	107	209	215								
16	7810	332	6232	0								
17	107	110	209	217								
18	786	7810	7716	1								
19	107	107	209	217								
20	787	7810	7716	1								
21	105	107	209	217								
22	788	7810	7716	1								
23	105	110	209	217								
24	789	7810	7716	1								
25	107	107	209	209								

Figura 14 - Ilustração do formato da planilha necessária para processar e montar o mapa de ligação dos cromossomos no programa CRIMAP

Os dados de meioses informativas totais e de fase conhecida de todos os marcadores dos cromossomos trabalhados estão representados na Tabela 8.

Tabela 9 - Número de meioses informativas totais e de fase conhecida dos marcadores dos cromossomos estudados

Cromossomo	Marcador	Nº Meioses informativas totais	Nº Meioses informativas de fase conhecida
19	MCW0094	647	647
	MCW0287	547	137
23	ADL0262	810	650
	LEI0090	800	630
	ROS0302	621	333
24	MCW0301	731	413
	LEI0069	388	0
26	ROS0314	385	299
	LEI0074	638	538
	MCW0300	557	59
27	MCW0328	806	494
	ADL0376	483	301
	ABR0341	700	234
28	MCW0204E	493	241
	ADL0284	603	603

Cromossomo 19

O cromossomo contou com dois marcadores iniciais, e durante o andamento do estudo foi feito a tentativa de inserir o MCW0278, que apresentou problemas de amplificação, não sendo possível adicioná-lo. Pelo fato de haver dois marcadores no cromossomo e apresentar um tamanho de 33,9 cM, pode ser considerado um grupo de ligação.

O mapa da população estudada, e o mapa consenso são mostrados na Figura 15:

Figura 15 - Mapa de ligação do cromossomo 19 da população em estudo (Embrapa) e o mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

Comparando a diferença entre as distâncias dos intervalos dos marcadores MCW0094 e MCW0287 dos dois cromossomos, observa-se que tanto o mapa da população Embrapa quanto o consenso 2005 possuem quase o mesmo tamanho (apenas 2,9 cM de diferença).

O marcador MCW0094 apresentou excelente número de meioses informativas totais e de fase conhecida, ao contrário do MCW0287 que possui 25,04% de meioses informativas de fase conhecida em relação ao total (Tabela 8). Esse número mais reduzido de meioses informativas pode ter sido a causa da diferença entre os intervalos do grupo de ligação e o mapa.

Os diferentes tamanhos entre os mapas consenso 2005 e Embrapa podem ser explicados pelos seguintes fatores: número de indivíduos genotipados e espécie estudada e também o número de alelos gerados por marcador, que modifica as taxas de recombinação entre os mesmos nas populações.

Cromossomo 23

O mapa de ligação do cromossomo 23, também pode ser considerado um grupo de ligação, e apresentou um tamanho relativamente maior (62,0 cM) em relação ao mapa consenso que possui apenas 13 cM.

Figura 16 - Mapa de ligação do cromossomo 23 consenso (Schmid et al., 2005) e o grupo de ligação gerado pela população da Embrapa. O marcador LEI0090 não possui posição fixa no mapa consenso podendo, portanto cobrir uma grande amplitude no mapa

Pelo fato do marcador LEI0090 não ter posição fixa no mapa, e poder se ligar em uma ampla faixa de distância, existe a possibilidade de ter se posicionado em

uma região com intervalo relativamente maior do que foi previsto, em relação ao outro marcador (ADL0262).

Ao observar os dados de número de meioses informativas totais e de fase conhecida (Tabela 8), descarta-se a hipótese do baixo número de meioses informativas ter influenciado a distância entre os marcadores. O alongamento excessivo do mapa pode ser consequência do baixo número de alelos que podem ser rastreados até sua origem parental.

A inserção de um maior número de marcadores no cromossomo diminui os intervalos entre eles, além de cobrir uma maior região do cromossomo. Os marcadores ADL0165 e MCW0289, por exemplo, poderia gerar um mapa de ligação mais consistente e completo.

Cromossomo 24

O tamanho do mapa de ligação parcial do cromossomo 24 foi de 115,1 cM e foram utilizados três marcadores que apresentaram a mesma ordem do mapa consenso atualizado (SCHMID et al., 2005). O marcador ROS0302, mesmo não tendo posição fixa segundo o mapa consenso, foi ligado na região esperada do mapa parcial da população em estudo.

Figura 17 - Mapa de Ligação do cromossomo 24 da população desenvolvida pela Embrapa e o mapa consenso atualizado (Schmid et al., 2005)

Os marcadores ROS0302 e MCW0301 apresentaram porcentagens de meioses informativas de fase conhecida correspondente a 53,62% e 56,49% em relação às meioses totais (Tabela 8).

O marcador LEI0069 não apresentou nenhuma meiose informativa de fase conhecida, contribuindo muito pouco para a construção do mapa de ligação. O aumento na distância pode ter sido causado pelo baixo grau de informação (LEI0069), que levou a inserção do marcador a uma distância maior em relação ao mapa consenso, que possui um intervalo 10 vezes menor (MCW0301 – LEI0069).

Cromossomo 26

Foram utilizados dois marcadores para construção do grupo de ligação: LEI0074 (0,0 cM), e ROS0314 que se ligou a 72,6 cM, posição esta que não tem definição no mapa consenso atualizado, podendo cobrir uma amplitude de 17 à 30 cM aproximadamente. Na Figura 18 está representado o grupo de ligação e o mapa consenso do cromossomo 26:

Figura 18 - Mapa consenso atualizado (Schmid et al., 2005) e grupo de ligação do cromossomo 26

Ambos os marcadores do cromossomo 26 (Tabela 8) possuem número elevado de meioses informativas totais e de fase conhecida (77,66% e 84,32% respectivamente), sendo o LEI0074 um marcador com potencial de gerar bons resultados de mapeamento de QTL. Esse distanciamento excessivo pode ser causado pelo pouco adensamento de marcadores no cromossomo. Uma sugestão para adensar mais o cromossomo seria a inserção dos marcadores MCW0286 (33 cM) e ABR0006 (56 cM) para fazer uma varredura mais fina do cromossomo.

Cromossomo 27

No mapa parcial do cromossomo 27 foram utilizados três marcadores com posição fixa, que obedeceram à mesma ordem em relação ao mapa consenso atualizado (SCHMID et al., 2005). A distância entre os marcadores ADL0376 e MCW0328, quando comparada ao mapa consenso, foi bastante parecida (aproximadamente 11,30 cM de diferença). O marcador MCW0300 ligou-se em uma região mais distante, 100 cM em relação ao MCW0328 (Figura 20).

Figura 19 - Mapa parcial do cromossomo 27 da população Embrapa e o mapa consenso atualizado (Schmid et al., 2005) do respectivo cromossomo

Somente o marcador MCW0300 apresentou um número baixo de meioses informativas de fase conhecida (Tabela 8), indicando ser a possível causa da distante ligação em relação aos outros marcadores no mapa parcial.

Cromossomo 28

O mapa parcial referente ao cromossomo em estudo ficou com 72,4 cM e o espaçamento médio entre marcadores 24,1 cM (Figura 21).

Figura 20 - Mapa parcial do cromossomo 28 da população em estudo e o mapa consenso (SCHMID et al., 2005) do respectivo cromossomo

Os marcadores foram ordenados nas mesmas posições do mapa consenso. O marcador ADL0284 foi o que apresentou maior semelhança na posição quando comparado com o mapa consenso. Do número de meioses informativas totais, todas foram de fase conhecida, o que explica o alto grau de semelhança de posição com o mapa consenso.

Já os marcadores ABR0341 e MCW0204E, apesar de um número de meioses totais satisfatórios, os de fase conhecida não apresentaram bom resultado; respondendo por apenas 33,42% e 48,88%, respectivamente (Tabela 8).

4.5 Análise de mapeamento de QTLs

Na Tabela 10 abaixo, estão os valores de F das análises, valores de F críticos para ligação sugestiva e significância a 5% no cromossomo e no genoma, considerando a contribuição relativa de cada cromossomo. Foi mapeado no cromossomo 26 um QTL que atingiu o limiar de significância a 5% no cromossomo para gp35-41, e outro que excedeu o nível de significância sugestivo no genoma para pv35 no cromossomo 27, conforme ilustrado nas Figuras 22 e 23. Foram consideradas e analisadas as interações dos efeitos do QTL com família e sexo, que não apresentaram resultado significativo. Nenhum outro QTL foi detectado nos restantes dos cromossomos estudados.

Tabela 10 - Valores de F obtidos nas análises, juntamente com os valores críticos de F para ligação sugestiva no genoma, significância 5% no cromossomo e significância 5% no genoma

(continua)

Característica ¹	Valores de F modelo aditivo “a” e aditivo e dominância “a+d”: (a a+d)				
	Análise	Sugestivo	5% cromo	5% genoma	
Cromossomo 19					
pnas	0,88 2,67	7,66 5,15	4,98 3,84	12,19 7,82	
pv35	1,33 1,62	7,73 5,22	5,07 3,84	12,47 8,23	
pv41	1,26 2,0	7,55 5,18	4,91 3,78	13,57 8,03	
gp35-41	0,53 0,82	7,61 5,16	5,09 3,72	14,21 8,58	
cr35-41	1,40 1,51	7,80 5,43	5,18 3,87	13,53 8,81	
ef35-41	1,55 0,77	7,69 5,25	5,09 3,85	13,16 9,12	
Cromossomo 23					
pnas	0,11 2,63	7,05 5,35	5,32 4,10	13,01 8,38	
pv35	0,96 1,15	7,29 5,05	5,47 5,47	13,47 8,09	
pv41	2,05 1,59	7,00 5,14	5,37 4,05	13,08 8,47	
gp35-41	2,41 1,22	7,25 5,21	5,40 4,10	12,92 8,10	
cr35-41	2,71 1,44	7,21 5,04	5,48 4,02	12,97 7,92	
ef35-41	0,53 0,25	7,35 4,96	5,47 3,98	12,68 8,19	
Cromossomo 24					
pnas	2,58 2,24	6,74 4,86	5,88 4,31	11,93 8,07	
pv35	2,97 1,49	6,61 4,94	5,87 4,38	11,52 8,39	
pv41	2,19 1,29	6,82 4,93	5,88 4,38	12,81 7,63	
gp35-41	0,22 2,29	6,66 4,78	5,85 4,40	11,64 7,79	
cr35-41	3,64 2,64	6,59 4,89	5,74 4,42	12,14 8,17	
ef35-41	2,54 2,69	6,60 4,89	5,75 4,42	11,75 8,45	

Tabela 10- Valores de F obtidos nas análises, juntamente com os valores críticos de F para ligação sugestiva no genoma, significância 5% no cromossomo e significância 5% no genoma

(conclusão)

Característica ¹	Valores de F modelo aditivo “a” e aditivo e dominância “a+d”: (a a+d)			
	Análise	Sugestivo	5% cromo	5% genoma
Cromossomo 26				
pnas	3,02 2,27	7,15 4,88	5,61 3,93	13,66 7,57
pv35	0,78 0,49	7,04 4,86	5,38 4,00	12,35 7,73
pv41	0,84 1,06	6,77 4,93	5,32 3,99	12,98 7,64
[†] gp35-41	0,23 [†] 4,76	7,01 4,88	5,45 [†] 3,98	14,49 7,94
cr35-41	0,38 1,05	6,92 4,77	5,44 3,95	13,06 8,04
ef35-41	0,87 3,76	6,93 4,84	5,32 3,98	12,18 7,84
Cromossomo 27				
pnas	3,00 1,96	6,88 4,82	5,88 4,32	11,81 8,56
[*] pv35	[*] 8,81 4,48	[*] 6,90 4,93	5,84 4,39	12,33 8,05
pv41	6,57 3,41	6,77 4,79	5,88 4,29	12,55 8,61
gp35-41	0,61 2,28	6,89 4,81	5,89 4,29	14,19 8,15
cr35-41	1,33 1,50	6,89 4,90	5,91 4,41	12,29 8,06
ef35-41	2,28 3,84	6,85 4,91	5,90 4,36	12,26 8,39
Cromossomo 28				
pnas	2,67 1,85	8,26 5,36	5,88 3,97	13,46 8,14
pv35	0,09 1,16	8,65 5,14	5,98 3,88	14,18 8,56
pv41	0,30 0,49	8,63 5,30	5,80 3,86	15,00 8,48
gp35-41	0,57 1,50	8,30 5,32	5,83 3,85	13,86 8,21
cr35-41	1,14 1,79	8,51 5,13	5,86 3,77	14,05 8,15
ef35-41	0,25 0,61	8,29 5,38	5,73 3,85	14,60 7,91

[†] pnas – peso ao nascer; pv35 – peso vivo aos 35 dias de idade; pv41 – peso vivo aos 41 dias de idade; gp35-41 – ganho de peso dos 35 aos 41 dias de idade; cr35-41 consumo de ração dos 35 aos 41 dias de idade; ef35-41 – eficiência alimentar dos 35 aos 41 dias de idade.

^{*} Ligação sugestiva no genoma, [†] significância 5% no cromossomo

O QTL identificado no cromossomo 26 com o modelo a+d, está localizado muito próximo do marcador LEI0074, a 0,0 cM, e seu intervalo de confiança foi de 0,0 – 72 cM. No cromossomo 27, foi mapeado QTL sugestivo para pv35, nos intervalos entre os marcadores MCW0328 e ADL0376 a 103 cM.

Foi feito o confronto entre os modelos de “a” e “a+d” para identificar qual deles seria adotado para prosseguir com as análises. Após os cálculos o modelo “a” foi considerado mais significativo, sendo utilizado para realizar os testes das interações do QTL com sexo e família, que não foram significativas ($P = 4,639$ e $P = 0,136$, respectivamente). O intervalo de confiança do QTL foi de 0,0 – 111,0 cM.

A Tabela 11 apresenta os dados contendo a posição do QTL, marcadores flanqueadores, valores de intervalo de confiança juntamente com os valores de F e os modelos significativos encontrados neste estudo.

Tabela 11 - Marcadores flanqueadores dos QTLs, suas respectivas posições nos cromossomos, juntamente com o intervalo de confiança, valor de F e o modelo mais significativo utilizado para as características

*GGA	Característica	Posição em cM ¹	Marcadores flanqueadores	IC (cM) ²	F ³	Modelo ⁴
26	gp35-41 [▲]	0	LEI0074-ROS0314	0.0 - 72.0	4.76 [▲]	a
27	pv35 ⁺	103	MCW0328-ADL0376	0.0 - 111.0	8.81 ⁺	a+d

*Cromossomo

¹posição do QTL em relação ao primeiro marcador do mapa da EMBRAPA

²Intervalo de confiança a 95% da posição do QTL em cM

³Razão de F: ⁺ QTL sugestivo, [▲]QTL significativo à 5% no cromossomo

⁴Modelo estatístico utilizado: a = aditividade, a+d = aditividade mais dominância

Figura 21 - Valores de F para característica ganho de peso dos 35 aos 41 dias de idade do cromossomo 26, obtidos na análise de mapeamento de QTL no modelo de F₂ do programa QTL Express (SEATON et al., 2002). As setas representam a localização dos marcadores utilizados

Figura 22 - Valores de F para característica peso vivo aos 35 dias de idade do cromossomo 27, obtidos na análise de mapeamento de QTL no modelo de F_2 do programa QTL Express (SEATON et al., 2002). As setas representam a localização dos marcadores utilizados

O QTL do cromossomo 26 para gp35-41 (Tabela 11) apresentou efeito de dominância negativo sugerindo que os indivíduos que receberam um alelo da linhagem TT e outra da linhagem CC, tiveram uma menor média para a característica do que a média dos homozigotos. O efeito aditivo não foi significativo. Já no cromossomo 27, o QTL para pv35 apresentou efeito aditivo positivo (Tabela 11), indicando que o alelo que confere maior peso vivo nesta idade é proveniente da linhagem de corte TT. A Tabela 11 representa a porcentagem da variância fenotípica (R^2) explicada pelos QTLs.

Tabela 12 - Efeitos aditivo e de dominância (erros-padrão), e proporção da variância fenotípica (R^2) explicada pelos QTLs

*GGA	Característica	Efeito Aditivo (EP)	Efeito de Dominância (EP)	R^2
26	▲gp35-41	0,36 (3,97)	-18,61 (6,11)	1,95
27	+ pv35	21,13 (7,12)	•NE	2,03

*Cromossomo, •Não estimado

+ QTL sugestivo, ▲QTL significativo a 5% no cromossomo

Estudos realizados com a mesma população, mapearam no cromossomo 1, QTLs para peso vivo, ganho de peso e consumo de ração (NONES et al., 2006). No cromossomo 2 foram encontrados QTLs significativos para peso vivo aos 35, 41 e 42 dias de idade e no cromossomo 4 foi encontrado QTL significativo para peso ao nascer, peso aos 35 dias (BARON, 2004).

QTLs significativos para características de desempenho também foram mapeados no cromossomo 3 para peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias, juntamente com QTL sugestivo para consumo de ração dos 35 ao 41 dias de idade mapeados no cromossomo 5 (RUY, 2004). Mais trabalhos sobre a mesma população, utilizando outros cromossomos são muito importantes para um estudo completo do genoma de uma população nacional.

Vários trabalhos de mapeamento de QTLs envolvendo características de desempenho identificaram principalmente no cromossomo 27 regiões responsáveis pelo desenvolvimento das características citadas acima, além de outras como gordura e produção ovos.

Em um trabalho sobre QTLs que afetam o crescimento e o consumo alimentar, Van Kaam e colaboradores (1999), cruzaram matrizes machos e fêmeas de linhagens de corte diferentes, e produziram 10 famílias de irmãos completos em quatro gerações. Foram testados 420 marcadores em 27 grupos de ligação que cobriram intervalos de 3,63 cM. Após ajustes dos dados fenotípicos, seis características de carcaça foram analisadas. Foi mapeado no cromossomo 26 QTL com ligação sugestiva para consumo alimentar em um intervalo fixo de idade, juntamente com QTLs que não atingiram o valor estatístico para ligação sugestiva no genoma para peso vivo aos 23 e 48 dias de idade. No presente estudo também foi mapeado QTL sugestivo no mesmo cromossomo para ganho de peso dos 35 aos 41 dias em um intervalo de confiança de 0,0 a 72 cM. Os autores não apresentaram informações sobre porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL, intervalo de confiança, valor de F e marcadores franqueadores.

Sewalen et al., (2002) mapearam importantes QTLs para peso vivo a 3, 6 e 9 semanas de idade. A partir do cruzamento da raça de postura *White Leghorn* com uma linhagem de corte comercial, foi gerado um total de 546 animais F₂, divididos em 32

famílias de irmãos completos e 134 marcadores otimizados. Foi detectado no cromossomo 27 um QTL com ligação sugestiva no genoma para peso vivo a 6 semanas de idade, associado ao único marcador utilizado no cromossomo, ROS0071. Não houve estimativa do intervalo de confiança. Também foi identificado no mesmo cromossomo, QTL para peso vivo a 9 semanas de idade com ligação significativa a 5% no genoma, com intervalo de confiança também não estimado. O marcador ROS0071, utilizado no trabalho acima, não está fixado no mapa consenso, podendo se posicionar entre 38 e 56 cM. Os marcadores utilizados no presente estudo estão nas posições fixas de 11 cM (MCW0300), e 59 cM (ADL0376), de acordo com o mapa consenso 2005 (SCHMID et al., 2005).

O QTL para peso vivo encontrado nos dois trabalhos confirma que pode existir nesta região, um loco responsável por efeito aditivo na característica. A porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL correspondeu a 4,0% para o QTL mapeado por Sewalen et al. (2002) e 2,03% para o do presente estudo. Esta variação no resultado depende de vários fatores, como a diferença entre as populações, número de indivíduos utilizados e número de marcadores, por exemplo.

A partir do cruzamento entre um macho *Red Junglefowl*, ancestral selvagem da galinha doméstica, com três fêmeas *White Leghorn*, foram criadas três gerações (totalizando 851 animais F_2) para mapeamento de QTLs que afetam crescimento e produção de ovos. Vinte e cinco grupos de ligação foram analisados utilizando 105 marcadores informativos (KERJE et al., 2003). Foram identificados QTLs significativos a 1% no genoma para peso corporal no 112º e 200º dias de idade, juntamente com um QTL para crescimento do 46º aos 112º dias de idade no cromossomo 27, com os marcadores MCW0300 e MCW0328, que também foram utilizados neste estudo.

No trabalho de Sasaki et al., (2004) sobre QTLs que afetam características de peso vivo e produção de ovos em um cruzamento de galinhas F_2 , foram testados 498 marcadores (destes, 96 foram funcionais e portanto mapeados em 25 grupos de ligação e 18 autossomos) juntamente com 265 animais F_2 . A população foi delineada cruzando a raça *White Leghorn*, selecionada por 14 gerações para características associadas a qualidade dos ovos, com a raça de corte *Rhode Island Red*. O resultado do

mapeamento foi um QTL no cromossomo 27 para peso vivo com nível de significância 5% no genoma. No cromossomo citado os autores selecionaram 2 marcadores, sendo um deles utilizado neste estudo (ADL0376) pois flanqueia o QTL mapeado para peso pv35. Como já descrito foram encontrados vários QTLs para característica de peso neste cromossomo, mas os intervalos de confiança são muito grandes, sendo necessário um trabalho mais profundo, selecionando um número maior de marcadores e animais para reduzir o intervalo de confiança e buscar possíveis genes candidatos por posição nas regiões de QTL.

Também no cromossomo 27 Jennen et al., (2005) mapearam um QTL para peso vivo às 5 semanas de idade com ligação sugestiva no genoma entre os marcadores MCW0076 e ADL0376, onde foram utilizados 1006 animais F_2 e 03 marcadores, seguindo o mesmo modelo de delineamento populacional proposto por van Kaam e colaboradores, 1999.

Uma população selecionada por mais de 40 gerações, iniciada a partir de 1957, cruzando sete linhagens da raça White Plymouth Rock, foi utilizada para estudar peso vivo e seus efeitos correlacionados (JACOBSSON et al., 2005). A partir deste experimento, duas linhas foram criadas (de alto e baixo peso) onde apresentaram evidências de que estas características são altamente herdáveis.

Respostas correlacionadas também foram observadas, como a hiperfagia da linha de alto peso, e a falta de apetite que leva a anorexia da linha de baixo peso. Oitocentos animais F_2 e 145 marcadores microssatélites foram utilizados para cobrir 80% do genoma da galinha. Foi mapeado no cromossomo 28 um QTL com ligação sugestiva a 5% para peso corporal aos 14 dias de idade, na posição 0 cM com o marcador MCW0227 (JACOBSSON et al., 2005). Na população em estudo não foi mapeado nenhum QTL neste cromossomo.

Em um trabalho publicado por Hee-Bork Park et al., (2005) analisou composição corporal e características metabólicas utilizando a mesma população e marcadores do estudo citado acima. Foram mapeados no cromossomo 27, vários QTLs para crescimento.

Schreiweis e colaboradores (2005) utilizaram 120 marcadores microssatélites, 508 animais F_2 (a partir do cruzamento da raça de postura *White*

Leghorn com a de galos de corte Cobb-Cobb) em 28 cromossomos autossomos. Foram detectados QTLs a 1% de significância no genoma para peso vivo aos 35 e 55 dias de idade no cromossomo 27, em um trabalho de identificação de QTLs associados a características de ossos e peso vivo em galinhas.

Os QTLs encontrados no cromossomo 27 citados nos trabalhos acima, inclusive o QTL encontrado no presente estudo, tiveram o marcador ADL0376 como um dos flaqueadores, (SCHREIWEIS et al., 2005 e JENNEN et al., 2005). Foram utilizados números iguais de marcadores nos estudos, incluindo este trabalho (3 no total distribuídos no cromossomo 27), porém o número de indivíduos F_2 utilizados no trabalho de Jennen et al (2005) foi muito superior em relação ao presente estudo e ao trabalho de Schreisweis et al (2005). Os QTLs encontrados nos 3 estudos sugerem que o cromossomo 27 seja mais estudado, utilizando técnicas de mapeamento fino por exemplo, com o intuito de identificar diretamente o(os) gene(s) responsável(is) pela característica.

5 CONCLUSÕES

1. A população experimental desenvolvida pela Embrapa suínos e aves e a metodologia utilizada permitiram a construção de mapas de ligação e a identificação de QTLs.
2. Os marcadores selecionados apresentaram no geral alta heterozigosidade, e apenas 04 dos 15 marcadores tiveram número de meioses informativas de fase conhecida representando menos de 50% em relação a total.
3. Os mapas de ligação construídos para os cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 a partir da população TC foram adequados para as análises de mapeamento, pois possibilitou a detecção de QTLs sugestivos.
4. Foram mapeados QTLs sugestivos no cromossomo para a característica ganho de peso dos 35 aos 41 dias de idade no cromossomo 26 no intervalo de confiança 0.0 a 72.0 cM, e sugestivo no genoma para o cromossomo 27 para a característica peso vivo aos 35 dias no intervalo entre 0.0 a 111.0 cM.

REFERÊNCIAS

- ABASHT, B.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Review of quantitative trait loci Identified in the Chicken. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, p. 2079-2096, 2005.
- ARÚS, P.; MORENO-GONZÁLEZ, J. **Plant breeding: principles and prospects.**, M.D. Rosemark, N.O Romagosa, London, ed. HAYWARD 1993. 250p.
- BARON, E.E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. 2004. p. 120. Tese de (Doutorado em Ciência animal e pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BUMSTEAD, N.; PALYGA, J. A preliminary linkage map of the chicken genome. **Genomics**, Orlando, v. 13, p. 690-697, 1992.
- BURT, D.W. Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 58, n. 1, p. 5-13, 2002.
- CAMPOS, R.L.R.; AMBO, M.; NONES, K.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L. Otimização e comparação de protocolos para extração de DNA de sangue de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA 49., 2003, Águas de Lindóia. **Resumos...** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 1CD-ROM.
- CHATTERJEE, R.N.; MISRA, B.S.; SINGH, H.N. Time trends in estimates of genetic parameters in White Leghorn population subjected to long-term selection. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 70, p. 184-187, 2000.
- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W.; Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Bethesda, v. 138, p. 963-971, 1994.
- CRITTENDEN, L.B.; PROVENCHER, L.I.; ABPLANALP, H.; BRILES, R.W.; BRILES, W.E.; DODGSON, J.B. Characterization of a red junglefowl by white leghorn backcross reference population for molecular mapping of the chicken genome. **Poultry Science**, Ithaca, v. 72, p. 334-348, 1993.
- CROOIJMANS, R.P.M.A.; GROEN, A.B.F.; VAN KAMPEN, A.J.A.; VAN DER BEEK, S.; VANDER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. **Poultry Science**, Ithaca, v. 75, p. 904-909, 1996.

CROOIJMANS, R.P.M.A.; DIJKHOF, R.J.M.; VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. New microsatellites in chicken optimised for automated fluorescent genotyping. **Animal Genetics**, Oxford, v. 28, p. 427-437, 1997.

DEEB, N.; LAMONT, S.J.; Genetic Architecture of growth and body composition in unique chicken populations. **The American Genetic Association**, Maryland, v. 93, p. 107-118, 2002.

DE KONING, D.J.; WINDSOR, D.; HOCKING, P.M.; BURT, D.W.; LAW, A.; HALEY, C.S.; MORRIS, A.; VINCENT, J.; GRIFFIN, H. Quantitative trait locus detection in commercial broiler lines using candidate regions. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, p. 1158-1165, 2003.

DE KONING, D.J.; JANSS, L.L.G.; RATTINK, A.P.; VAN OERS, P.A.M.; VRIES, B.J. de; GROENEN, M.A.M.; VAN DER POEL, J.J.; GROOT, P.N. de; BRASCAMP, E.W.; VAN ARENDONK, J.A.M. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). **Genetics**, Bethesda, v. 152 p. 1679-1690, 1999.

DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F.; The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Review Genetics**, New York, v. 3, p. 22-32, 2002.

DEKKERS, J.C.M. Commercial application of marker and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 82, p. 313-328, 2004.

FALCONER, D.S; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow: Longman Group, 1996, 464p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores em análise genética**. 3. ed. Brasília: CENARGEN. 1998. 220 p.

FILLON, V. The chicken as a model to study microchromosomes in birds: a review. **Genetic Selection Evolution**, France, v. 30, p. 209-219, 1998.

FUMIHITO, A.; MYIAKE, T.; SUMI, S. TAKADA, M.; OHNO, S.; KONDO, N. One subspecies of red junglefowl (*Gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. **Proceeding of the Nacional Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 91, p. 12505-12509, 1994.

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

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER J. H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GERBALT, W.M. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 794p.

GROENEN, M.A.M.; CROOIJMANS, 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**, Orlando, v. 49, p. 265-274, 1998.

GROENEN, M. A. M.; CHENG, H. H.; BUMSTEAD, N.; BENKEL, B. F.; BRILES, W. E.; BURKE, T.; BURT, D. W.; CRITTENDEN, L. B.; DODGSON, J.; HILLEL, J.; LAMONT, S.; PONCE DE LEON, F. A.; SOLLER, M.; TAKAHASHI, H.; VIGNAL, A. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research**, Woodbury, v. 10, p. 137-147, 2000.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity**, London, v. 69, p. 315-324, 1992.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; ELSEEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares, **Genetics**, Bethesda, v. 136, p. 1195-1207, 1994.

HILLEL, J. Map-based quantitative trait locus identification. **Poultry Science**, Ithaca, v. 96, p. 1115-1120, 1997.

HILLIER, L.W.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R. C.; PONTING C.P.; BORK, P.; BURT, D. W.; GROENEN, M. A.; DELANY, M. E.; DODGSON, J. B.; CHINWALLA, A. T.; CLIFTEN, P. F.; CLIFTON, S. W.; DELEHAUNTY, K. D.; FRONICK, C.; FULTON, R. S.; GRAVES, T. A.; KREMITZKI, C.; LAYMAN, D.; MAGRINI, V.; MCPHERSON, J. D.; MINER, T. L.; MINX, P.; NASH, W. E.; NHAN, M. N.; NELSON, J. O.; ODDY, L.G.; POHL, C. S.; RANDALL-MAHER, J.; SMITH, S. M.; WALLIS, J. W.; YANG, S. P.; ROMANOV, M. N.; RONDELLI, C. M.; PATON, B.; SMITH, J.; MORRICE, D.; DANIELS, L.; TEMPEST, H. G.; ROBERTSON, L.; MASABANDA, J. S.; GRIFFIN, D. K.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; JACOBBSOON, L.; KERJE, S.; ANDERSSON, L.; CROOIJMANS, R. P.; AERTS, J.; VAN DER POEL, J. J.; ELLEGREN, H.; CALDWELL, R. B.; HUBBARD, S. J.; GRAFHAM, D. V.; KIERZEK, A. M.; MCLAREN, S. R.; OVERTON, I. M.; ARAKAWA, H.; BEATTIE, K. J.; BEZZUBOV, Y.; BOARDMAN, P. E.; BONFIELD, J. K.; CRONING, M. D.; DAVIES, R. M.; FRANCIS, M. D.; HUMPHRAY, S. J.; SCOTT, C. E.; TAYLOR, R. G.; TICKLE, C.; BROWN, W. R.; ROGERS, J.; BUERSTEDDE, J. M.; WILSON, S. A.; STUBBS, L.; OVCHARENKO, I.; GORDON, L.; LUCAS, S.; MILLER, M. M.; INOKO, H.; SHIINA, T.; KAUFMAN, J.; SALOMONSEN, J.; SKJOEDT, K.; WONG, G. K.; WANG, J.; LIU, B.; WANG, J.; YU, J.; YAN, G. H.; NEFEDOV, M.; KORIABINE, M.; DEJONG, P. J.; GOODSTADT, L.; WEBBER, C.; DICKENS, N. J.; LETUNIC, I.; SUYAMA, M.; TORRENTS, D.; VON MERING, C.; ZDOBNOV, E. M.; MAKOVA, K.; NEKRUTENKO, A.; ELNITSKI, L.; ESWARA, P.; KING, D. C.; YANG, S.; TYEKUCHEVA, S.; RADAKRISHNAN, A.; HARRIS RS, CHIAROMONTE F, TAYLOR J, HE J, RIJNKELS M, GRIFFITHS-JONES S, URETA-VIDAL, A.; HOFFMAN, M. M.; SEVERIN, J.; SEARLE, S. M.; LAW, A. S.; SPEED, D.; WADDINGTON, D.; CHENG, Z.; TUZUN, E.; EICHLER, E.; BAO, Z.; FLICEK, P.; SHTEYNBER, G. D.D.; BRENT, M. R.; BYE, J. M.; HUCKLE, E. J.; CHATTERJI, S.; DEWEY, C.; PACHTER, L.; KOURANOV, A.; MOURELATOS, Z.; HATZIGEORGIOU, A. G.; PATERSON, A. H.; IVARIE, R.; BRANDSTROM, M.; AXELSSON, E.; BACKSTROM, N.; BERLIN, S.; WEBSTER, M. T.; POURQUIE, O.; REYMOND, A.; UCLA, C.; ANTONARAKIS, S. E.; LONG, M.; EMERSON, J. J.; BETRAN, E.; DUPANLOUP, I.; KAESMANN, H.; HINRICHS, A. S.; BEJERANO, G.; FUREY, T. S.; HARTE, R. A.; RANEY, B.; SIEPEL, A.; KENT, W. J.; HAUSSLER, D.; EYRAS, E.; CASTELO, R.; ABRIL, J. F.; CASTELLANO, S.; CAMARA, F.; PARRA, G.; GUIGO, R.; BOURQUE, G.; TESLER, G.; PEVZNER, P.A.; SMIT, A.; FULTON, L. A.; MARDIS, E. R.; WILSON RK; INTERNATIONAL CHICKEN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, London, v. 432, n. 7018, p. 695-716, 2004.

HOCKING, P. M. Review of QTL mapping results in chickens. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 61 p.11, 2005.

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**, Ithaca, v. 33, p. 428-435, 2002.

IKEOBI, C.O.N.; WOOLLIAMS, J.A.; MORRICE, D.R.; LAW, A.; WINDSOR, D.; BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Quantitative Trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Sciences**, Amsterdam, v. 87, p. 143–151, 2003.

JACOBSSON, L.; PARK, H.B.; WAHLBERG, P.; FREDRIKSSON, R.; PEREZ-ENCISO, M.; SIEGEL, P.B.; ANDERSSON, L. Many QTLs minor additive effects are associated with a large difference in growth between two selection lines in chickens. **Genetic Research**, Cambridge, v. 86, p. 115-125, 2005.

JENNEN, D.G.; VEREIJKEN, A.L.J.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VEENENDAAL, A.; van der POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. Detection and localization of quantitative trait loci affecting fatness in broilers. **Poultry Science**, Ithaca, v. 83, p. 295-301, 2004.

JENNEN, D.G.; VEREIJKEN, A.L.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A. Confirmation of quantitative trait loci affecting fatness in chickens, **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 37 p. 215-228, 2005.

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

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

KOERHUIS, A.N.M.; McKAY J.C. Restricted maximum likelihood estimation of genetic parameters for egg production traits in relation to juvenile body weight in broiler chickens. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 46, p. 117-127, 1996.

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

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

LEDUR, M. C.; BERTANI, G. R.; NONES, K. Genômica nos programas de melhoramento genético avícola. In: Conferência Apinco 2003 de Ciência e Tecnologia, 2003, Piracicaba. **Anais...** Campinas: Associação Brasileira dos Produtores de Pintos de Corte 2003. p. 87-105.

LIU, B.H. **Statistical Genomics**: linkage, mapping and QTL analysis. Boca Raton CRC Press, 1998. 611 p.

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

MANDOUR M.A.; NESTOR, K.E.; SACO, R.E.; POLLEY, C.R.; HAVENSTEIN, G.B. Selection for increasing humerus strength of cage reared broilers. **Poultry Science**, Ithaca, v. 68, p. 1169-1173, 1989.

McPHERSON, J.D.; DODGSON, J.; KRUMLAUF, R.; POURQUIÉ, O. **Proposal to sequence the genome of the chicken**, 2002. Disponível em: http://www.genome.gov/Pages/Research/Sequencing/SeqProposals/Chicken_Genome.pdf.

NONES, K. **Mapeamento de QTLs no cromossomo 1 e *Gallus gallus* que influenciam características de desempenho e carcaça**. 2004. p. 120. Tese de (Doutorado em Ciência animal e pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

NONES, K.; LEDUR, M. C.; RUY, D. C.; BARON, E. E.; MELO, C. M. R.; MOURA, A. S. A. M. T.; ZANELLA, E. L.; BURT, D. W.; COUTINHO, L. L. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Ithaca, v. 37, p. 95–100, 2006.

PARK, H-B.; JACOBSSON, L.; WAHLBERG, P.; SIEGEL, P.B.; ANDERSSON, L. QTL analysis of body composition and metabolic traits in an intercross between chicken lines divergently selected for growth. **Physiology and Genomics**, Bethesda, v. 25, p. 216-223, 2006.

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

POGGENPOEL, D.G.; FERREIRA, G.F.; HAYES, J.P.; DU PREEZ, J.J. Response to long-term selection for egg production in laying hens. **British Poultry Science**, London, v. 37, p. 743-756, 1996.

RUY, D.C. **Mapeamento de QTL para desempenho e características de carcaça, nos cromossomos 3 e 5 de *Gallus gallus***. 2004. p. 133. Tese de (Doutorado em Ciência animal e pastagens) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

SCHMID, M.; NANDA, I.; HOEHN, H.; SCHARTL, M.; HAAF, T.; BUERSTEDDE, J.-M.; ARAKAWA, H.; CALDWELL, R.B.; WEIGEND, S.; BURT, D.W.; SMITH, J.; GRIFFIN, D.K.; MASABANDA, J.S.; GROENEN, M.A.M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VIGNAL, A.; FILLON V.; MORISSON, M.; PITEL, F.; VIGNOLES, M.; GARRIGUES, A.; GELLIN, J.; RODIONOV, A.V.; GALKINA, S.A.; LUKINA, N.A.; BEN-ARI, G.; BLUM, S.; HILLEL, J.; TWITO, T.; LAVI, U.; DAVID, L.; FELDMAN, M.W.; DELANY, M.E.; CONLEY, C.A.; FOWLER, V.M.; HEDGES, S.B.; GODBOUT, R.; KATYAL, S.; SMITH, C.; HUDSON, Q.; SINCLAIR, A.; MIZUNO, S. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 415-479, 2005.

SCHREIWEIS, M.A.; HESTER, P.Y.; MOODY, D.E. Identification of quantitative trait loci associated with bone traits and body weight in an F2 resource population of chickens. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 37, p. 677-698, 2005.

SEATON, G.; HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; KEARSEY, M.; VISSCHER, P.M. QTL Express: Mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 339-340, 2002.

SEWALEN, A.; MORRICE, D. M.; LAW, A.; WINDSOR, D.; HALEY, C.S.; IKEOBI, C.O.; BURT, D. W.; HOCKING, P.M. Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six and nine weeks of age in a broiler layer cross. **Poultry Science**, Ithaca, v. 81, p. 1775-1781, 2002.

SILVA, M.V.G.B.; MARTINEZ, M.L.; TORRES, R.A.; LOPES, P.S.; EUCLYDES, R.F.; PEREIRA, C.S.; MACHADO, M.A.; ARBEX, W. Random model approach for estimation of QTL location in half-sibs families. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Minas Gerais, v.34, n.1, p.66-75, 2005.

SIWEK, M.; CORNELISSEN, S. J.; BUITENHUIS, A. J.; NIEUWLAND, M. G.; BOVENHUIS, H.; CROOIJMANS, R. P.; GROENEN, M. A.; PARMENTIER, H. K.; VAN DER POEL J. J. Quantitative trait loci for body weight in layers differ from quantitative trait loci specific for antibody responses to sheep red blood cells. **Poultry Science**, Ithaca, v. 83, p. 853-859, 2004.

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

SMITH, J.; BRULEY, C.K.; PATON, I.R.; DUNN, I.; JONES, C.T.; WINDSOR, D.; MORRICE, D.R.; LAW, A.S.; MASABANDA, J.; SAZANOV, D.; WADDINGTON, D.; FRIES, R.; BURT, D.W. Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. **Animal Genetics**, Oxford, v. 31, p. 96-103, 2000.

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

TUISKULA-HAAVISTO, M.; HONKATUKIA, M.; KONING, D.J.; SCHULMAN, N.F.; MÄKI-TANILA, A. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in eggs layer. **Poultry Science**, Ithaca, v. 81, p. 919-927, 2002.

VAN DER BEEK; VAN ARENDONK, J.A.M.; GROEN, A.F. Power of two and three-generation QTL, mapping experiments in an outbred population containing full-sib or half-sib families. **Theoretical and Applied Genetics**, Ottawa, v. 91, p. 1115-1124, 1995.

VAN KAAM, J.B.C.H.M.; GROENEN, M.A.M.; BOVENHUIS, H.; VEENENDAAL, A.; VEREIJKEN, A.L.J.; VAN ARENDONK, J.A.M. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting growth and feed efficiency. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, p. 15-23, 1999a.

VAN KAAM, J.B.C.H.M.; GROENEN, M.A.M.; BOVENHUIS, H.; VEENENDAAL, A.; VEREIJKEN, A.L.J.; VAN ARENDONK, J.A.M. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting carcass traits. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, p. 1091-1099, 1999b.

VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALEY, C.S. Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. **Genetics**, Bethesda, v. 143, p. 1013-1020, 1996.

VOORRIPS, R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **The Journal of Heredity**, Oxford, v. 93, n. 1, p. 77-78. 2002.

YAMADA, Y. The contribution of poltry science to society. **World's Poultry Science**, Ithaca, v. 44, p. 172-178, 1998.

Zanella, E.L.; Ledur, M.C.; Schmidt, G.S.; Jaenisch, F.R.F.; Coutinho, L.L. Development of a new reference population for QTL detection in poultry. **Poultry Science**, Montreal, v. 79, p. 61, 2000.

ZHU, J.J.; LILLHOJ, H.S.; CHENG, H.H.; POLLOCK, D.; SADJADI, M.; EMARA, M.G. Screening for highly heterozygous chicken in outbred commercial broiler lines to increase detection power for mapping quantitative trait loci. **Poultry Science**, Ithaca, v. 80, p. 6-12, 2001.

ZHU, J.J.; LILLEHOJ, H.S.; ALLEN, P.C.; VAN TASSEL, C.P.; SONSTEGARD, T.S.; CHENG, H.H.; POLLOCK, D.; SADJAD, M.; MIN, W.; EMARA, M.G. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to coccidiosis and growth. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 9-16, 2003.

WELLER, J.I. **Quantitative trait loci analysis in animals**. Cambridge: CABI Publishing, 2001.

WICKER, T.; ROBERTSON, J.S.; SCHULZE, S.R.; FELTUS, F.A.; MAGRINI, V.; MORRISON, J.A.; MARDIS, E.R.; WILSON, R.K.; PETERSON, D.G.; PATERSON, A.H.; IVARIE, R.; The repetitive landscape of the chicken genome, **Genome Research**, Basel, v. 15, p. 126-136, 2005.

ANEXOS

Anexo I - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA COM PROTEINASE K

AMOSTRAS:DATA:

- 1) Em **50µL** de **sangue** adicionar **1mL** de **tampão de lise**, inverter os tubos cuidadosamente várias vezes para homogeneizar a amostra
- 2) Centrifugar por **2 minutos** a **14.000 rpm** (temperatura ambiente) e **descartar o sobrenadante**
- 3) **Repetir os passos 1 e 2**, até que o sobrenadante fique limpo (aproximadamente 3x)
- 4) **Lavar** o pellet com **500 µL** de **água destilada**
- 5) Centrifugar por **2 minutos** a **14.000 rpm** (temperatura ambiente) e **descartar o sobrenadante**
- 6) **Ressuspender** o pellet em **500µL** de **tampão para proteinase K (CPMB)** adicionando **2 µL** de **Proteinase K** por amostra (**20 ng/mL**)
- 7) Incubar a **55 °C** por **1 hora**
- 8) Adicionar **120 µL** de **NaCl 5 M** e agitar no vortex por 15 segundos
- 9) Centrifugar por **5 minutos** a **14.000 rpm**
- 10) **Transferir o sobrenadante** para um tubo novo e **adicionar 1 mL** de **Etanol Absoluto** (gelado). **Homogeneizar** e centrifugar por **5 minutos** a **14.000 rpm**
- 11) Descartar o sobrenadante
- 12) **Lavar** o pellet com **1 mL Etanol 95%** e centrifugar por **5 minutos** a **14.000 rpm**
- 13) **Descartar o sobrenadante** e deixar o pellet **secar por 1 hora**
- 14) **Ressuspender** o pellet em **50, 100 ou 150 µL** de **água ultrapura** (dependendo do tamanho do pellet) e **agitar** no vortex por **15 segundos**
- 15) **Incubar** as amostras a **37 °C** de **4 a 6 horas**

Tampão de Lise

Reagentes	100 mL
Sucrose	10,95 g
Tris-HCl pH 7,5 (1 M)	1 mL
MgCl ₂ (1 M)	0,5 mL
Triton X	1 mL
H ₂ O ultrapura q.s.p	100 mL

Tampão para Digestão com Proteinase K (CPMB)

Reagentes	50 mL
NaCl (5 M)	1 mL
Tris-HCl pH8,0 (1 M)	0,5 mL
EDTA pH8,0 (0,5 M)	2,5 mL
SDS (20%)	1,25 mL
H ₂ O ultrapura q.s.p	50 mL

NaCl 5M	400 mL
NaCl	116,9 g
H ₂ O ultrapura q.s.p	400 mL

TE	100 mL
Tris-HCl pH8,0 (1 M)	1,0 mL
EDTA pH8,0 (0,5 M)	200 µL
H ₂ O ultrapura q.s.p	100 mL

EDTA	250 mL	100 mL
EDTA	46,53 g	18,612 g
H ₂ O ultrapura q.s.p	250 mL	100 mL

Tris-HCl	100 mL
Tris	30,285 g
H ₂ O ultrapura q.s.p	100 mL

SDS 20%	200 mL	50 mL
SDS	40 g	10 g
H ₂ O ultrapura q.s.p	200 mL	50 mL

MgCl₂	100 mL
MgCl ₂ 6H ₂ O	20,3 g
H ₂ O ultrapura q.s.p	100 mL

Anexo II - PROTOCOLO MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO DE DNA UTILIZANDO DNAzol

AMOSTRAS:DATA:

- 1) Pipetar **5 µL** de **sangue** em tubo de 1.5 mL
- 2) Adicionar **500 µL** de **DNAzol**, agitar bem até diluir bem o sangue
- 3) Adicionar **250 µL** de **Etanol Absoluto**, inverter os tubos várias vezes cuidadosamente até ficar bem misturado
- 4) **Pescar** o **DNA** formado com uma pipeta
- 5) **Descartar** o **líquido** e voltar o pellet de DNA no mesmo tubo
- 6) Colocar **500 µL** de **Etanol 95%** para lavar o DNA, agitar bastante para lavar bem
- 7) Centrifugar por **10 minutos** à **4000 rpm**
- 8) **Descartar** o **sobrenadante**, observar se o pellet está fixado no fundo do tubo para não correr risco de descartá-lo com o sobrenadante
- 9) Repetir a **lavagem** com **Etanol 95%** (passos 6, 7 e 8)
- 10) Depois de descartar o sobrenadante, deixar os tubos **secarem** por **10 minutos** em **temperatura ambiente**
- 11) **Resuspender** os pellets com **150 µL** de **água ultrapura**