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

**Mapeamento de QTL nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 da
galinha doméstica (*Gallus gallus*) que influenciam características de
desempenho**

Raquel de Lello Rocha Campos

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

**Piracicaba
2007**

Raquel de Lello Rocha Campos
Licenciado em Ciências – Habilitada em Biologia

Mapeamento de QTL nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 da galinha doméstica (*Gallus gallus*) que influenciam características de desempenho

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

Campos, Raquel de Lello Rocha

Mapeamento de QTL nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 da galinha doméstica (*Gallus gallus*) que influenciam características de desempenho / Raquel de Lello Rocha Campos. - - Piracicaba, 2007.
80 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”

Dedico

A minha família, em especial aos meus pais Gerson e Roseli, pela dedicação, amor, incentivo e contribuição essencial para minha formação.

A minha tia Edy de Lello Montenegro, pela contribuição e incentivo dos meus estudos.

Ofereço

Ao meu tio Mario Rubens Guimarães Montenegro (in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela orientação, ensinamentos, por disponibilizar seu laboratório e toda estrutura necessária para o desenvolvimento e conclusão deste estudo.

À Profa. Dra. Ana Silvia A. M. T. Moura pela grande ajuda, orientação, disponibilidade e ensinamentos.

À Dra. Mônica C. Ledur pelo apoio, incentivo e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP pela oportunidade de realizar o estudo.

À Embrapa Suínos e Aves por disponibilizar a população.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

À Marcel Ambo, pela colaboração no desenvolvimento do trabalho, pela força, compreensão, paciência, carinho e amizade.

Às colegas Deborah C. Ruy, Érica E. Baron e Kátia Nones, que contribuíram inicialmente com o meu aprendizado na área.

Aos colegas Millor F. do Rosário e Clarissa Boschiero, pela contribuição no desenvolvimento do trabalho, amizade e apoio.

Às amigas Helena Javiel e Deborah Nishimura, pela força e companheirismo durante estes anos.

Aos técnicos Jorge Luís Ferreira de Andrade e Nirlei Aparecida da Silva, pela ajuda, apoio no laboratório e amizade.

A todos os colegas de laboratório, pela ajuda, amizade, carinho, companheirismo e momentos de descontração.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 Avicultura e o melhoramento genético	12
2.2 Marcadores moleculares	14
2.3 Populações referência e mapa genético	17
2.4 Mapeamento de QTL	19
2.4.1 População experimental	19
2.4.2 Métodos estatísticos.....	21
2.4.3 Níveis de significância.....	23
2.4.4 Intervalo de confiança	25
2.5 QTL mapeados em galinha	25
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 População experimental	30
3.2 Colheita dos dados fenotípicos e de amostras de sangue	31
3.3 Extração de DNA.....	32
3.4 Escolha dos marcadores microssatélites	33
3.5 Amplificação dos marcadores microssatélites por PCR.....	34
3.6 Genotipagem.....	36
3.7 Construção dos mapas de ligação	36
3.8 Análise de mapeamento de QTL.....	37
3.8.1 Análise de mapeamento de QTL por intervalo	37
3.8.2 Análise de marcas simples.....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Extração de DNA.....	40
4.2 Seleção dos marcadores microssatélites e amplificação por PCR.....	41
4.3 Genotipagem.....	46

4.4 Construção dos mapas de ligação	49
4.5 Análise de Mapeamento de QTL.....	58
5 CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS	76

RESUMO

Mapeamento de QTL nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 da galinha doméstica (*Gallus gallus*) que influenciam características de desempenho

Uma população F_2 foi desenvolvida através do cruzamento entre uma linhagem de frangos de corte (TT) e uma de postura (CC). Sete machos TT foram acasalados com sete fêmeas CC para produzir uma população F_1 TC. Cada macho F_1 foi acasalado com três fêmeas F_1 não-aparentadas para produzir aproximadamente 100 descendentes por família de irmãos completos. Neste estudo foram utilizadas as 5 famílias que apresentaram maior número de marcadores informativos nos cromossomos 1 a 5, em estudos realizados anteriormente nesta população. Foram coletados dados fenotípicos de peso ao nascer (PN), peso aos 35 (PV35) e 41 (PV41) dias de idade, ganho de peso (GP35-41), consumo de ração (CR35-41) e eficiência alimentar (EF35-41) dos 35 aos 41 dias de idade. Os indivíduos parentais e F_1 foram genotipados com 35 marcadores microssatélites posicionados nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18. Os marcadores informativos (22) foram genotipados nos indivíduos F_2 das famílias escolhidas. O cromossomo 16 não foi mapeado, pois o único marcador disponível não foi informativo. No cromossomo 17 apenas um marcador foi informativo, logo foi utilizada uma análise de marca simples para associação do marcador com as características selecionadas. O mapa de ligação de cada cromossomo foi construído e comparado ao mapa consenso. Os mapas de ligação apresentaram o mesmo ordenamento dos marcadores em relação aos mapas consenso, no entanto foram encontradas pequenas discrepâncias nas distâncias entre os marcadores. A análise empregada no estudo de mapeamento de QTL por intervalo utilizou o método de regressão linear e estimação de quadrados-mínimos, utilizando o programa *QTL Express*, na opção análise de F_2 . No cromossomo 17, duas características foram associadas ao genótipo do marcador: GP35-41 ($P < 0,05$) e EF35-41 ($P < 0,01$). Foram encontrados 4 QTL sugestivos no cromossomo 10: para PV35, PV41, GP35-41 e EF35-41. Houve interação do QTL com família para EF35-41. Os QTLs para PV35, PV41 e GP35-41 apresentaram efeito aditivo, apenas EF35-41 apresentou efeito de dominância.

Palavras chave: *Gallus gallus*; QTL; Marcadores microssatélites

ABSTRACT

Mapping QTL affecting growth traits in chicken chromosomes 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 and 18

An F₂ chicken population was developed by crossing broiler line (TT) with a layer line (CC). Seven males TT were mated with seven females CC to generate an F₁ population. Each male F₁ was then mated with three unrelated females F₁ generating approximately 100 individual per family of dam. On the present study 5 families were used, which showed the greatest number of informative markers in previews studies of chromosomes 1 to 5 of the resource population. Phenotypic data were collected for body weight at 1 (BW1), 35 (BW35) and 41 (BW41) days of age, weight gain (WG35-41), feed intake (FI35-41) and feed efficiency (FE35-41) from 35 to 41 days of age. The parental and F₁ individuals were genotyped for 35 microsatellite markers distributed on chromosomes 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 and 18. The informative markers were genotyped on the F₂ from the selected families. Chromosome 16 was excluded, because the only available marker was not informative. On chromosome 17 only one marker was informative, therefore a single marker analysis was used to associate the marker with the selected characteristics. The linkage map of each chromosome was constructed and compared to the consensus map. The linkage maps showed the same marker ordering compared to the consensus map, however small discrepancy between markers distances were presented. Interval mapping using regression methods was applied to a line-cross and least square analysis, using the *QTL Express* program, on the F₂ analyses option. On chromosome 17, two characteristics were associated to the marker genotype: WG35-41 ($P < 0.05$) and FE35-41 ($P < 0.01$). Suggestive QTLs were detected for BW35, BW41, WG35-41 and FE35-41 on chromosome 10. A QTL x family interaction effect was statistically significant for FE35-41. QTLs for BW35, BW41 and WG35-41 showed additive effects, only FE35-41 showed dominance effect.

Keywords: *Gallus gallus*; QTL; Microsatellite marker

1 INTRODUÇÃO

Seguindo a redescoberta do Mendelismo em 1900, a genética tornou-se a ciência do século XX. A aplicação da genética de aves via seleção artificial pelo homem, no entanto, começou com a domesticação da galinha no período Neolítico. Apesar da genética ser uma ciência do século XX, há uma longa história de seleção de aves por motivos religiosos e cerimoniais, expressão de mutantes, esporte e alimentação. Quer o objetivo tenha sido para aumentar o comprimento da plumagem da cauda, para o canto, ou para espessura da canela, a seleção dos pais para a próxima geração era baseada no fenótipo relacionado à característica de interesse. Embora os conceitos de mitose e meiose não serem entendidos ou até mesmo descritos, a seleção fenotípica era frequentemente acompanhada por informações das relações existentes entre os animais. Conseqüentemente, apesar dos conceitos de hereditariedade e Darwinismo em domesticação não serem compreendidos durante décadas ou até mesmo centenas de anos, a genética era aplicada sem o conhecimento específico dos mecanismos (SIEGEL et al., 2006)

Segundo Siegel et al. (2006), avanços na genômica de aves tem seguido o que pode ser chamado de sucessões com incrementos freqüentes, isto é, mudanças cumulativas vem ocorrendo durante gerações e gerações. Fatores genéticos, ou não, podem resultar em mudanças, no entanto são os fatores genéticos que facilitam a sustentabilidade das mudanças.

Uma das áreas de investimento na biotecnologia animal é o desenvolvimento e uso de ferramentas como marcadores moleculares para auxiliar o melhoramento animal. Com a tecnologia de DNA recombinante e da reação em cadeia da polimerase (“Polimerase Chain Reaction” – PCR), diferentes técnicas foram desenvolvidas permitindo a identificação de vários tipos de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma em várias espécies de animais de interesse zootécnico, possibilitando que eles sejam associados a características quantitativas e, assim, utilizados num passo seguinte na seleção assistida por marcadores (Marker Assisted Selection – MAS) (NONES, 2004).

A galinha doméstica é um excelente modelo para a aplicação da tecnologia de mapeamento genético de QTL, devido ao curto intervalo de gerações e

da possibilidade de se obter um grande número de famílias de meio-irmãos e de irmãos-completos (CROOIJMANS et al., 1996). O genoma da galinha consiste de 38 pares de cromossomos autossômicos e 2 cromossomos sexuais: Z e W. Estes podem ser divididos em grupos: A (1-10, W e Z), B (11-16), C (17-32) e D (33-38) (SCHMID et al., 2005).

O mapeamento de QTL através de marcadores microssatélites é uma das estratégias que vêm sendo utilizada para a identificação de regiões do genoma que controlam características quantitativas de importância econômica em animais. Os marcadores moleculares microssatélites, devido ao seu extenso polimorfismo, facilidade de amplificação por PCR e de identificação de alelos, têm sido amplamente utilizados para gerar mapas de ligação, identificar e localizar regiões associadas a características quantitativas.

Para o mapeamento de QTL deve-se estudar a relação destes marcadores microssatélites com características fenotípicas em populações planejadas, obtidas através do cruzamento de linhagens divergentes ou com diferenças fenotípicas acentuadas, que estejam segregando para características de interesse, utilizando um delineamento apropriado (NONES, 2004).

Schmid et al. (2005) apresentaram um mapa consenso do genoma da galinha, a partir dos mapas de ligação de 3 populações: East Lansing (CRITTENDEN et al., 1993), Compton (BUMSTEAD; PALYGA, 1992) e Wageningen (GROENEN et al., 1998), que inclui um total de 2261 locos em 53 grupos de ligação, cobrindo 4200 cM. Informações detalhadas sobre as famílias utilizadas no mapa consenso e os marcadores disponíveis podem ser encontradas nas páginas do *Chicken Genome Project* da *Michigan State University* (<http://poultry.mph.msu.edu/>) e do *Roslin Institute* (<http://www.thearkdb.org>).

A construção do mapa consenso e a disponibilidade de marcadores microssatélites, permitiram o desenvolvimento de vários estudos de mapeamento de QTL. Desde 1998, mais de cinquenta estudos já apresentaram QTL mapeados para características de crescimento e composição corporal, resistência a doenças, produção de ovos, comportamento e parâmetros metabólicos.

Em 1999, a Embrapa Suínos e Aves em parceria com a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), deram início a estudos em genômica de aves no Brasil, com objetivo de mapear QTL. Para isso foi desenvolvida uma população a partir do cruzamento recíproco de linhagens fenotipicamente distintas de corte e postura, gerando uma população F_2 . Estudos de mapeamento de QTL nos cromossomos 1 a 8, 11 e 13 dessa população, permitiram a associação de diversas regiões desses cromossomos a características de desempenho e carcaça.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo dar continuidade aos estudos iniciais e abranger um número maior de cromossomos para o estudo de mapeamento de QTL nesta população experimental.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura e o melhoramento genético

A produção e consumo de carne de frango tem apresentado um crescimento acentuado no Brasil e no mundo, sendo uma das principais fontes de proteína consumida atualmente. Do início da década de 90 até 2005, as exportações saltaram de 299.218 para 2.845.946 toneladas, e a carne de frango manteve, mais uma vez, a liderança (55,3%) dentro das exportações de carnes do país em 2005 (ABEF, 2005).

Segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos, a produção de carne de frango do Brasil em 2005 atingiu 9,297 milhões de toneladas, 9,5% acima do ano anterior. O resultado manteve o país como o terceiro maior produtor, abaixo apenas dos EUA e da China, onde a produção cresceu 3% e 2%, respectivamente. Já a exportação mundial registrou em 2005 um expressivo crescimento de 16%. O Brasil teve uma participação de 41% nessas vendas no mercado internacional, mantendo sua posição de maior exportador. Enquanto isso, os Estados Unidos, ocupando o segundo lugar no ranking, registraram um aumento de 13,5% nas vendas, que totalizaram 2,464 milhões de toneladas.

A produção tanto de frangos de corte quanto de ovos, teve um crescimento considerável no século passado, devido a melhorias no manejo, nutrição, ambiente, instalações, sanidade e, principalmente, devido aos progressos obtidos pelo melhoramento genético. O grande aumento do volume de produção e a eficiência de produção por ave são atribuídos, na sua maioria, ao desenvolvimento genético das linhagens de galinhas (LEDUR, 2003).

Os programas de melhoramento tradicionais obtiveram grande progresso para características tanto de produção de ovos quanto de carne. Associado a esse sucesso também foram adquiridas várias características indesejadas. Em frangos de corte, houve um aumento na incidência de desordens congênitas, como ascite e anomalias nos pés, redução da fertilidade e de resistência a doenças infecciosas. Em galinhas de postura, ocorreu um aumento na incidência de osteoporose associada ao aumento na produção de ovos (BURT, 2005).

Segundo este autor, dada a possibilidade de que o progresso genético para produção de ovos e carne alcance seu limite nos próximos vinte anos, as prioridades na indústria avícola serão a redução nos custos e o desenvolvimento de novos produtos. Com o aumento da exigência de segurança alimentar haverá a necessidade de reduzir o uso de produtos químicos e antibióticos e aumentar a resistência genética a patógenos. Essas novas características são difíceis e caras para serem mensuradas por seleção genética tradicional e o progresso na genômica de aves nos últimos anos promete novas soluções para estes problemas.

Grandes avanços na biologia durante os últimos 150 anos incluem a teoria da evolução por seleção natural de Darwin, a teoria de hereditariedade de Mendel, a teoria da genética quantitativa conduzida por Fisher, Haldane e Wright, o desenvolvimento da genética molecular e mais recentemente, a genômica. O frango tem desempenhado um papel importante em muitos desses avanços. Por exemplo, Bateson (1902) utilizou a galinha para demonstrar pela primeira vez as características hereditárias Mendelianas em animais. Programas de seleção e experimentos de cruzamentos em galinhas têm apresentado um papel importante para testes e desenvolvimento de teorias mais avançadas em genética quantitativa. No entanto, para muitos genes, o entendimento de suas funções ainda continua ausente ou fragmentada. Além disso, apesar das causas de muitas desordens hereditárias que exibem herança simples terem sido resolvidas, o entendimento da base genética para características e desordens multifatoriais é muito incompleta. Semelhantemente, bases genéticas para a diversidade fenotípica normal presente em populações não-endogâmicas é pouco entendida (SIEGEL et al., 2006).

Um caminho clássico para mapear os genes que controlam características fenotípicas é a condução de experimentos de cruzamento entre linhagens que estão fixadas para alelos controladores dessas características (SIEGEL et al., 2006). Desta forma, esses cruzamentos permitem o estudo de regiões que possam estar influenciando no controle de características quantitativas (QTL). Uma das metas da pesquisa genômica em aves tem sido o mapeamento e identificação desses QTL. Diferentes grupos de pesquisa já apresentaram resultados de mapeamento de QTL na galinha para diversas características de interesse para indústria, como resistência a

doenças, crescimento e composição corporal, produção de ovos, comportamento e parâmetros metabólicos.

Contudo, o grande progresso nos últimos anos na genômica de aves, incluindo a geração de um esboço do seqüenciamento do genoma de alta qualidade (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2004) e um mapa de alta densidade baseado em SNP (International Chicken Polymorphism Map Consortium, 2004), nos coloca em uma posição onde podemos colher os frutos dos programas de seleção que vem sendo conduzidos desde que a galinha começou a ser domesticada. Isto nos permitirá identificar genes envolvidos tanto em características Mendelianas simples, quanto para as multifatoriais complexas (SIEGEL et al., 2006)

A genética da galinha tem uma longa história de conquistas, tanto para contribuição com novos conhecimentos, como para o atendimento da demanda global de alimento. O desafio agora é concentrar esforços na implementação real das ferramentas geradas, complementando ambos, ciência e aplicação (SEIGEL et al., 2006).

2.2 Marcadores moleculares

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares” (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Três tipos de marcadores vem sendo utilizados em estudos de genômica: marcadores morfológicos, marcadores baseados em proteínas e marcadores baseados em DNA. Para ser um marcador molecular, o loco marcador tem que apresentar variações detectáveis experimentalmente entre os indivíduos na população em estudo. Essas variações podem ser consideradas em diferentes níveis biológicos, do simples fenótipo herdado até a detecção de variações em um único nucleotídeo (LIU, 1998).

Os primeiros estudos de mapeamento concentravam-se em características de herança Mendeliana simples, como cor, tamanho, altura e formas. Em alguns casos caracteres morfológicos podem ser utilizados como indicadores para um gene específico e são usados como marcadores genéticos nos cromossomos. Algumas variações morfológicas podem ter valor econômico significativo (LIU, 1998).

Em seguida surgiram os marcadores baseados em proteínas ou isoenzimas. Os marcadores isoenzimáticos correspondem a genes associados a características importantes, que produzem polimorfismos de proteínas.

O desenvolvimento da tecnologia de DNA recombinante e da amplificação de segmentos de DNA via PCR (“Polymerase Chain Reaction” – reação de polimerase em cadeia), abriram caminho para a análise genética direta da variação na sequência de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Existem vários tipos de marcadores moleculares baseados em DNA, destacando-se os RFLP (*Restriction fragment length polymorphism*), VNTR (*Variable number of tandem repeats*), microssatélites ou repetições de seqüências simples (*Simple sequence repeat* – SSR), EST (*Expressed Sequence Tag*), SNPs (*Single nucleotide polymorphisms*), RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) e AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), os marcadores moleculares apresentam algumas vantagens em relação aos marcadores morfológicos como: níveis de polimorfismo alto para cada loco estudado e em geral são dominantes, contendo maior quantidade de informação genética por loco. Devido às diferenças entre os tipos de marcadores moleculares, alguns se mostram mais eficientes em relação a outros, considerando-se a repetibilidade entre indivíduos avaliados ou em relação à característica de dominância. Assim a escolha do marcador ideal deve levar em consideração as vantagens e desvantagens de cada um, dependendo dos objetivos do estudo conduzido.

O primeiro mapa de ligação publicado para aves utilizou os marcadores do tipo RFLP para sua construção (BUMSTEAD; PALYGA, 1992). Os RFLP são obtidos a partir de um polimorfismo dentro da seqüência de um sítio de restrição ou de inserções ou deleções ocorrendo dentro de um fragmento de restrição, necessitando do DNA clonado, mas não seu seqüenciamento. É um marcador codominante, possibilitando a identificação de genótipos homo e heterozigotos em cada loco estudado, gerando mais informações e permitindo uma análise detalhada da ação gênica e da interação entre os alelos. O número de marcadores RFLP é praticamente ilimitado, e o nível de polimorfismo alélico em cada loco é grande (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No entanto tem desvantagem de apresentar os estágios de desenvolvimento e otimização

muito laboriosos e também por serem na grande maioria bialélicos, resultando em menos polimorfismos de que os marcadores microssatélites (CHENG, 1997; DODGSON et al., 1997).

Os marcadores microssatélites ou SSR são pequenas seqüências agrupadas de 1 a 6 pb, repetidas em tandem e distribuídas ao longo do genoma. Estes marcadores diferem entre si pelo número de repetições e composição de nucleotídeos (dinucleotídios – mais comum, tri e tetranucleotídios), formando sítios altamente polimórficos, sendo um ponto importante para a análise genética, pois permite amostrar simultaneamente um grande número de locos polimórficos no genoma (LIU, 1998 e FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Esses marcadores podem ser amplificados por PCR utilizando-se um par de “primers” específicos complementares a seqüências únicas, que flanqueiam o microssatélite. São marcadores codominantes, ou seja, ambos os alelos de um indivíduo heterozigoto são visualizados. Como mencionado anteriormente, também são marcadores multialélicos, ou seja, numa população vários alelos de um loco podem ser detectados e discriminados. Por estas razões são marcadores que possuem um maior conteúdo de informação de polimorfismo (PIC – Polymorphism Information Content, FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No entanto apresentam um elevado custo inicial para a identificação no genoma e para o desenho dos “primers” que flanqueiam as regiões repetitivas. Contudo, tem sido os marcadores mais utilizados para mapeamento de QTL em galinha.

Os marcadores AFLP também estão presentes no mapa de ligação consenso da galinha (SCHMID et al., 2005). Para a obtenção desses marcadores é necessária a clivagem do DNA com enzimas de restrição, amplificação por PCR de parte do fragmento gerado com “primers” específicos e posterior separação dos fragmentos amplificados em gel de alta resolução (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Porém nos últimos dois anos o número de marcadores SNPs teve um aumento acentuado e espera-se que essa tendência continue, com os SNPs passando a serem os marcadores mais numerosos nos mapas consenso, tornando-se uma opção

importante para refinar o mapeamento de QTLs (SCHMID et al., 2005). No entanto, eles ainda apresentam um alto custo de genotipagem o que limita seu uso.

2.3 Populações referência e mapa genético

Mapas genéticos são considerados uma das aplicações de maior impacto da tecnologia de marcadores moleculares na análise genética de espécies, possibilitando principalmente: a localização das regiões genômicas que controlam caracteres de importância, quantificação do efeito destas regiões na característica estudada e a junção de todas essas informações para uso em programas de melhoramento. A construção de um mapa de ligação integra um grande número de técnicas que incluem o desenvolvimento de linhagens progenitoras e populações segregantes adequadas, a identificação dos genótipos nos locos marcadores através de técnicas de biologia molecular e a utilização de técnicas de análise estatística para estimar a ligação e distância entre os marcadores (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), a construção do mapa genético baseia-se na estimativa da distância em unidades de recombinação entre dois marcadores ou locos, que não é uma distância física e sim reflete a frequência de recombinação genética (“crossing-over”) entre eles. Para isso, a porcentagem de recombinação é transformada em centiMorgans através de diferentes funções de mapeamento. Uma unidade de cM equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bem próximos, mas pode diferir consideravelmente da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes. Isso ocorre devido ao aumento da probabilidade de “crossing-over” duplos e triplos, que podem influenciar a estimativa da proporção de genótipos recombinantes em relação a genótipos parentais.

Uma característica singular do genoma da galinha é a grande variabilidade dos tamanhos dos cromossomos. Como cada braço do cromossomo deve ter pelo menos um “crossing-over” obrigatório, acredita-se que os cromossomos menores apresentam uma maior taxa de recombinação. Comparações entre os mapas genéticos e seqüências genômicas confirmaram essas expectativas, com taxas de recombinação de 2,8 cM/Mb para os maiores e 6,4 cM/Mb para os menores cromossomos.

Contrastando com 1-2 cM/Mb para a maioria dos cromossomos em humanos, a galinha se constitui no organismo ideal para estudos de ligação gênica (BURT, 2005).

Um mapa genético consenso da galinha foi publicado pela primeira vez em 2000 por Groenen e colaboradores. O mapa consenso reúne os dados originais dos mapas genéticos baseados em três populações diferentes: East Lansing (CRITTENDEN et al., 1993), Compton (BUMSTEAD; PALYGA, 1992) e Wageningen (GROENEN et al., 1998). Segundo um trabalho mais recente apresentado por Schmid et al. (2005), o mapa consenso aumentou consideravelmente o número de marcadores de 1889 locos em 51 grupos de ligação cobrindo 3800 cM (SCHMID et al., 2000), para seu tamanho atual de 4200 cM com 2261 locos em 53 grupos de ligação.

Segundo Schmid et al. (2005), atualmente as populações referência de East Lansing e Wageningen continuam sendo utilizadas para estudos dos mapas de ligação, porém informações obtidas a partir de diferentes estudos de mapeamento de QTL também contribuíram para a localização de mais 45 marcadores microsatélites no mapa consenso, resultando em um total de 2306 marcadores.

O genoma da galinha consiste de 38 pares de cromossomos autossômicos e 2 cromossomos sexuais: Z e W, onde a fêmea é heterozigota. De acordo com o “Second report on chicken genes and chromosomes 2005”, apresentado por Schmid et al. (2005), os cromossomos podem ser divididos em grupos: A (1-10, W e Z), B (11-16), C (17-32) e D (33-38). Dos 53 grupos de ligação identificados, 31 grupos já foram designados a cromossomos específicos. Os 22 grupos restantes têm um número com referência ao grupo de ligação originado dos três mapas de ligação (ExxCxxWxx). Estudos estão sendo conduzidos na tentativa de desenvolver outros marcadores genéticos, entre eles os SNP, para mapeá-los nas populações East Lansing e Wageningen. Estes estudos deverão resultar em uma redução no número de grupos de ligação.

Atualmente, as seqüências dos mapas e os marcadores posicionados estão disponíveis para 30 cromossomos, porém o objetivo é construir os mapas de ligação para os 39 cromossomos presentes no genoma da galinha. A versão mais atual dos mapas consenso está disponível no banco de dados *ChickAce*

(<https://acedb.asg.wur.nl/>) ou no *ChickCmap* (<http://www.animalscience.nl/cmap>) (SCHMID et al., 2005).

2.4 Mapeamento de QTL

2.4.1 População experimental

Um dos passos mais importantes na condução de um estudo de mapeamento de QTL é o delineamento da população experimental. O objetivo é gerar uma ou mais famílias, com pedigrees, que apresentem grande variação para as características de interesse (VALLEJO; CHENG, 1997). A seleção da população para mapeamento genômico envolve a escolha das linhagens parentais e do tipo de cruzamento. Esse dois fatores, juntamente com a classe do marcador utilizado, vão depender dos objetivos do estudo (LIU, 1998).

As linhagens parentais devem apresentar variações suficientes para as características de interesse, tanto no DNA quanto no fenótipo. Quanto mais variações presentes no DNA, mais fácil encontrar marcadores informativos (polimórficos), possibilitando traçar eventos de recombinação para o mapeamento de QTLs (LIU, 1998).

Para o mapeamento, as linhagens parentais empregadas podem ser endogâmicas, isto é, estão fixadas para alelos alternativos tanto do marcador quanto do QTL; ou não-endogâmicas, onde se pressupõe que as linhagens sejam homozigotas para alelos alternativos dos QTLs e polimórficas com relação aos marcadores (BOVENHUIS et al, 1997; LIU, 1998). Diversos estudos de mapeamento de QTL, com plantas e animais de laboratório, têm utilizado populações obtidas a partir de cruzamentos entre linhagens endogâmicas divergentes, com delineamento F_2 ou retrocruzamento, no entanto isso não é possível para os animais de produção (RUY, 2004). Todavia o uso de populações não-endogâmicas submetidas a vários ciclos de seleção também é viável, porém essas populações apresentam algumas desvantagens para o mapeamento de QTL: 1) Locos que influenciam características sob seleção podem apresentar frequências alélicas extremas ou estarem fixados nas populações, o que reduz muito o conteúdo de informação dos marcadores e QTL; ainda, nas

populações selecionadas diminuem as diferenças fenotípicas entre genótipos, porque os alelos com efeitos indesejáveis estão provavelmente reduzidos ou eliminados após longo tempo de seleção; 2) as fases de ligação entre QTL e marcadores podem variar entre indivíduos dentro da linhagem, por isso a associação entre QTL e marcadores deve ser feita dentro de família e 3) a análise estatística é mais laboriosa, pois até 4 alelos podem estar segregando nos locos do QTL e dos marcadores para cada família (ZHU et al, 2001).

Segundo esses autores, todas essas desvantagens podem resultar em redução significativa no poder de detecção de QTL. No entanto, o mapeamento de QTL em populações não-endogâmicas não pode ser completamente substituído por populações endogâmicas, pois nestas a detecção de QTL é geralmente baseada em diferenças fixadas entre linhagens, e sua relevância para QTL segregando dentro de populações não-endogâmicas não é clara. Do ponto de vista prático, como a seleção assistida por marcadores, os QTLs detectados em cruzamentos entre linhagens endogâmicas podem não estar segregando em populações comerciais.

Para Liu (1998), o estudo de mapeamento de QTL em populações não-endogâmicas requer o desenvolvimento de 3 gerações para distinguir os possíveis diferentes alelos e estabelecer a fase de ligação dos alelos dos marcadores nas diferentes famílias e determinar os eventos de recombinação. Sendo assim, o tamanho da população avaliada e o número de marcadores utilizados são fatores relevantes para se obter ligação verdadeira entre o marcador e o QTL.

Segundo Zhu et al. (2001), experimentos contendo um grande número de indivíduos podem detectar locos com efeitos genéticos menores. Teoricamente, uma família grande de irmãos-completos, totalmente informativa, com todos os alelos parentais distintos para todos os locos, é suficiente para o mapeamento de QTL; porém esta família provavelmente não existe em uma população. Contudo se um maior número de famílias for utilizado, aumentaria a chance de ter pelo menos uma família de irmãos informativa para cada loco.

Assim, é importante a realização de uma avaliação prévia das linhagens, para que se obtenha as informações necessárias para a escolha dos parentais adequados (LIU, 1998). A determinação do conteúdo de informação polimórfica (PIC)

da população experimental, isto é, a probabilidade de um indivíduo parental ser heterozigoto para um loco e outro indivíduo apresentar um genótipo diferente, ajuda a determinar quais e quantas famílias poderão ser utilizadas para o estudo de mapeamento de QTL. Com isso, as famílias podem ser escolhidas com base na heterozigozidade dos animais parentais, aumentando assim o grau de informação dos marcadores (ZHU et al., 2001)

2.4.2 Métodos estatísticos

Para o mapeamento de QTL, os delineamentos utilizados baseiam-se em populações segregantes, onde centenas de indivíduos são avaliados para os caracteres quantitativos de interesse e genotipados para vários marcadores moleculares, distribuídos no genoma. Se uma diferença for encontrada na média do fenótipo entre as classes genóticas do marcador, pode-se inferir que existe um QTL ligado àquele marcador (RUY, 2004).

Diversos métodos de análise estatística foram desenvolvidos para estudos de mapeamento de QTL. Desde uma análise de marca simples, empregando um teste t simples, até as metodologias de mapeamento por intervalo que permitem o mapeamento de QTL simples ou múltiplos e a adição de efeitos fixos e covariáveis no modelo.

Uma análise de marca simples examina a distribuição dos valores do caráter separadamente para cada marcador; portanto cada teste é conduzido independentemente da informação de outros locos. Para análise de um único marcador, diferentes testes estatísticos podem ser empregados: teste t, regressão linear simples, análise de variância ou razão de verossimilhança. Estes testes não apresentam aspectos computacionais complicados e não necessitam da posição dos marcadores no genoma (LIU, 1998). Por ser uma análise muito simples, a qual não considera a estimativa de posição e efeitos do QTL, é indicada em casos onde apenas um marcador é utilizado no cromossomo (região) ou quando a distância entre um marcador e outro é muito grande.

Pelas razões mencionadas acima, outra metodologia foi proposta por Lander e Botstein (1989): mapeamento por intervalo, empregando estimativas de

máxima verossimilhança e valores de LOD. Este método permite estimar o efeito fenotípico e o valor de LOD para um QTL putativo em qualquer posição no cromossomo, sendo baseado nas frequências conjuntas de um par de marcadores adjacentes e um QTL pontual, flanqueado por essas duas marcas. Porém uma limitação dessa metodologia é a falta de softwares especializados que permitam a análise simultânea de vários QTL ligados, interações entre QTL, efeitos de QTL não ligados e efeitos fixos (HALEY et al., 1994). Segundo estes autores, as análises simultâneas permitem remover tendências e aumentar o poder de teste.

Em 1992, Haley e Knott, propuseram o mapeamento por intervalo empregando regressão linear múltipla em linhagens endogâmicas, a partir de dois marcadores flanqueadores. Os autores demonstraram que uma análise de quadrados mínimos fornece teste estatístico e estimativas muito similares àqueles obtidos por máxima verossimilhança, permitindo o uso de modelos mais complexos com uma menor demanda computacional. Este procedimento fornece estimativas para os efeitos aditivo (a) e de dominância (d) do QTL, bem como define as somas de quadrados e quadrados médios de regressão e desvio, permitindo a realização de testes de hipótese sobre a e d . A posição que gerar o melhor ajuste do modelo (menor soma de quadrados de resíduos) fornece a posição mais provável do QTL e as melhores estimativas dos seus efeitos. O modelo proposto pelos autores, também permite a utilização de técnicas de permutação (VISSCHER et al., 1996) e bootstrap (CHURCHIL; DOERGE, 1994) utilizadas para determinar o nível de significância genômico e o intervalo de confiança do QTL, respectivamente.

Entretanto, na grande maioria das espécies animais de produção não é possível obter linhagens endogâmicas, assim Haley et al. (1994) desenvolveram o método dos quadrados mínimos para análise de cruzamentos de linhagens não endogâmicas, a partir de três gerações e múltiplos marcadores ligados para análise de QTL. O modelo genético de F_2 (*line-cross*) assume que as linhagens utilizadas podem estar segregando para os locos dos marcadores, mas que estão fixadas para alelos alternativos do QTL. O modelo de “line-cross analysis” (F_2) foi desenvolvido a partir de populações F_2 com grupos de irmãos completos (“full-sib”) e meio-irmãos (“half-sib”).

Em cada loco, este método traça a origem dos alelos entre cada animal F_2 e suas respectivas linhagens parentais, permitindo determinar o(s) provável(is) genótipo(s) do QTL (QQ, Qq, qQ e/ou qq) em cada posição. A seguir são calculadas as probabilidades condicionais entre os genótipos dos locos e do provável QTL. Os efeitos aditivo (a) e de dominância (d) podem, então ser estimados para uma determinada posição por quadrados mínimos através de regressão entre os valores fenotípicos e as probabilidades condicionais

Em 1998, Knott et al. apresentaram uma extensão do modelo para testar também o efeito de “imprinting” (efeito gamético) quando um QTL fosse indicado. Esse modelo indica se há diferença entre os indivíduos heterozigotos receberem cada alelo através do macho ou da fêmea. Segundo de Koning et al. (2002), o fenômeno de “imprinting” é decorrente de modificações dos genomas parentais durante a gametogênese, resultando em uma expressão incompleta ou nula de alguns genes herdados de um dos parentais. Dessa forma, este efeito pode influenciar vários genes e características quantitativas em animais.

Vários *softwares* foram desenvolvidos e estão disponíveis para o mapeamento de QTL. Um deles muito utilizado nos estudos de mapeamento de QTL é o “QTL Express”. Desenvolvido por Seaton et al. (2002), ele dispõe de interface para o usuário na internet (<http://qtl.cap.ed.ac.uk>), utiliza mapeamento por intervalo e análise de regressão (HALEY et al., 1994) e pode ser empregado em diferentes modelos disponíveis (F_2 , Half-sib, Sib-pair, Large Single Full-Sib Family –Tree, F_2 Inbred/Co-dominant Marker, Backcross/Combined F_2 e Backcross populations), sendo adequado para populações não endogâmicas. Também permite o mapeamento de QTL simples ou múltiplos, a adição de efeitos fixos adicionais e covariáveis no modelo, além do uso de QTL adicionais como cofatores. O programa também permite a implementação de testes de permutação e bootstrap.

2.4.3 Níveis de significância

Para Lynch e Walsh (1998), um nível de significância genômico apropriado é muito importante e deve ser considerado na estatística dos estudos de mapeamento de QTL. Segundo Churchill e Doerge (1994), o nível de significância genômico é usado

para detectar a presença de QTL em algum lugar em todo genoma, controlando a taxa de erro tipo I (falso positivo).

De acordo com Lander e Kruglyak (1995), é importante fazer distinção entre o nível de significância pontual e o genômico; o nível de significância pontual deveria ser considerado apenas como sugestivo e os níveis genômicos de 5 e 1% deveriam ser obtidos empregando-se a correção de Bonferroni, que consiste em determinar o valor do nível de significância no cromossomo que proporcionará o nível de significância conjunto desejado. Esses autores recomendam que três níveis de significância devem ser considerados: (1) ligação sugestiva, correspondendo a um falso positivo apenas ocorrendo em todo o genoma, (2) a significância a 5% no genoma, correspondendo à ligação significativa e (3) a significância a 1% no genoma, caracterizando uma ligação altamente significativa.

Porém, o problema em usar a correção de Bonferroni para a obtenção do nível de significância individual, é que essa correção é obtida considerando t testes independentes, o que não ocorre no mapeamento de QTL, pois os marcadores podem estar localizados em um mesmo cromossomo (COELHO; SILVA, 2002). Quando os testes não são independentes, envolvendo marcadores ligados, uma solução é utilizar procedimentos de reamostragem (CHURCHILL; DOERGE, 1994).

Churchill e Doerge (1994) propuseram utilizar um procedimento de aleatorização ("data shuffling"), nos quais as análises são refeitas após embaralhamento dos valores fenotípicos enquanto são preservados os genótipos para cada indivíduo. O teste estatístico é computado para cada reamostragem gerando uma distribuição empírica sob a hipótese de não associação do marcador à característica. Caso não haja QTL ligados a regiões específicas do genoma, o processo de aleatorização (permutação) não afetará a distribuição da estatística usada no teste. Para obter o nível de significância genômico, são realizadas " N " permutações e para cada permutação a maior razão F é anotada e os " N " valores de F são ordenados. O valor de F que representa $100(1-\alpha) \%$ é tido como ponto de corte de significância, ou seja, representa o nível de significância genômico. O " α " é o valor crítico que define no teste o controle de erro tipo I.

Esses mesmo autores afirmam que quanto maior o número de permutações, mais precisas são as estimativas. Eles sugerem que 1.000 permutações são suficientes para obter um nível de significância genômico de 5% e que 10.000 ou mais são necessárias para obter um nível de significância de 1%.

Muitos estudos de mapeamento de QTL em galinha têm empregado os níveis de significância propostos por Lander e Kruglyak (1995). Segundo de Konning et al. (1999), considerar o nível de significância no genoma facilita a comparação entre os diferentes estudos.

2.4.4 Intervalo de confiança

O intervalo de confiança para a posição de QTLs encontrados em estudos pode ser calculado a partir do método de reamostragem “bootstrap” proposto por Visscher et al. (1996). Segundo esses autores, quanto maior a evidência da presença de um QTL em uma determinada região, menor é o intervalo de confiança (IC).

Na metodologia proposta pelos autores citados acima, subamostras (N observações com genótipos dos marcadores e fenótipo) são retiradas do total das observações, gerando assim uma nova população que será submetida à análise estatística para identificação de QTL. Essas amostragens são feitas com reposição, permitindo que alguns valores nunca apareçam e outros sejam considerados mais de uma vez. Após obtidas as estimativas, essas devem ser ordenadas, retirando-se 2,5% dos valores nos extremos inferior e superior da distribuição, resultando assim no intervalo de confiança de 95% para a provável posição do QTL.

Para Visscher et al. (1996), a amplitude do IC depende do tamanho da população e do efeito do QTL. Já a variação no espaçamento dos marcadores não resulta em intervalos de confiança muito diferentes.

2.5 QTL mapeados em galinha

Muitos estudos já foram conduzidos em mapeamento de QTL visando identificar regiões possivelmente associadas a características comerciais de interesse para indústria avícola. Segundo Burt (2005), mais de 600 QTL já foram mapeados ao longo dos 4200 cM do genoma.

Van Kaam et al. (1999) mapearam no cromossomo 1, um QTL significativo no genoma para consumo alimentar, outro com ligação sugestiva para crescimento entre 23 e 48 dias de idade e outro para peso corporal aos 48 dias de idade, em um estudo sobre crescimento e eficiência alimentar. Também mapearam 3 QTL com ligação sugestiva para consumo de alimento ou de ração no cromossomo 4 e 2 QTL com ligação sugestiva para a mesma característica no cromossomo 26. E no cromossomo 2 foram mapeados 4 QTL com ligação sugestiva para consumo de alimento ou de ração.

Para peso vivo às 3 semanas, Sewalen et al. (2002) mapearam QTL significativos nos cromossomos 7, 13 e Z e sugestivos nos cromossomos 4, 5 e 8. Nos cromossomos 1, 2, 4, 7, 8 e 13, mapearam QTL significativos e nos cromossomos 6, 9, 27 e Z sugestivos para peso vivo às 6 semanas. E, finalmente, para peso vivo às 9 semanas, QTL significativos foram mapeados nos cromossomos 1, 2, 4, 8, 13 e 27 e sugestivos, nos cromossomos 1, 6, 7 e 9. Neste estudo, os autores utilizaram cruzamento de uma linhagem fêmea de postura (*White Leghorn*) e outra macho de corte comercial, onde foram avaliados 546 indivíduos na geração F2.

Ikeobi et al. (2002) mapearam QTL significativos para peso de gordura abdominal nos cromossomos 1, 3, 5, 7, 15 e 28 e um sugestivo no cromossomo Z. Para gordura da pele e subcutânea eles encontraram QTL significativos nos cromossomos 3, 7, 13 e 28. E para gordura da pele ajustada para peso da gordura abdominal, QTL significativos foram mapeados nos cromossomos 5, 7 e 15.

Em um trabalho de Kerje et al. (2003) vários QTL foram mapearam utilizando uma população experimental gerada a partir do cruzamento entre as raças *White Leghorn* e *Red Junglefowl*. As características avaliadas foram peso corporal, crescimento e peso do ovo. Nos cromossomos 11, 12, 27 e Z foram mapeados QTL para peso corporal; nos cromossomos 11, 27 e Z foram mapeados QTL para crescimento e nos cromossomos 14 e 23 foram mapeados QTL para peso do ovo.

Em um segundo trabalho Ikeobi et al. (2004) mapearam QTL com ligação sugestiva no cromossomo 18 para musculatura peitoral, no cromossomo 27 para pesos de sobrecoxa e asa, no cromossomo 28 para peso vivo e no cromossomo Z para

musculatura da coxa, pesos da asa, musculatura da coxa e sobrecoxa, e também para pesos da coxa com nível de 5% de significância.

Jennen et al. (2004) utilizaram um cruzamento entre duas linhagens de fêmeas de corte geneticamente diferentes originadas da raça *White Plymouth Rock*, para mapear QTL sugestivos para peso vivo às 7 e 10 semanas nos cromossomos 2, 10 e 14 e significativo no cromossomo 13. Encontraram também QTL sugestivos para gordura abdominal nos cromossomos 1, 4, 7, 11 e 13 e para porcentagem da gordura abdominal nos cromossomos 2, 3, 4, 15, 18 e 27.

No cromossomo 17, Sasaki et al. (2004) mapearam QTL sugestivo para peso vivo aos 239 dias de idade, próximo ao marcador MCW0151 a 30 cM. Esses autores utilizaram 2 marcadores, ADL0149 e MCW0151, genotipados em 265 fêmeas.

Jennen et al. (2005) apresentaram outro estudo onde mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 5 semanas no cromossomo 15. Neste estudo, foram utilizados 1006 animais e 3 marcadores. O QTL mapeado encontra-se entre os marcadores LEI0120 e MCW0052, a 19 cM.

No cromossomo 12, Schreiwess et al. (2005) mapearam um QTL sugestivo para peso vivo às 55 semanas, a 58 cM entre os marcadores ADL0044 e GCT0055.

Abasht et al. (2006) apresentaram uma revisão dos QTL identificados no genoma da galinha. Essa revisão teve como objetivo lançar alguma luz sobre a arquitetura genética de características quantitativas complexas da galinha, resumindo e integrando resultados dos estudos de mapeamento de QTL. Os autores utilizaram níveis de significância menos estridentes do que aqueles utilizados na revisão do Hocking (2005). Dos 50 estudos revisados por esses autores, 21 foram para crescimento e composição, 13 para resistência a doenças, 8 para produção de ovos, 5 para comportamento e 3 para parâmetros metabólicos. Alguns trabalhos de mapeamento de QTL para produção de ovos e parâmetros metabólicos, também encontraram QTL para peso vivo e composição corporal.

Em estudos mais recentes, McElroy et al. (2006) trabalharam com os 11 maiores cromossomos de *Gallus gallus*, incluindo os cromossomos 9 e 10. Porém, os autores mapearam QTL apenas no cromossomo 10, para perda no transporte a 89 cM.

Park et al. (2006) mapeou QTL para 15 cromossomos da galinha, dentre eles os cromossomos 9, 10 e 17. No cromossomo 9, na posição de 78 cM, foi mapeado um QTL para concentração de colesterol no sangue. Encontraram também QTL para peso do baço, na posição de 15cM do cromossomo 10 e no cromossomo 17 para peso da Bursa na posição de 0 cM. Os 3 QTL mapeados foram sugestivos.

Zhou et al. (2006), mapearam QTL sugestivos no cromossomo 9 para peso vivo a 6 e 8 semanas e para ganho de peso médio diário da 4^a à 6^a semana, entre 157 e 165 cM. No cromossomo 10, mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 2 e 4 semanas e para média de ganho de peso diário até a 2^a. semana, entre 18 e 21 cM. Esses mesmos autores mapearam QTL sugestivo também no cromossomo 14 para peso vivo às 2 e 4 semanas; ganho de peso médio diário de 0 - 2 semanas, de 4 a semanas e de 6 a 8 semanas, entre 13 e 95 cM. E no cromossomo 18, mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 8 semanas e para ganho de peso médio diário entre 4 e 6 semanas.

No Brasil, estudos estão sendo desenvolvidos, a partir de uma parceria entre Embrapa Suínos e Aves e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, com o objetivo de mapear QTL para diversas características de importância econômica em galinhas. O projeto de análise genômica teve início em 1999, com a formação de populações F2, a partir do cruzamento de linhagens divergentes de corte (TT) e postura (CC) que foram descritas por Zanella et al. (2000). Essas populações estão sendo utilizadas para mapeamento de QTL associados às características de crescimento, consumo, eficiência alimentar e composição e rendimento de carcaça (LEDUR et al., 2003).

Nesta população experimental, estudos já foram realizados nos cromossomos 1 a 8, 11 e 13. No cromossomo 1 foram mapeados QTL que não haviam sido descritos na literatura, como para peso de partes (peito, coxas e sobrecoxas, asas, pés), peso de órgãos (fígado, moela, pulmão e coração) e comprimento de intestino. Foram também mapeados QTL em regiões já descritas em outras populações para peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e peso da gordura abdominal (NONES et al., 2006).

No cromossomo 2, foram mapeados QTL significativo para peso vivo aos 35, 41 e 42 dias de idade, porcentagem de peito na carcaça e peso de peito. No cromossomo 4, foram mapeados QTL significativos para peso ao nascer, peso aos 35 dias, peso de moela e peito e porcentagem de gordura abdominal (BARON, 2004).

No cromossomo 3, foram mapeados QTL significativos para peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, ganho de peso do nascimento aos 35, 41 e 42 dias e sugestivo para peso dos pés entre 120 e 123 cM. Também foram mapeados QTL significativos para peso de gordura abdominal e porcentagem de gordura entre 121 e 123 cM, com efeito de *imprinting* e para peso de asas, coxas e sobrecoxas entre 158 e 163 cM. No cromossomo 5, foram mapeados quatro QTL sugestivos: para peso de coração a 187 cM, consumo de ração do 35º ao 41º dia a 198 cM, peso de gordura abdominal e porcentagem de gordura abdominal a 185 cM (RUY, 2004).

Nos cromossomos 6 e 11 foram mapeados QTL significativos para peso dos pés, entre os marcadores ROS0062 e ROS0003 (4 cM) e entre os marcadores ADL0123 e ADL0210 (46 cM), respectivamente. No cromossomo 7 foram mapeados QTL para peso vivo aos 35 e 42 dias de idade, para ganho de peso do nascimento aos 35 e 42 dias de idade, para consumo de ração dos 35 aos 41 dias de idade, a 116 cM entre os marcadores ADL0315 e ADL0169. Nos cromossomos 8 e 11 também foram mapeados QTL sugestivos para peso da moela, entre os marcadores ABR0345 e ADL0172 (62 cM) e ADL0123 e ADL0210, respectivamente. E no cromossomo 13 foi mapeado um QTL sugestivo para peso do coração a 39 cM entre os marcadores MCW0110 e MCW0104 (MOURA et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População experimental

A população utilizada neste estudo foi desenvolvida na Embrapa Suínos e Aves (Concórdia/SC). Foram escolhidas duas linhagens, uma de corte (TT) e outra de postura (CC). A linhagem TT é uma linha macho sintética, selecionada com o objetivo de melhorar geneticamente o potencial para peso corporal, conversão alimentar, rendimento de carcaça e de partes, fertilidade e eclodibilidade, viabilidade, redução da gordura abdominal e das doenças metabólicas (FIGUEIREDO et al., 2003a). A linhagem CC, originada da raça *White Leghorn*, foi selecionada por oito gerações para características de produção de ovos, peso do ovo, redução do peso corporal, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade e qualidade do ovo (FIGUEIREDO et al., 2003b).

Em um primeiro cruzamento, 7 machos (TT) foram acasalados com 7 fêmeas (CC) na proporção de um macho para uma fêmea. As aves, denominadas de parentais (P), foram mantidas em gaiolas individuais e tiveram seus pedigrees controlados. Os ovos gerados foram identificados para permitir o anilhamento dos pintos ao nascer. Desse cruzamento foi obtida a primeira geração denominada F_1 , formada por sete famílias (TC). Estas aves foram alojadas em gaiolas individuais e criadas como matrizes de corte.

A formação da segunda geração implicou na seleção de um macho e três fêmeas de cada família (F_1), sendo que cada macho fecundou três fêmeas, não parentes próximos, através de inseminação artificial. A geração obtida desses cruzamentos foi denominada F_2 ; cada casal F_1 gerou aproximadamente 100 pintos em 17 incubações, totalizando 2063 indivíduos F_2 .

Essa população F_2 TC foi identificada com anel, possuía controle de pedigree individual e foi avaliada para várias características de desempenho. As aves P, F_1 e F_2 , foram criadas como frangos de corte recebendo ração à base de milho e farelo de soja e água a vontade.

O número de indivíduos por geração e a estrutura da população deste cruzamento são apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Nos estudos realizados nessa população envolvendo os cromossomos 1, 2, 3, 4 e 5, as cinco famílias marcadas com asterisco na Tabela 2 foram bastante informativas. Este estudo realizou a genotipagem destas 5 famílias com marcadores microsatélites posicionados nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18.

Tabela 1 - 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 F₁.

Tabela 2 - Relações de parentesco nas famílias originadas do cruzamento TC

Casal Parental:							
<u>macho TT</u>	<u>5649</u>	<u>5661</u>	<u>5561</u>	<u>6232</u>	<u>5921</u>	<u>6037</u>	<u>5596</u>
fêmea CC	886	88	570	332	37	241	05
(nº casal)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Casal F ₁ :							
<u>machoTT</u>	<u>7716 (1)</u>	<u>7769 (2)</u>	<u>7797 (3)</u>	<u>7822 (4)</u>	<u>7975 (5)</u>	<u>7977 (6)</u>	<u>7985 (7)</u>
fêmeaCC	7761 (7)	7749 (6)	7972 (5)	7765 (2)	7713 (3)	7722 (1)	7805 (1)
(nº casal	7810 (4)	7816 (4)	7812 (4)	7971 (5)	7980 (7)	7771 (2)	7736 (4)
parental)	7978 (6)	7709 (3)	7992 (2)	7798 (3)	7755 (6)	7987 (7)	7743 (5)
Nº F ₂							
gerados	100(7761)	96 (7749)	99 (7972)	73 (7765)*	95 (7713)	102(7722)	88 (7805)
por mãe	77 (7810)*	97 (7816)*	100(7812)	100(7971)*	104(7980)	100(7771)	103(7736)
(nº mãe	100(7978)*	100(7709)	108(7992)	97 (7798)	101(7755)	80 (7987)	102(7743)
F ₁)							

Os números apresentados para machos e fêmeas são equivalentes aos anéis das aves

*Famílias que serão utilizadas neste estudo

3.2 Colheita dos dados fenotípicos e de amostras de sangue

Os dados de desempenho avaliados nos indivíduos F₂ foram: peso ao nascer (PN), peso vivo aos 35 (PV35) e 41 (PV41) dias de idade, ganho de peso (GP35-41), consumo de ração (CR35-41) e eficiência alimentar (EF35-41) dos 35 aos

41 dias de idade. A medida de ganho de peso foi obtida a partir da subtração do peso vivo aos 41 dias menos o peso vivo aos 35 dias de idade; o consumo de ração e a eficiência alimentar foram medidos no período compreendido entre o 35º e o 41º dias. Todas as medidas foram feitas em gramas. Análises prévias foram realizadas no SAS para eliminar valores discrepantes nas amostras.

As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo EDTA 10% e estocadas a -70 °C para extração de DNA. Foram colhidos 5 mL de sangue da asa (veia braquial, em 3 alíquotas de aproximadamente 1,6 mL/semana) dos P. Das gerações F₁ e F₂ o sangue foi colhido durante o abate das aves e, em seguida, também armazenado a -70°C para extração de DNA. Após a organização e separação de alíquotas de sangue, uma duplicata foi enviada à ESALQ/USP, em Piracicaba/ SP e o restante foi mantido como um banco de sangue na Embrapa Suínos e Aves, em Concórdia/ SC.

3.3 Extração de DNA

A extração de DNA dos animais P e F₁ foi realizada utilizando o protocolo de extração com proteinase K (Anexo I). A extração de DNA dos animais F₂ foi realizada utilizando o reagente para lise com solução detergente de guanidina (DNAzol® - Invitrogen Life Technologies), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com modificações realizadas por Campos et al. (2003). A metodologia consiste em adicionar a um tubo eppendorf 5 µL de sangue juntamente com 500 µL de reagente e homogeneizar por inversão o tubo algumas vezes, adicionar 250 µL de etanol absoluto e novamente homogeneizar o tubo delicadamente. Em seguida “pescar” o DNA com o auxílio de uma pipeta e descartar o líquido contido no tubo, retornar o DNA ao tubo e lavá-lo utilizando 500 µL de etanol 95% e centrifugar por 10 minutos a 1400 g. Finalmente descartar o sobrenadante do tubo e repetir a lavagem; após a centrifugação descartar novamente o sobrenadante, secar os tubos à temperatura ambiente por 10 minutos, ressuspender com 150 µL de água ultrapura e deixar a 37 °C durante 4 horas (Anexo II).

As amostras extraídas foram quantificadas em espectrofotômetro (HITACHI – U2000) e posteriormente padronizadas para 20 ng/μL. Em seguida foram testadas em gel de agarose 1,0%, para certificar sua integridade.

3.4 Escolha dos marcadores microssatélites

Os iniciadores utilizados para amplificação dos marcadores microssatélites envolvidos neste estudo foram cedidos pela Michigan State University através do U. S. National Animal Genome Research Program, e pelo Roslin Institute da Escócia. Os marcadores utilizados e suas respectivas posições de acordo com o mapa consenso nos cromossomos estão representados na Tabela 3.

Tabela 3 - Marcadores microssatélites cuja amplificação por PCR foi testada em cada cromossomo

(continua)

Cromossomo (Tamanho)	Marcador	Localização do marcador no mapa consenso (cM)	Tamanho previsto do fragmento (pb)
9 (132 cM)	ROS0078	0	165 - 225
	ADL0191	44	118 - 194
	ADL0021	53	160 - 190
	MCW0017	72	118 - 194
	ADL0136	107	260 - 284
	MCW0134	132	160 - 178
10 (120 cM)	MCW0228	0	222 - 251
	ADL0209	45	±163
	ADL0231	62	±136
	ADL0102	88	95 - 115
	MCW0003	90 - 120	±143
	LEI0112	107	-
12 (90 cM)	ADL0112	120	±133
	ADL0372	0	160 - 175
	ADL0044	45	160 - 175
	GCT0055	65	±213
14 (77 cM)	MCW0332	90	±199
	ADL0200	16	120 - 140
	LEI0098	37	155 - 175
	ADL0263	70	±150
	MCW0123	45	84 - 94

Tabela 3 - Marcadores microssatélites cuja amplificação por PCR foi testada em cada cromossomo

(conclusão)

Cromossomo (Tamanho)	Marcador	Localização do marcador no mapa consenso (cM)	Tamanho previsto do fragmento (pb)
15 (71 cM)	ADL0206	0	95 - 110
	LEI0120	13	275 - 315
	MCW231	31	266 - 272
	MCW0080	49	269 - 283
16 (60 cM)	LEI0258	0	±205
17 (70 cM)	ROS0020	0	100 - 160
	MCW0335	0 - 8	±135
	ADL0149	32	-
	HUJ0002	36	±125
	ADL0202	70	±245
18 (47 cM)	MYHE1	0	±145
	MCW0217	24	153 - 174
	ADL0032	38 - 53	110 - 120
	MCW0219	47	227 - 241

Maiores detalhes sobre os marcadores utilizados podem ser encontrados no site <http://www.genome.iastate.edu/chickmap/>.

3.5 Amplificação dos marcadores microssatélites por PCR

Os iniciadores encontravam-se liofilizados e foram solubilizados com T.E. (Tris – EDTA) para se obter uma concentração de 25 pmoles/ μ L na solução estoque. Para utilização na reação da PCR as soluções estoque foram divididas em alíquotas e estas foram diluídas com água ultrapura, para uma concentração de 2,5 pmoles/ μ L. As Tabelas 4 e 5 apresentam as condições de PCR para amplificação dos iniciadores e o programa utilizado nos termocicladores.

Tabela 4 - Condições da reação de PCR para amplificação dos iniciadores

Reagentes	Volume utilizado na reação de PCR (μL)
Água milli-Q	11,2-8,2
Tampão (10x)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,0
dNTP (10mM)	1,0
Primer R (2,5pmoles/μL)	1,5-3,0*
Primer F (2,5pmoles/μL)	1,5-3,0*
Taq DNA pol (5U/μL)	0,3
DNA (20 ng/μL)	5,0
Volume Total	25,0

* Dependendo do Marcador

Tabela 5 - Programa utilizado nos termocicladores para amplificação dos marcadores

Condições utilizadas para as amplificações dos marcadores	
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

A otimização das condições de PCR foi realizada individualmente para cada marcador, levando em consideração as condições do programa otimizado em trabalhos anteriores com marcadores microssatélites de *Gallus gallus*, variando apenas as temperaturas de anelamento para cada iniciador.

Depois de otimizados os marcadores, as amplificações do DNA dos animais foram realizadas em placas de 96 poços para PCR, cada placa contendo os indivíduos P, F₁ e F₂ referentes a cada família.

Depois de amplificadas, as amostras foram testadas em gel de agarose (2,0%) antes de serem colocadas no genotipador, para tentar evitar falhas na genotipagem. Para certificação do tamanho correto dos fragmentos gerados nas PCR, foi aplicado no gel de agarose o marcador de peso molecular φX174 RF DNA/ \Hae III.

3.6 Genotipagem

A primeira etapa das genotipagens baseou-se em identificar os marcadores que poderiam ser porlimórficos e informativos para o estudo nesta população. Dessa forma, realizou-se primeiramente a genotipagem dos animais P e F₁ das cinco famílias escolhidas.

Para os marcadores informativos, foram feitas as genotipagens de aproximadamente 414 animais F₂. As genotipagens foram realizadas no seqüenciador MegaBACE, com o auxílio programa *Genetic Profiler* (GE Healthcare) para a análise dos fragmentos amplificados. A reação de PCR foi realizada individualmente para cada marcador, mas para a determinação dos alelos foram misturados os produtos amplificados de 3 a 4 marcadores, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado e a fluorescência dos iniciadores, juntamente com o padrão interno (ET-ROX 400 – GE Healthcare).

3.7 Construção dos mapas de ligação

Para a construção dos mapas de ligação dos cromossomos foi utilizado o programa CRIMAP (GREEN et al., 1990), que calcula a taxa de recombinação entre marcadores e a transforma em distância de mapa em centiMorgans através da função de Kosambi. Para isso, foram utilizados os seguintes procedimentos: 1) *build*, que ordena os marcadores de acordo com a taxa de recombinação ocorrendo entre eles; 2) *twopint*, estima a taxa de recombinação entre os dois marcadores mais informativos e os demais dois a dois, fornecendo os valores de LOD como probabilidade de ocorrência de ligação; 3) *flips*, que verifica os valores de LOD enquanto vai alterando o ordenamento de cada par de marcadores, enquanto os outros permanecem fixados; e 4) *chrompic*, que mostra as fases de ligação dos marcadores alinhados no cromossomo, para cada indivíduo. Quando duplas ou triplas recombinações estavam presentes nas análises, os dados dos genótipos foram reconferidos.

A utilização do programa CRIMAP requer arquivos criados em editor de texto, com informações de pedigree e genótipos dos marcadores. Os mapas foram desenhados utilizando o programa MapChart versão 2.1 (VOORRIPS, 2002).

3.8 Análise de mapeamento de QTL

3.8.1 Análise de mapeamento de QTL por intervalo

A análise empregada no estudo de mapeamento de QTL por intervalo utilizou o método proposto por Haley et al. (1994) a partir de regressão linear e estimação de quadrados-mínimos. Para isso, foi escolhido o programa *QTL Express* (SEATON et al., 2002, QTL Express 2006) (<http://qtl.cap.ed.ac.uk>), na opção análise de F_2 . Esta análise é adequada para processar dados gerados em populações F_2 obtidas a partir de linhagens não endogâmicas, pois aplica um modelo linear aos dados fenotípicos, com efeitos fixos adicionais e covariáveis que expliquem variações para a característica avaliada (SEATON et al., 2002).

O modelo estatístico incluiu família, sexo e incubação como efeitos fixos. GP35-41, CR35-41 e EF35-41 foram analisados com modelo que incluiu também PV35 como covariável.

Foram realizadas duas análises, uma empregando apenas o modelo aditivo e outra, o modelo aditivo com dominância. Se ambos excederam os níveis significância (sugestivo, 5 ou 1% no genoma), foram conduzidas análises baseadas em teste F e graus de liberdade apropriados. Se o teste foi significativo, partiu-se então para um terceiro modelo mais completo (aditivo com dominância e *imprinting*). Os mesmo testes foram conduzidos para confrontar os dois modelos. O melhor modelo foi então utilizado para testar interação de QTL com sexo. Também foi testada a interação QTL com família para verificar se o QTL estava segregando diferentemente entre as famílias.

Para os QTL que apresentaram significância a 5% no cromossomo, foi avaliada a existência de ligação sugestiva e de significância no genoma controlando a taxa de Erro Tipo I (falso positivo). Segundo Lander e Kruglyak (1995) a ligação sugestiva, corresponde à ocorrência de, no máximo, um falso positivo em todo o genoma. Quando os cromossomos são avaliados separadamente, a probabilidade de haver um falso positivo pode ser determinada dividindo-se a extensão do cromossomo analisado pelo total da região autossômica do genoma. O valor de F referente à

significância no genoma é obtido a partir das 10.000 permutações e a probabilidade pode ser calculada seguindo a correção de Bonferroni de acordo com a equação:

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

sendo r o comprimento do cromossomo dividido pela extensão do genoma autossômico.

Segundo Churchill e Doerge (1994), o valor de F a que se refere a probabilidade encontrada é dada na relação de valores de F e probabilidades determinada a partir das 10.000 permutações.

Quando encontrado um QTL sugestivo ou significativo para uma característica, foi calculada a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL. Também foi estimado o intervalo de confiança a 95%, utilizando a técnica de *bootstrap* (KNOTT et al. 1998; VISSCHER et al. 1996) do programa *QTL Express*.

As análises foram realizadas individualmente para cada cromossomo. Apenas para o cromossomo 17 optou-se por uma análise de marcas simples porque apenas um marcador foi genotipado. Os demais marcadores posicionados neste cromossomo apresentaram problemas na amplificação por PCR ou não forma informativos.

3.8.2 Análise de marcas simples

A análise de marcas simples foi utilizada para identificação de QTL potencialmente associado a um único marcador, pois dispúnhamos de apenas um marcador para o cromossomo 17 ao término da seleção destes. Esta análise testa a hipótese nula de que a média da característica em questão é independente do genótipo do marcador. A rejeição desta hipótese leva à possibilidade de pelo menos um QTL estar ligado à marca. Foram empregadas análises de variância por quadrados mínimos para cada marcador e característica. Para isso foi utilizada a opção PROC GLM, do programa SAS (2002). O modelo estatístico considerou os efeitos fixos de família, sexo, incubação e genótipo, bem como a interação genótipo x sexo, de acordo com o seguinte modelo:

$$y_{ijklm} = m + Fi + Sj + Ik + GI + (GxS)Ii + e_{ijkm}, \text{ em que:}$$

yijklm: valor observado da característica fenotípica;
m: constante geral;
Fi: efeito de família de irmãos completos; $i = 1, \dots, 5$;
Sj: efeito de sexo; $j = 1, 2$;
lk: efeito de incubação; $k = 1, \dots, 17$;
Gl: efeito de genótipo; $l = 1, 2$;
(GxS)lj: interação genótipo e sexo;
eijklm: erro aleatório associado a cada observação

As interações genótipo x família e genótipo x incubação não foram utilizadas, pois nem todos os genótipos estão presentes nas cinco famílias e em todas as incubações. Nesta análise foram consideradas marcadores associados a QTL, aqueles que obtiveram $P < 0,10$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA

Foram extraídas amostras de DNA dos animais P e F₁, e F₂. Os DNAs de parentais e F₁ foram extraídos pelo método da Proteinase K (Anexo I). Todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (HITACHI – U2000) e tiveram a sua integridade testada em gel de agarose 1,0% (Figura 1).

Figura 1 - Amostras de DNA de P e F₁ extraídas e aplicadas em gel de agarose (1,0%) sob eletroforese. Na primeira e última canaletas, foi aplicado como padrão de concentração o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações de 100 e 200 ng, respectivamente

O DNA das aves F₂ de cada família foi extraído utilizando o reagente para lise com solução detergente de guanidina (DNAzol® - Invitrogen Life Technologies), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com modificações realizadas por Campos et al. (2003) (Anexo II). Depois de extraídas, todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (HITACHI – U2000) e sua integridade foi testada em gel de agarose 1,0% (Figuras 2).

Figura 2 - Amostras de DNA de F₂ da família 7971, extraídas e aplicadas em gel de agarose (1,0%) sob eletroforese. Na primeira e última canaletas, foi aplicado como padrão de concentração o plasmídeo pGEN4Z nas concentrações de 100 e 200 ng, respectivamente

As amostras de sangue de alguns animais apresentaram-se um pouco coaguladas, o que dificultou a extração do DNA. Para estes, foi realizado um número maior de extrações para se obter a quantidade necessária de DNA.

4.2 Seleção dos marcadores microssatélites e amplificação por PCR

A escolha dos marcadores microssatélites foi realizada em três etapas: primeiramente foram testados os marcadores doados pela *Michigan State University* através do “Chicken Genome Project”.

Dos 25 marcadores inicialmente testados e genotipados nos P e F₁, oito não amplificaram ou não foram informativos e por este motivo não foram genotipados nas famílias. No cromossomo 9 o marcador ADL0191 não produziu produto de PCR, apesar de várias tentativas de alterações na temperatura de anelamento e concentração de Mg⁺⁺ para melhorar a especificidade dos iniciadores e a atividade e fidelidade da enzima. Uma possível explicação para este iniciador não produzir produto de PCR foi o longo tempo de estocagem. Os iniciadores para amplificação dos marcadores da primeira etapa foram sintetizados em 1998 e os testes foram iniciados em 2005.

No cromossomo 10 os marcadores ADL0209 e ADL0112, no cromossomo 12 o marcador MCW0332, no cromossomo 16 o marcador LEI0258, no cromossomo 17 os marcadores MCW0335 e HUI0002 e no cromossomo 18 o marcador MCW0219, mostraram-se pouco informativos nas famílias. Para a seleção de marcadores informativos foi utilizada a classificação sugerida por Zhu et al. (2001): os marcadores foram considerados informativos quando pelo menos um dos pais F₁ foi heterozigoto e o outro teve um genótipo diferente para o loco. A Tabela 6 apresenta os 25 marcadores testados e genotipados nos P e F₁ nesta primeira etapa.

Tabela 6 - Marcadores microssatélites testados na primeira etapa

Cromossomos (Tamanho)	Marcadores Moleculares	Localização dos marcadores nos cromossomo (cM)
9 (132 cM)	ADL0191 [†]	44
	ADL0136	107
	MCW0134	132
10 (120 cM)	MCW0228	0
	ADL0209 [†]	45
	ADL0231	62
	ADL0102	88
	ADL0112 [†]	120
12 (90 cM)	ADL0372	0
	ADL0044	45
	GCT0055	65
	MCW0332 [†]	90
14 (77 cM)	ADL0200	16
	LEI0098	37
	ADL0263	70
15 (71 cM)	ADL0206	0
	LEI0120	13
	MCW0080	49
16 (60 cM)	LEI0258 [†]	0
17 (70 cM)	MCW0335 [†]	0
	HUJ0002 [†]	36
	ADL0202	70
18 (47 cM)	MYHE1	0
	MCW217	24
	MCW219 [†]	47

[†]marcadores que não amplificaram ou não foram informativos

Em uma segunda etapa, na tentativa de substituir alguns dos marcadores não utilizados nas genotipagens dos F₂, foram adicionados três marcadores, um no cromossomo 9 (MCW0017, posicionado a 72 cM no mapa consenso), um no 14 (MCW0123, posicionado à 45 cM no mapa consenso) e outro no 15 (MCW231

posicionado à 31 cM no mapa consenso). Dos três marcadores, apenas o MCW0017 não produziu produto de PCR, portanto não foi utilizado no estudo.

Na terceira etapa, mais sete marcadores foram selecionados na tentativa de melhorar a cobertura dos cromossomos. Esses marcadores foram doados pelo *Roslin Institute* da Escócia e estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Marcadores adicionados na terceira etapa

Cromossomos (Tamanho)	Marcadores Moleculares	Localização dos marcadores nos cromossomo (cM)
9 (132 cM)	ROS0078 ADL0021	0 53
10 (120 cM)	MCW0003 LEI0112 [†]	88 - 120 107
17 (70 cM)	ROS0020 [†] ADL0149 [†]	0 32
18 (47 cM)	ADL0032 [†]	47

[†] marcadores que não amplificaram ou não foram informativos

Os marcadores LEI0112 e ADL0149, não produziram produto de PCR. O marcador ROS0020 apresentou produtos de PCR não condizentes com os tamanhos de fragmentos esperados. Diferentes testes foram conduzidos na tentativa de melhorar a amplificação dos fragmentos, porém não foram obtidos melhores resultados. O marcador ADL0032 foi pouco informativo nas famílias selecionadas, portanto esses quatro marcadores não foram utilizados nas genotipagens dos indivíduos F_2 pertencentes às cinco famílias escolhidas. Esses problemas podem ter ocorrido em decorrência de contratempos de importação, porque os iniciadores ficaram mais de um mês estocados de maneira inadequada.

Essas dificuldades também podem ser parcialmente explicadas por terem sido desenvolvidos em outras populações, apresentando condições diferenciadas e até mesmo por não apresentarem o mesmo número de alelos na população estudada em relação à população onde foram desenvolvidos.

A Figura 3 ilustra eletroforese em gel de agarose 2,0% de produtos de PCR na fase de otimização das condições dos reagentes e temperatura, para cada marcador.

Figura 3 - Gel de agarose 2,0% com testes das condições de amplificação. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III

A maioria dos marcadores apresentou bandas inespecíficas nos testes iniciais, sendo necessários ajustes nas condições de PCR. Apenas o marcador ADL0206 não apresentou bandas inespecíficas, no entanto as bandas de tamanho esperado para marcador estavam muito fracas e mais testes foram conduzidos para melhorar o produto de amplificação.

Depois da otimização dos marcadores, aqueles que produziram produto de PCR foram amplificados nos animais P e F₁ para verificar se os marcadores eram informativos. As Figuras 4 e 5 são exemplos de marcadores que foram amplificados para esses animais.

Figura 4 - Gel de agarose 2,0% com material amplificado do marcador ADL0044. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III

Figura 5 - Gel de agarose 2,0% com material amplificado do marcador GCT0055. Na primeira canaleta foi aplicado o padrão de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III

Os marcadores considerados informativos foram amplificados nos animais F_2 das famílias escolhida. Algumas dessas amplificações estão representadas na Figuras 6.

Figura 6 - Gel de agarose 2,0% com material amplificado dos marcadores MCW0217, MCW0003, LEI0098 e MCW0080. Entre os marcadores, na décima canaleta, foi aplicado o padrão de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*Hae* III

4.3 Genotipagem

Após a otimização dos protocolos de amplificação por PCR, os 16 animais (parentais TT e CC e F_1) foram genotipados com o objetivo de selecionar marcadores informativos. Dos trinta e cinco marcadores selecionados e genotipados neste trabalho, nove (ADL0191, ADL0209, ADL0112, MCW0332, LEI0258, MCW0335, HUU0002, ADL0032 e MCW0219) mostraram-se pouco informativos nas famílias. Os marcadores MCW0017, LEI0112 e ADL0149 não apresentaram produto de PCR, apesar de várias tentativas de alterações nas condições de PCR. E o marcador ROS0020 apresentou produtos de tamanhos indesejados. A Tabela 8 apresenta algumas características dos marcadores que foram utilizados nas genotipagens dos animais F_2 .

O cromossomo 16 foi excluído do trabalho, pois o único marcador que dispúnhamos neste cromossomo não foi informativo em nenhuma das famílias. Além disso, o cromossomo 16 é muito pequeno e se tem pouca informação a respeito dos demais marcadores disponíveis em banco de dados e na literatura até o momento.

Tabela 8 - Características dos marcadores microssatélites genotipados nos animais F2

Crom	Marcador	Posição no mapa, cM*	Alelos observados na população	Marcação do iniciador
9	ROS0078	0	171, 191, 218	HEX
	ADL0021	53	172, 166, 176, 184	TET
	ADL0136	107	132, 142, 148, 154	HEX
	MCW0134	132	273, 283, 261	HEX
10	MCW0228	0	228, 230, 238, 240, 242, 248	FAM
	ADL0231	62	114, 118, 122, 124, 126	FAM
	ADL0102	88	96, 107, 109, 114, 120	FAM
	MCW0003	90 - 120	143, 145	TET
12	ADL0372	0	165, 169, 171,	FAM
	ADL0044	45	166, 168, 170, 172	FAM
	GCT0055	65	191, 207	FAM
14	ADL0200	16	125, 128, 131, 133, 135	FAM
	LEI0098	37	159, 161, 169	FAM
	ADL0263	70	83, 89	HEX
	MCW0123	45	133, 137, 140, 144, 146, 148	HEX
15	ADL0206	0	100, 102, 106	FAM
	LEI0120	13	278, 288, 298, 308	FAM
	MCW231	31	264, 266, 268	HEX
	MCW0080	49	275, 281, 283, 285	HEX
17	ADL0202	70	240, 248, 250	HEX
18	MYHE1	0	138, 140, 142	HEX
	MCW0217	24	155, 161	FAM

* Posição apresentada pelo mapa consenso (SCHIMID et al., 2005)

Uma tela do programa *Genetic Profiler* (GE Helthcare) utilizado para representação gráfica dos picos de fluorescência e determinação do tamanho dos fragmentos é ilustrada na Figura 7. Os picos e tamanhos dos fragmentos gerados foram conferidos manualmente. Quando os alelos encontrados nos F₂ não condiziam com os alelos dos P ou F₁, esses eram conferidos novamente e corrigidos.

Figura 7 - Imagem de uma tela do programa *Genetic Profiler* (GE Helthcare), onde cada gráfico (destacado em vermelho) representa um animal

A Figura 8 ilustra os genótipos de dois casais parentais e dois indivíduos

F_1 .

Figura 8 - Gráficos extraídos do programa *Genetic Profiler* (GE Helthcare), os picos representam os alelos de cada animal. Quando o animal apresenta um único pico, significa que ele é homozigoto para aquele marcador (tem dois alelos do mesmo tamanho). Mas quando o animal apresenta dois picos, significa que ele é heterozigoto para aquele marcador (tem alelos de tamanhos diferentes). Os dois primeiros parentais (gráficos A e B) representam os pais de um F_1 (gráfico C) e os outros dois parentais (gráficos D e E) representam os pais de um outro F_1 (gráfico F)

O programa fornece os dados em forma de tabela (Figura 9) que, depois de conferidos os picos, são copiadas e formatadas para gerar futuras tabelas para construção do mapa de ligação e para análise de mapeamento de QTL.

Figura 9 - Ilustração da tabela gerada pelo programa *Genetic Profiler* (GE Healthcare)

4.4 Construção dos mapas de ligação

Para a construção dos mapas de ligação são necessários os genótipos dos parentais, F_1 e F_2 , assim como o sexo de cada indivíduo (macho ou fêmea). Com isso, monta-se uma tabela (Figura 10) contendo o número de famílias analisadas, o número e o nome dos marcadores escolhidos, os números de cada indivíduo, o parentesco (pai e mãe), sexo e os genótipos dos indivíduos para todos os marcadores.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	5									
2	3									
3	Adl372	Adl44	Gct55							
4	família7810									
5	77									
6	5649	0	0	1						
7	165	171	168	172	191	191				
8	886	0	0	0						
9	165	165	166	166	207	207				
10	6232	0	0	1						
11	169	171	168	172	191	191				
12	332	0	0	0						
13	165	165	166	170	191	207				
14	7716	886	5649	1						
15	165	171	166	168	191	207				
16	7810	332	6232	0						
17	165	169	166	172	191	191				
18	786	7810	7716	1						
19	169	171	166	172	207	207				
20	787	7810	7716	1						
21	0	0	168	172	191	191				

Figura 10 - Ilustração de uma tabela contendo os dados de genótipo de cada indivíduo, necessário para a construção do mapa de ligação

Os dados genotípicos tabulados foram submetidos ao programa CRIMAP (GREEN et al., 1990), para confirmação de ligação, ordenamento e posicionamento dos marcadores. Os mapas obtidos para cada cromossomo, permitiram também uma análise comparativa com o mapa consenso (SCHIMID et al., 2005)

Como procedimento geral do programa CRIMAP, inicialmente foi empregada a opção *twopoint*, considerando as ligações entre pares de marcadores com valor de LOD igual a zero para, obter as taxas de recombinação dos dois marcadores mais informativos com cada um dos demais. A segunda opção empregada, *build*, ordenou os marcadores do cromossomo, utilizando como ordem inicial o par de marcadores ligados e altamente informativos. Os demais marcadores foram inseridos um a um. Os mapas obtidos indicam as taxas de recombinação encontradas entre os marcadores transformadas em distância de mapa (cM) pela função de Kosambi. Como terceiro passo foi empregada a opção *flips*, para verificar os valores de LOD quando se alternava o ordenamento de cada par de marcadores, enquanto os outros permaneceram fixos. Assim, foi possível checar se a ordem dos marcadores gerada na opção *build* foi adequada. Por último, foi empregada a opção *chrompic*, empregada para indicar as fases de ligação de cada marcador ordenado no cromossomo para cada indivíduo. Quando constatada a presença de dupla ou tripla recombinação, o genótipo foi conferido novamente no programa *Genetic Profiler* (GE Helthcare).

Todos os mapas construídos neste estudo foram denominados *Embrapa* e foram comparados aos mapas Consenso referentes a cada cromossomo. O mapa consenso publicado recentemente por Schmid et. al (2005) consiste na união de dados de três populações desenvolvidas: East Lansing (CRITTENDEN et al., 1993), Compton (BUMSTEAD; PALYGA, 1992) e Wageningen (GROENEN et al., 1998). Para a representação dos mapas foi utilizado o programa *MapChart* – Versão 2.1 (VOORRIPS, 2002).

Cromossomo 9

O mapa de ligação do cromossomo 9 (Embrapa) foi construído utilizando quatro marcadores, apresentando uma média das distâncias entre os marcadores de 30,8 cM. O tamanho deste cromossomo foi 8,5 cM menor que o consenso e a ordem dos marcadores foi a mesma. Os mapas estão representados na Figura 11.

Figura 11 - Mapas de ligação em cM do cromossomo 9 da população em estudo (Embrapa – utilizando função de Kosambi) e mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

A maior distância encontrada no mapa da Embrapa foi entre o marcador ROS0078 e o ADL0021, que foi de 59,7 cM. Esta distância não foi muito maior em

relação ao mapa consenso, 53 cM. A menor distância, de 26,1 cM, pôde ser observada entre os marcadores ADL00136 e MCW0134, diferindo apenas 1,1 cM do mapa consenso (25 cM).

O baixo número de meioses informativas com fase conhecida (Tabela 9) para os marcadores ROS0078 e ADL0134 pode ter impossibilitado a inferência da origem parental do alelo e os intervalos relativamente grandes entre os marcadores podem ter ocasionado a diferença entre os mapas.

Cromossomo 10

O mapa de ligação do cromossomo 10 apresentou 138,9 cM, proporcionando uma distância média entre os marcadores de 34,7 cM. Os quatro marcadores genotipados para esse cromossomo foram posicionados na mesma ordem do mapa consenso (Figura 12). Diferenças maiores de posição foram encontradas entre os marcadores ADL0231 e ADL0102, 53,1 cM no mapa da Embrapa, enquanto que no mapa consenso foi de 26,0 cM.

Figura 12 - Mapas de ligação em cM do cromossomo 10 da população em estudo (Embrapa – utilizando função de Kosambi) e mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

O marcador MCW0003 não está fixado no mapa consenso e encontra-se entre 92 e 118 cM. No presente estudo, este marcador foi posicionado à 138,9 cM, apresentando uma relativa diferença em relação ao mapa consenso. O baixo número de meioses com fase conhecida desse marcador pode justificar a diferença no posicionamento entre os dois mapas. O número de meioses informativas total e de fase conhecida pode ser observado na Tabela 9.

Cromossomo 12

A Figura 13 apresenta o mapa de ligação do cromossomo 12. Três marcadores posicionados a 0, 57,1 e 86,2 cM foram utilizados para construir o mapa. Os últimos dois marcadores posicionados no mapa Embrapa, não estão fixados no mapa consenso (Figura 13), porém todos foram posicionados na mesma ordem do mapa consenso.

Figura 13 - Mapas de ligação em cM do cromossomo 12 da população em estudo (Embrapa – utilizando função de Kosambi) e mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

O número de meioses informativas com fase conhecida dos marcadores ADL0372 e GCT0055 foram menores em relação ao marcador ADL0044 (Tabela 9), e o marcador GCT0055 foi um dos que apresentou menor número de meioses informativas com fase conhecida de todos os marcadores utilizados neste estudo. Como mencionado anteriormente, a pouca informação gerada por alguns marcadores pode ser responsável pelas diferenças encontradas entre os mapas, dentre outros fatores.

Cromossomo 14

O mapa de ligação do cromossomo 14 é um mapa parcial, abrangendo aproximadamente 56 cM do mapa consenso (Figura 14). O marcador ADL0200 posicionado a 0 cM no mapa EMBRAPA, encontra-se a 16 cM no mapa consenso. O último marcador do mapa EMBRAPA, posicionado a 55,5 cM, encontra-se a 72 cM no mapa consenso. No entanto, considerando-se as distâncias entre os marcadores ADL0200 e ADL0263, ambos os mapas apresentaram extensões semelhantes.

Figura 14 - Mapas de ligação em cM do cromossomo 14 da população em estudo (Embrapa – utilizando função de Kosambi) e mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

A distância entre os marcadores também não variou muito em relação ao consenso. Os marcadores que apresentaram maior distância comparando os mapas foram o ADL0200 e o LEI0098, 12,1 e 21 cM nos mapas EMBRAPA e consenso, respectivamente. O alto grau de informação gerado pelos marcadores resultou em um bom número de meioses informativas com fase conhecida (Tabela 9).

Cromossomo 15

O mapa de ligação do cromossomo 15 (Figura 15) foi construído utilizando quatro marcadores, apresentando uma média das distâncias entre os marcadores de 15,4 cM. Apresentou-se apenas 9,3 cM menor que o mapa consenso e a ordem dos marcadores foi a mesma. O mapa não abrangeu a extensão total do mapa consenso. O marcador MCW0080 é o ultimo marcador posicionado no mapa EMBRAPA (61,7 cM), no entanto esse marcador encontra-se a 49 cM no mapa consenso. Faltaram os 22 cM finais do mapa consenso, que tem como último marcador o ACW0169 a 71 cM.

Figura 15 - Mapas de ligação em cM do cromossomo 15 da população em estudo (Embrapa – utilizando função de Kosambi) e mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

A maior diferença encontrada entre os dois mapas, considerando-se apenas os quatro marcadores, foi na distância entre os marcadores MCW0231 e MCW0080. No entanto, não passou de 10,5 cM, sendo apenas 3,6 cM maior que a distância encontrada entre os marcadores LEI0120 e MCW0231. Todos os marcadores apresentaram um alto grau de informação, resultando em um bom número de meioses informativas com fase conhecida (Tabela 9). O alto grau de informação dos marcadores indica que as distâncias geradas são satisfatórias para o mapa gerado da população referência.

Cromossomo 18

O mapa consenso do cromossomo 18 apresenta uma extensão de 47 cM, com 7 marcadores. Destes, o MYHE e MCW0217 posicionados a 0 e 24 cM respectivamente, foram utilizados para construir um grupo de ligação neste estudo. Os marcadores foram posicionados na mesma ordem do mapa consenso, porém com uma ligeira diferença na distância entre eles. O marcador MYHE foi posicionado a 0 cM e o marcador MCW0217 foi posicionado a 21,1 cM (Figura 16).

Devido a pouca informação gerada pelos marcadores ADL0032 e MCW0219 nesta população, optou-se por não utilizá-los nas genotipagens. Logo, não foi possível cobrir toda a extensão do cromossomo 18.

Figura 16 - Mapas de ligação em cM do cromossomo 18 da população em estudo (Embrapa – utilizando função de Kosambi) e mapa consenso (SCHMID et al., 2005)

Apesar do marcador MCW0217 apresentar apenas dois alelos, mostrados na Tabela 8, este obteve um bom número de meioses informativas com fase conhecida (Tabela 9). Logo, foi possível obter um bom resultado no posicionamento dos dois marcadores.

De modo geral podemos concluir que os marcadores apresentaram-se nas mesmas posições no mapa EMBRAPA e consenso, não havendo qualquer inversão de marcadores em nenhum cromossomo.

As distâncias entre os marcadores, em cada cromossomo, variaram em relação ao mapa consenso. Isso pode ser explicado por alguns fatores como diversidade das populações envolvidas, pela diferença no número total de animais envolvidos ou pela pouca informação gerada por alguns marcadores.

Os mapas apresentados neste estudo são inéditos para a população desenvolvida pela Embrapa e foram utilizados no estudo de mapeamento de QTL apresentado a seguir.

Tabela 14 - Número de meioses total e com fase conhecida dos marcadores genotipados nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15 e 18

Cromossomo	Marcadores	nº de meioses total	nº de meioses com fase conhecida
9	ROS0078	808	0
	ADL0021	512	512
	ADL0136	796	308
	ADL0134	135	135
10	MCW0228	778	778
	ADL0231	567	567
	ADL0102	618	618
	MCW003	709	89
12	ADL0372	711	207
	ADL0044	760	482
	GCT0055	564	68
14	ADL0200	311	311
	LEI0098	408	408
	MCW0123	382	244
	ADL0263	768	768
15	ADL0206	693	229
	LEI0120	626	452
	MCW0231	544	382
	MCW0080	697	559
18	MYHE	646	476
	MCW0217	408	408

4.5 Análise de Mapeamento de QTL

As análises foram realizadas individualmente para cada cromossomo. Apenas para o cromossomo 17 não foi utilizado o método de mapeamento de QTL por intervalos que emprega regressão linear e estimação de quadrados-mínimos. Em decorrência dos problemas relatados anteriormente com alguns marcadores posicionados neste cromossomo, apenas um pôde ser utilizado. Logo, optou-se por uma análise de marcas simples.

Na Tabela 15, encontra-se o resumo da análise de marca simples para o marcador ADL0202 e as características PN, PV35, PV41, GP35-41, CR35-41 e EF35-41. Nesta análise considerou-se a associação do marcador a característica quando a probabilidade de erro do tipo I foi menor que 0,10 ($P < 0,10$).

Tabela 15 – Resumo da análise de marcas simples para o marcador ADL0202 do cromossomo 17 e características de desempenho, considerando-se os valores de probabilidade para os efeitos de genótipo e interações genótipo x sexo

Característica	Genótipo	Genótipo x Sexo
PN	ns	ns
PV35	ns	ns
PV41	ns	ns
GP35-41	*	ns
CR35-41	ns	ns
EF35-41	**	ns

** P<0,01; * P<0,05; † P<0,10; ns: não significativo

Houve efeito significativo do genótipo para GP35-41 e altamente significativo para EF35-41. Os valores da probabilidade para os efeitos de genótipo do GP35-41 e EF35-41 foram: 0,0139 e 0,0021, respectivamente.

Poucos trabalhos de mapeamento por intervalo identificaram QTL no cromossomo 17. Dos cinco QTL mapeados neste cromossomo, três estão posicionados próximos a região onde se encontra o marcador ADL0202 (~70 cM). Os QTL encontrados foram associados a peso da bursa ajustado para peso corporal (PARK et al., 2006), gordura abdominal ajustada para peso corporal (ZHOU et al., 2006b) e peso vivo aos 239 dias de idade (SASAKI et al., 2004). No entanto, nenhum destes estudos investigaram associação de QTL a características de ganho de peso e eficiência alimentar no cromossomo 17.

Apesar da análise de marca simples apresentar a limitação de confundir o efeito com a posição do QTL, as associações encontradas entre o genótipo do marcador ADL0202 e as características de GP35-41 e EF35-41 são relevantes e devem ser investigadas. Para isso, um passo seguinte seria identificar novos marcadores informativos próximos ao marcador utilizado, possibilitando uma análise de mapeamento por intervalo, para validação, identificação do efeito e da posição de possíveis QTL.

Os resultados das análises de mapeamento de QTL dos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15 e 18 são apresentados na Tabela 16, juntamente com os valores críticos de F para ligação sugestiva e significância a 5% no cromossomo e no genoma. Foi considerada a contribuição relativa de cada cromossomo individualmente, estimado a partir das permutações.

Tabela 16 - Valores do teste F obtidos nas análises e os valores críticos de F para significância 5% no cromossomo, ligação sugestiva e significância 5% no genoma

Característica ¹	Valores de F modelo "a" "(a+d)" ²			
	Análise	5% cromo	Sugestivo	5% genoma
Cromossomo 9				
PN	5,88 (3,31)	6,36 (4,61)	7,19 (5,05)	12,54 (8,25)
PV35	1,46 (1,77)	6,36 (4,57)	7,01 (4,97)	12,92 (8,46)
PV41	2,61 (2,64)	6,37 (4,71)	7,12 (5,15)	12,64 (8,34)
GP35-41	3,08 (1,73)	6,28 (4,69)	7,15 (5,14)	12,40 (7,89)
CR35-41	2,14 (1,13)	6,33 (4,59)	7,07 (5,00)	13,22 (8,24)
EF35-41	2,23 (1,13)	6,29 (4,63)	7,08 (5,02)	12,88 (8,02)
Cromossomo 10				
PN	4,94 (3,09)	6,50 (4,17)	7,11 (5,13)	12,17 (8,30)
PV35	8,66 [†] (4,53)	6,30 (4,84)	6,99 (5,25)	12,75 (8,30)
PV41	11,74 [†] (6,31 [†])	6,45 (4,72)	7,16 (5,12)	13,28 (8,27)
GP35-41	7,29 [†] (5,35 [†])	6,39 (4,79)	7,04 (5,14)	12,02 (8,34)
CR35-41	1,40 (0,71)	6,42 (4,80)	7,13 (5,15)	13,12 (7,84)
EF35-41	6,33 (3,03 [†])	6,27 (2,13)	6,94 (2,24)	12,72 (3,14)
Cromossomo 12				
PN	2,31 (2,25)	5,92 (4,41)	7,52 (5,41)	13,25 (9,32)
PV35	2,96 (2,17)	5,90 (4,38)	7,54 (5,30)	13,58 (8,55)
PV41	3,41 (1,85)	5,92 (4,51)	7,62 (5,42)	12,75 (8,27)
GP35-41	0,87 (2,11)	5,68 (4,39)	7,26 (5,45)	13,35 (8,52)
CR35-41	3,43 (3,31)	5,95 (4,41)	7,73 (5,32)	14,14 (8,44)
EF35-41	5,14 (3,20)	5,84 (4,39)	7,52 (5,30)	12,65 (8,27)
Cromossomo 14				
PN	0,76 (0,87)	5,82 (4,29)	7,89 (5,50)	13,01 (8,97)
PV35	0,48 (2,90)	5,70 (4,30)	7,73 (5,41)	12,20 (9,11)
PV41	1,43 (2,96)	5,77 (4,33)	7,65 (5,40)	13,54 (8,27)
GP35-41	4,21 (4,02)	5,71 (4,32)	7,77 (5,54)	14,19 (9,02)
CR35-41	0,66 (1,68)	5,62 (4,23)	7,72 (5,27)	14,21 (8,05)
EF35-41	3,67 (2,23)	5,71 (4,29)	7,66 (5,39)	14,00 (8,51)
Cromossomo 15				
PN	4,85 (2,55)	5,97 (4,46)	7,48 (5,39)	12,89 (8,25)
PV35	2,13 (1,12)	5,98 (4,37)	7,62 (5,46)	13,45 (8,82)
PV41	2,68 (1,40)	6,03 (4,45)	7,72 (5,51)	13,79 (9,15)
GP35-41	1,74 (0,94)	5,96 (4,46)	7,82 (5,38)	13,85 (8,91)
CR35-41	0,39 (0,72)	6,07 (4,43)	7,68 (5,34)	14,09 (8,69)
EF35-41	2,01 (1,03)	6,15 (4,56)	7,74 (5,59)	13,13 (9,04)
Cromossomo 18				
PN	1,16 (1,18)	4,84 (3,62)	7,58 (5,27)	14,02 (8,50)
PV35	5,02 [§] (2,68)	4,81 (3,66)	8,05 (5,43)	13,54 (8,10)
PV41	3,38 (2,04)	4,81 (3,59)	7,83 (5,34)	13,52 (7,93)
GP35-41	2,19 (2,58)	4,76 (3,69)	7,97 (5,34)	13,63 (8,02)
CR35-41	2,55 (1,86)	4,74 (3,67)	7,75 (5,38)	12,87 (8,38)
EF35-41	0,59 (0,83)	4,47 (3,65)	7,86 (5,56)	13,31 (8,50)

[†]QTL sugestivo, [§]QTL significativo a 5% cromossomo

¹ PN=peso ao nascer; PV35=peso vivo aos 35 dias; PV41=peso vivo aos 41 dias; GP35-41=ganho de peso dos 35 aos 41 dias; CR35-41=consumo de ração dos 35 aos 41 dias; EF=eficiência alimentar dos 35-41 dias

² Valores de F para os modelos aditivo="a", modelo aditivo com dominância="(a+d)"

No cromossomo 10 foram mapeados quatro QTL sugestivos: para PV35, PV41, GP35-41 e um QTL inédito para EF35-41 (Figuras 17 e 18). No cromossomo 18 foi mapeado um QTL significativo a 5% no cromossomo para PV35 (Figura 19). As interações dos efeitos dos QTL que excederam o limiar de ligação sugestiva com família e sexo foram testadas. Decidiu-se pela análise completa mesmo para os QTLs sugestivos porque, de 10 ligações sugestivas, nove são QTLs. O critério sugestivo nos leva a encontrar apenas um falso positivo a cada varredura completa do genoma (LANDER; KRUGLYAK, 1995). No presente estudo não foram mapeados QTL nos cromossomos 9, 12, 14 e 15.

Figura 17 - Valores de F para as características PV35, PV41 E GP35-41, obtidos na análise de mapeamento de QTL a partir do modelo de F2 no cromossomo 10. As setas indicam a localização dos marcadores utilizados

Figura 18 - Valores de F para a característica EF35-41, obtidos na análise de mapeamento de QTL a partir do modelo de F2 no cromossomo 10. As setas indicam a localização dos marcadores utilizados

Figura 19 - Valores de F para a característica PV35, obtidos na análise de mapeamento de QTL a partir do modelo de F2 no cromossomo 18. As setas indicam a localização dos marcadores utilizados

Os QTL mapeados no cromossomo 10 para PV35 e PV41 encontram-se no intervalo entre os marcadores ADL0102 e MCW0003, a aproximadamente 138 cM, com um intervalo de confiança de 16,5 - 138 cM e 59 - 138 cM respectivamente. Para GP35-41 e EF35-41 encontram-se no intervalo entre os marcadores ADL0231 e ADL0102, a aproximadamente 78 cM, com intervalo de confiança de 0 – 138 cM. No

cromossomo 18 o QTL mapeado encontra-se a 21 cM, próximo ao marcador MCW0217. Os QTLs mapeados no cromossomo 10 apresentaram intervalos de confiança que se sobrepuseram. Este fato associado ao tamanho dos intervalos que englobaram grande parte do comprimento deste cromossomo pode ser explicado pela metodologia de estimação dos intervalos de confiança baseada em *bootstrap* com reamostragem.

Para PV35 no cromossomo 10, apenas a análise empregando o modelo aditivo apresentou QTL sugestivo. Assim, a partir desse modelo foram testadas as interações QTL com sexo, QTL com família, calculado o intervalo de confiança deste QTL e a porcentagem da variância fenotípica explicada por ele. As interações dos efeitos do QTL x sexo e do QTL x família não foram significativas.

Para PV41 e GP35-41, ambos os modelos: aditivo e aditivo com dominância, apresentaram QTL sugestivos. Porém quando confrontados, o efeito de dominância não foi significativo. Dessa forma, o modelo aditivo foi utilizado para testar as interações QTL com sexo e QTL com família, para o cálculo do intervalo de confiança e da porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL. As interações dos efeitos do QTL x sexo e do QTL x família não foram significativas.

Os efeitos aditivos, a posição e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelos QTL mapeados, estão apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Efeitos aditivos dos QTL mapeados

Cromossomo	Característica ¹	Posição em cM ²	Efeito Aditivo (EP) ³	Efeito de Dominância (EP) ³	% variância fenotípica
10	PV35 [†]	138	20,35 (6,91)	-	1,99
10	PV41 [†]	138	30,87 (9,01)	-	2,76
10	GP35-41 [†]	83	13,09 (4,95)	-	1,64
18	PV35 [§]	21	20,17 (9,00)	-	1,05

[†]QTL sugestivo, [§]QTL significativo a 5% cromossomo

¹PV35=peso vivo aos 35 dias; PV41=peso vivo aos 41 dias; GP35-41=ganho de peso dos 35 aos 41 dias

²posição do QTL em relação ao primeiro marcador do mapa da EMBRAPA

³EP= erro padrão

Já o QTL sugestivo para EF35-41 apresentou efeito de dominância. O efeito de dominância positivo indica que os indivíduos F₂ heterozigotos para o QTL

tiveram uma média maior para essa característica do que a média dos indivíduos homozigotos. Então foi testado o modelo incluindo imprinting ($a + d + i$), porém não foi significativo no teste F. Assim, o modelo aditivo com dominância foi utilizado para testar as interações QTL com sexo e QTL com família. Foi encontrada interação QTL x família. Três famílias apresentaram efeito de dominância negativo. A presença dessa interação significativa indica que o QTL pode estar segregando em alguma(s) família(s) e não em outra(s) e um próximo passo seria conduzir uma análise com modelo de meio-irmãos (*half-sib analysis*). A eficiência alimentar é uma característica bastante importante para a indústria avícola, pois a alimentação representa uma fração importante dos custos de produção do frango de corte. O intervalo de confiança e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL, foram calculados utilizando o modelo $a + d$ com interação do QTL com família (Tabela 18).

Tabela 18 - Efeito de dominância de cada família para EF35-41[†] no cromossomo 10

Cromossomo	Famílias	Posição em cM ¹	Efeito Aditivo (EP) ²	Efeito de Dominância (EP) ²	% variância fenotípica
10	1	74	0,04 (0,01)	-0,02 (0,05)	7,14
	2		0,01 (0,01)	-0,01 (0,03)	
	3		0,03 (0,01)	0,07 (0,02)	
	4		-0,01 (0,01)	-0,05 (0,03)	
	5		0,01 (0,01)	0,05 (0,02)	

[†]QTL sugestivo

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

²EP= erro padrão

Pelo fato de ser uma característica difícil de ser selecionada por métodos tradicionais, essa região associada ao QTL deve ser investigada mais detalhadamente, com o objetivo de identificar possíveis genes que possam estar influenciando a eficiência alimentar.

O efeito aditivo positivo indica que os alelos que contribuem para elevar os valores da característica foram provenientes da linhagem de corte. Os dados condizem com o esperado, pois a linhagem TT é uma linha macho, cuja seleção foi efetuada dentro de linha desde 1985, com o objetivo de melhorar o peso corporal, eficiência alimentar, rendimento de carcaça e partes, viabilidade, fertilidade e eclodibilidade; e

reduzir a gordura abdominal e doenças metabólicas. Na época em que a população referência foi formada a linhagem TT havia sido selecionada para estas características por seis gerações. Já a linhagem CC 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 reduzir o peso corporal (Nones, 2004).

As características de desempenho apresentam um papel importante na avicultura. No entanto, pode-se dizer que essas características não são controladas por regiões (grupos de genes) localizados em um único cromossomo. Um estudo publicado recentemente por Nones et al. (2006), utilizando a mesma população EMBRAPA, mapeou QTL sugestivos e significativos para peso vivo, ganho de peso, consumo de ração e eficiência alimentar no cromossomo 1 da galinha. Nos cromossomos 2 e 4 foram mapeados QTL para peso ao nascer e peso vivo (Baron, 2004). E nos cromossomos 3 e 5 foram mapeados QTL para peso vivo, ganho de peso e consumo de ração (Ruy, 2004). Assim, torna-se importante o estudo de todo o genoma.

Muitos estudos já mapearam QTL para desempenho, como peso vivo e consumo de ração, em vários cromossomos. Em uma revisão Abasht et al. (2006), apresentaram um consenso dos QTL já mapeados para mesmas características nas mesmas posições em diferentes estudos. Segundo esses autores, aproximadamente 177 QTL já foram mapeados para peso vivo, distribuídos em quase todos os cromossomos. E cerca de três QTL já foram mapeados para consumo de ração nos cromossomos 1, 2 e 4.

No entanto, apenas dois estudos mapearam QTL para características de peso vivo no cromossomo 10. Jennen et al. (2004), mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 10 semanas entre os marcadores MCW0194 e ADL0038, a aproximadamente 50 cM no mapa consenso. Para o estudo, foi utilizado um cruzamento entre duas linhagens de fêmeas de corte geneticamente diferentes originadas da raça *White Plymouth Rock*. A análise de mapeamento foi conduzida empregando o modelo F_2 , a partir da genotipagem de 11 marcadores e cerca de 456 animais. A posição deste QTL mapeado difere das posições mapeadas no presente estudo, sugerindo que outras regiões podem conter genes influenciando o peso vivo.

Zhou et al. (2006) também mapearam QTL no cromossomo 10 para peso vivo às 2 e 4 semanas de idade e para média de ganho de peso diário até a semana 2. Esses QTL foram mapeados entre 18 e 21 cM, entre os marcadores MCW0228 e MCW0194, diferindo também do presente estudo. Para essa análise os autores utilizaram 8 marcadores e 742 animais.

Nos cromossomos 9, 12, 14, 15, 17 e 18 também já foram mapeados QTL para características de peso vivo. No cromossomo 9, Sewalen et al. (2002) mapearam QTL sugestivos para peso vivo a 3, 6 e 9 semanas entre os marcadores ROS0078 e MCW0315, utilizando o cruzamento de uma linha macho de corte e com uma linha fêmea (*White Leghorn*) de postura, com aproximadamente 500 animais e 4 marcadores. Siwek et al. (2004), utilizando 672 animais F_2 de uma população originada do cruzamento entre duas linhagens divergentes para alta e baixa resposta a anticorpos de hemácias ovinas, mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 4 semanas entre os marcadores GCT0016 e ABR0018. Zhou et al. (2006) mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 6 e 8 semanas e para média de ganho de peso diários da 4ª a 6ª semana, utilizando 9 marcadores. Os QTL mapeados por estes autores encontram-se entre 157 e 165 cM. Esses mesmos autores mapearam QTL sugestivo, também no cromossomo 14, para peso vivo às 2 e 4 semanas; para média de ganho de peso diário de 0 a 2 semanas, da 4ª até a 6ª semana e da 6ª até a 8ª semana. Esses QTL foram mapeados entre 13 e 95 cM, utilizando 5 marcadores. E no cromossomo 18, esses autores mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 8 semanas e para média de ganho de peso diário entre a 4ª e a 6ª semanas.

No cromossomo 12, um estudo conduzido por Kerje et al. (2003), utilizou uma população experimental gerada a partir do cruzamento entre as raças *White Leghorn* e *Red Junglefowl*. Um QTL significativos a 5% no genoma para peso vivo aos 112 dias de idade, posicionado a 65 cM, e outro significativo a 20% no genoma para peso vivo aos 46 dias de idade, a 59 cM, foram mapeados utilizando 851 animais e 2 marcadores (ADL0044 a 0 cM e ABR372 a 66 cM).

Ainda no cromossomo 12, Schreiwess et al. (2005) mapearam um QTL sugestivo para peso vivo às 55 semanas, a 58 cM entre os marcadores ADL0044 e GCT0055. Uma linhagem de postura (*White Leghorn*) e outra de corte (*Cobb-Cobb*) foi

cruzada para gerar 508 animais F₂, genotipados para 4 marcadores nesse cromossomo.

Jennen et al. (2004), utilizando um cruzamento entre duas linhagens de fêmeas de corte geneticamente diferentes originadas da raça *White Plymouth Rock*, mapearam QTL sugestivo no cromossomo 14 para peso vivo às 7 semanas entre os marcadores ADL0200 e LEI0098 (36 cM), usando 6 marcadores para genotipar 456 animais F₂. Jennen et al. (2005) apresentaram outro estudo onde mapearam QTL sugestivo para peso vivo às 5 semanas no cromossomo 15. Neste estudo foram utilizados 1006 animais e 3 marcadores. O QTL mapeado encontra-se entre os marcadores LEI0120 e MCW0052, a 19 cM.

No cromossomo 17, apenas Sasaki et al. (2004) mapearam QTL sugestivo para peso vivo aos 239 dias de idade, próximo ao marcador MCW0151 a 30 cM. Esses autores utilizaram 2 marcadores, ADL0149 e MCW0151, genotipados em 265 fêmeas obtidas a partir do cruzamento de machos White Leghorn (linhagem selecionada durante 14 geração para redução de deformações não destrutivas dos ovos) com fêmeas Rhode Island Red.

Vários fatores podem afetar o poder de detecção de um QTL como, por exemplo, o tamanho da amostra, que pode ser manipulada para aumentar o poder de detecção do QTL. Experimentos com maior tamanho de amostra podem detectar locos de menores efeitos genéticos do que aqueles com menor tamanho de amostra (LANDER; BOTSTEIN, 1998). Outro fator, o número de marcadores utilizados, é importante para se obter ligação verdadeira entre o marcador e o QTL. Segundo Hillel (1997), quanto mais marcadores regularmente espaçados forem utilizados no mapeamento de QTL, maior a probabilidade de identificação de ligações verdadeiras. Assim uma tentativa de aumentar o poder de detecção de QTL nesse estudo, seria aumentar o número de famílias e diminuir o espaçamento entre os marcadores nos cromossomos. No entanto o grau de informação dos marcadores também é muito importante e influencia na detecção de QTL e os marcadores utilizados neste estudo foram bastante informativos. Logo há a possibilidade de não haver QTL nos cromossomos 9, 12, 14 e 15 para as características analisadas nos indivíduos F₂ com 41 dias de idade. O delineamento experimental também é um fator importante e difere

muito entre os estudos. Vários estudos citados utilizaram diferentes delineamentos e os animais foram avaliados em idades diferentes, alguns em idades muito avançadas e alguns dos QTLs mapeados em outros estudos não teriam como ser detectados até os 41 dias de idade.

5 CONCLUSÕES

- Os mapas de ligação construídos para os cromossomos 9, 10, 12, 14, 15 e 18 para a população da EMBRAPA, apresentaram o mesmo ordenamento dos marcadores do mapa consenso, porém com pequenas diferenças nos distanciamentos entre eles.
- Foram mapeados QTL sugestivos para PV35 e PV41 no cromossomo 10, na posição de 138 cM.
- Foram mapeados QTL sugestivos para GP35-41 e EF35-41 no cromossomo 10, nas posições de 83 e 74 cM, respectivamente.
- O QTL sugestivo mapeado para EF35-41 no cromossomo 10, não havia sido descrito da literatura anteriormente. É um QTL importante, pois está associado a uma característica de grande relevância econômica para a indústria avícola.

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, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO. **Relatório Anual 2005**. São Paulo, 2006. 54 p.

BARON, E.E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. 2004. 116 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BOVENHUIS, H.; VAN AENDONK, J.A.M.; DAVIS, G.; ELSEN, J.M.; HALEY, C.S.; HILL, W.G.; BARET, P.V.; HETZEL, D.J.S.; NICHOLAS, F.W. Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 52, p. 135-144, 1997.

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

BURT, D.W. Chicken genome: Current status and future opportunities. **Genome Research**, Woodbury, v. 15, p. 1692-1698, 2005.

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.

CHENG, H.H. Mapping the chicken genome. **Poultry Science**, Ithaca, v. 76, p. 1101-1107, 1997.

CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, Bethesda, v. 138, p. 963-971, 1994.

COELHO, A.S.G.; SILVA, H.D. **Construção de mapas genéticos e mapeamento de QTLs**. Piracicaba: ESALQ, 2002. 66p.

CRITTENDEN; L.B., PROVENCHER; L., SANTANGELO; L., LEVIN; I., ABPLANALP; H., BRILES; R.W., BRILES; W.E., DODGSON; J.B. Characterization of a Red Jungle Fowl by White Leghorn backcross reference population for molecular mapping of the chicken genome. **Poultry Science**, Ithaca, v. 72, p. 334-348, 1993.

CROOIJMANS, R. **Gene hunting**: molecular analysis of the chicken genome. Wageningen, 2000. 150 p. Thesis (Ph.D.) – Wageningen University, 2000.

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.

DE KONING, D.J.; BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J.A.M. On the detection of imprinted quantitative trait loci in experimental crosses of outbred species. **Genetics**, Bethesda, v. 161, p. 931-938, 2002.

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

DODGSON, J.B.; CHENG, H.H.; OKIMOTO, R. DNA marker technology: a revolution in animal genetics. **Poultry Science**, Ithaca, v. 76, p. 1108-1114, 1997.

FIGUEIREDO, E.A.P.; ROSA, P.S.; SCHEUERMANN, G.N.; JAENISCH, F.R.F.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.; BRENTANO, L.; COSTA, C.A.F. Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOC. LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., **Proceedings...** Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS, 2003a. 1 CD-ROM.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C.; AVILA, V.S.; BRUM, P.A.R.; FIORENTIN, L.; JAENISCH, F.R.F. Genetic gain in egg production and egg weight in White Leghorn Embrapa 011. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9.; REUNIÃO DA ASSOC. LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., **Proceedings...** Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS, 2003b. 1 CD-ROM.

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

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.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares, **Genetics**, Bethesda, v. 136, p. 1195-1207, 1994.

HOCKING, P.M. Review of QTL mapping results in chickens. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 61, p. 215-226, 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**, Oxford, 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, 2004.

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**, Oxford, v. 34. p. 264-274, 2003.

KNOTT, S.A.; MARKLUND, L.; HALEY, C.A.S.; ANDERSSON, K.; DAVIES, W.; ELLEGREN, H.; FREDHOLM, M.; HANSSON, I.; HOYHEIM, B.; LUNDSTROM, K.; MOLLER, M.; ANDERSSON, L. Multiple marker of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. **Genetics**, Bethesda, v. 149, p. 1069-1080, 1998.

JENNEN, D.G.J.; 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, R.M.; 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.

LANDER, E.S.; 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 CIENCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, **Anais...**Campinas: FACTA, 2003. p. 87-105.

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

LYNCH, M.; WALSH, B. **Genetics and analysis of quantitative traits**. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 980p.

McELROY, J.P.; KIM, J.-J.; HARRY, D.E.; BROWN, S.R.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Identification of Trait Loci Affecting White Meat Percentage and Other Growth and Carcass Traits in Commercial Broiler Chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, p. 593-605, 2006.

MOURA, A. S. A. M. T.; BOSCHIERO, C.; CAMPOS, R. L. R.; AMBO, M.; NONES, K.; LEDUR, M. C.; ROSARIO, M. F.; MELO, C. M. R.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Mapping QTL for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006. **Proceedings...**Belo Horizonte: WCGALP, 2006. p. 22-50.

NONES, K. **Mapeamento de QTLs no cromossomo 1 e *Gallus gallus* que influenciam características de desempenho e carcaça**. 2004. 110 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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**, Oxford, 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. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 25, p. 216-223, 2006.

RUY, D.C. **Mapeamento de QTL para desempenho e características de carcaça, nos cromossomos 3 e 5 de *Gallus gallus***. 2004. 122 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SAS INSTITUTE INC. System for microsoft windows, Release 8.2, Cary, NC, USA, 2002.

SASAKI, O.; ODAWARA, S.; TAKAHASHI, H.; NIRASAWA, K.; OVAMADA, 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 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.; CROOIJMANS, R. P.; 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, n. 4, 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.

SEWALEM, A.; MORRICE, D. M.; LAW, A.; WINDSOR, D.; HALEY, C. S.; IKEOBI, C. O. N.; 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.

SIEGEL, P. B.; DODGSON, J. B.; ANDERSSON, L. Progress from Chicken Genetics to the Chicken Genome. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, p. 2050-2060, 2006.

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.

VALLEJO, R.L.; CHENG, H.H. Conducting a QTL search in poultry – current status and future prospects. In: ANNUAL NATIONAL BREEDERS ROUNDTABLE, 46., St. Louis. **Proceedings**. p. 124, 1997.

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, 1999.

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.

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 Association, In: POULTRY SCIENCE ANNUAL MEETING, 89., Montreal. **Abstracts**. v. 79, Sup. 1, p. 61, abstract 263, 2000.

ZHOU, J.; DEEB, N.; ASHWELL, C. M.; LAMONT, S. J. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. I. Growth and average daily gain. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, p. 1700-1711, 2006a.

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

ANEXOS

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

AMOSTRAS:

DATA:

- 1) Em **50 µL** de **sangue** adicionar **1 mL** 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 **500 µL** 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**