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

**Identificação de polimorfismos em genes candidatos associados
com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento
muscular e qualidade de carne em *Gallus gallus***

Andrezza Maria Felício

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor
em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal
e Pastagens

**Piracicaba
2012**

Andrezza Maria Felício
Zootecnista

Identificação de polimorfismos em genes candidatos associados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em *Gallus gallus*

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Ciência Animal e Pastagens

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Felício, Andrezza Maria

Identificação de polimorfismos em genes candidatos associados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em *Gallus gallus* / Andrezza Maria Felício. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.

96 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Crescimento animal 2. Frangos de corte 3. Genômica 4. Maciez 5. Polimorfismo
I. Título

CDD 636.513
F314i

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

Aos meus pais **Edna e José Carlos**,

Obrigada por serem exemplos de vida e perseverança. Obrigada por depositarem confiança em meus sonhos e por todo amor que me oferecem, permitindo-me ultrapassar barreiras, medos e dúvidas.

DEDICO

Ao meu marido, **Marcos Aurélio**,
pela incansável paciência, pela força nos momentos difíceis, por acreditar em mim, e por todo amor que sempre recebi. Muito obrigada.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Deus**, por permanecer o tempo todo ao meu lado e pelo simples fato de existir.
À **Maria Santíssima**, sem a qual não haveria vitória. Obrigada por passar hoje e sempre na minha frente.

AGRADECIMENTOS

Ao professor e orientador Dr. Luiz Lehmann Coutinho pela orientação, pelo apoio, pela oportunidade e pela confiança de realizar este trabalho. E pelas valiosas contribuições ao meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Ao co-orientador professor Dr. Júlio Cesar Carvalho Balieiro, pelos ensinamentos, paciência, incentivos constantes e pela intensa colaboração na condução das análises estatísticas. Não poderia deixar de agradecer pelas vezes que fiz você se deslocar de Pirassununga à Piracicaba.

À grande amiga, companheira e co-orientadora Clarissa Boschiero (AleciaII), pela enorme contribuição, aprendizado e paciência...ajuda indispensável na execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que proporcionou não somente minha bolsa de estudo, mas todo apoio financeiro necessário à condução deste trabalho, contribuindo também ao meu aperfeiçoamento junto ao meio acadêmico.

Ao Professor Dr. José Bento Sterman Ferraz, pela colaboração neste trabalho.

À pesquisadora Mônica Corrêa Ledur pelas contribuições e pelos materiais e dados disponibilizados para o desenvolvimento deste estudo.

À Aviagen Group (ex-Agroceres) e ao Tércio Michelin Filho pelo apoio ao desenvolvimento do estudo.

Ao Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia (GMAB), pela contribuição profissional.

À professora Dra. Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura, do Departamento de Produção Animal/FMVZ/UNESP pelas valiosas contribuições.

Ao professor Dr. David Burt, do Roslin Institute (University of Edinburgh), pela oportunidade de me acolher durante um mês em seu grupo de pesquisa, pelo aprendizado e pelo carinho.

À grande amiga Elisângela (GMAB), mesmo distante, ajudando na elaboração do banco de dados deste estudo.

À amiga Leila, pelos ensinamentos e incentivos constantes.

Ao amigo Minos, pela amizade, pela companhia de viagem no início do Doutorado, pelas experiências trocadas e pelos desabafos.

Aos grandes amigos Gustavo (Tragédia) e Lilian (Lilian Rezzzzzzeeende), pela amizade, pela ajuda em várias etapas deste trabalho e pelos grandes momentos de descontração (cafezinho).

À amiga Aline Cesar, pela amizade, pelos ensinamentos, pela ajuda constante, pela paciência e momentos de descontrações.

Às amigas Mirele Poleti e Vivian de Almeida, pela amizade, pelas trocas de experiências, pelo companheirismo e grandes risadas.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal – Casa, Aurea, Fábio (Bonecão de Olinda), Gabi, Marcela, Millor, Priscila, Thaís, Renato, Milla, Dênia, pela convivência, pelas trocas de experiências, e risadas.

Aos colegas que já passaram pelo LBA, Kerli, Fernada Eliza, Fernanda Saválio (Coleguinha), Érika Jorge, pela amizade e aprendizado.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal, Nirlei e Jorge Luís, que contribuíram nas diversas fases deste trabalho e pela amizade.

À ESALQ e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

À FZEA e a CCPS, pelo apoio e concretização deste trabalho.

Aos professores e funcionários da ESALQ pelos ensinamentos e dedicação.

Aos meus irmãos, pelo apoio que sempre recebi.

Às bibliotecárias Eliana e Sílvia (ESALQ) por toda ajuda, compreensão e amizade.

E à todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA.

Saber finalizar uma fase da vida requer tanta sabedoria quanto para iniciar...

...Sonhos não envelhecem. Eles sobrevivem, mesmo com o passar dos anos. Por isso, podem funcionar como fórmula para rejuvenescer a alma, enchendo-a de novas e surpreendentes perspectivas.

Pe. Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1INTRODUÇÃO.....	17
Referências.....	22
2 POLIMORFISMOS NOS GENES <i>FGFBP1</i> E <i>FGFBP2</i> ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA E QUALIDADE DA CARNE EM GALINHAS.....	27
Resumo.....	27
Abstract.....	27
2.1 Introdução.....	28
2.2 Desenvolvimento.....	30
2.2.1 Material e Métodos.....	30
2.2.2 Resultados e Discussão.....	36
2.3 Conclusões.....	49
Referências.....	50
3 IDENTIFICAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CANDIDATOS <i>CAPN1</i> E <i>CAPN3</i> RELACIONADOS COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE EM GALINHAS.....	55
Resumo.....	55
Abstract.....	55
3.1 Introdução.....	56
3.2 Desenvolvimento.....	57
3.2.1 Material e Métodos.....	57
3.2.2 Resultados e Discussão.....	63
3.3 Conclusões.....	72
Referências.....	72
4 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES <i>MYOGENINA</i> E <i>MYOSTATINA</i> COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E CARCAÇA EM GALINHAS.....	75
Resumo.....	75
Abstract.....	75
4.1 Introdução.....	76
4.2 Desenvolvimento.....	78
4.2.1 Material e Métodos.....	78

4.2.2 Resultados e Discussão.....	83
4.3 Conclusões.....	92
Referências.....	93

RESUMO

Identificação de polimorfismos em genes candidatos associados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em *Gallus gallus*

O Brasil se mantém na posição de maior exportador mundial de carne de frango, e o terceiro em produção, abaixo apenas dos Estados Unidos e da China. O grande avanço na produtividade avícola é devido principalmente ao melhoramento genético. As novas tecnologias na área da genômica animal podem oferecer ferramentas que auxiliam na seleção assistida por marcadores. O presente trabalho teve como objetivo identificar polimorfismos em seis genes (*FGFBP1*, *FGFBP2*, *CAPN1*, *CAPN3*, *MyoG* e *MSTN*) de uma população experimental, validá-los em uma população comercial e realizar a associação dos polimorfismos com características de interesse econômico na avicultura. Para a identificação de polimorfismos foram utilizadas 11 aves (F_1) pertencentes à uma população experimental da Embrapa Suínos e Aves, e um polimorfismo de cada gene foi selecionado para a genotipagem em média de 180 animais da geração F_2 da população experimental da Embrapa e 311 frangos de corte de uma população comercial através de sondas *TaqMan*[®]. SNP 2014G>A (*FGFBP1*) foi associado com peso eviscerado (PE), e os genótipos do SNP 651G>A (*FGFBP2*) foram associados com perdas de água por exsudação (EXSU) e teor de vermelho da carne (a^*). O polimorfismo g.2554T>C (*CAPN1*) foi associado com peso vivo aos 35 a 42 dias, peso da coxa, peso do peito, peso da carcaça e luminosidade da carne. O SNP g.15486C>T (*CAPN3*) foi associado com rendimento da coxa, perdas de água por cozimento da carne e força de cisalhamento da carne. O polimorfismo g.2947A>G (*MyoG*) foi associado com porcentagem de proteína e cinzas na matéria mineral, porcentagem de cinzas na matéria seca, peso eviscerado, peso de pernas e peso à seleção aos 38 dias. Para o SNP g.324C>T (*MSTN*) foram observadas associações com peso do fígado, conversão alimentar, peso ao abate e peso eviscerado. Os resultados obtidos neste trabalho permitem a indicação dos polimorfismos do tipo SNP, aqui apresentados, como marcadores moleculares, os quais são ferramentas importantes para programas de melhoramento avícola que objetivam seleção de animais geneticamente superiores para características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne.

Palavras-chave: Crescimento; Frango de corte; Genômica; Maciez

ABSTRACT

Identification of candidate genes polymorphisms in associated with of performance, carcass, muscular development and meat quality traits in *Gallus gallus*

Brazil is the world's largest chicken meat exporter, and the third in production, behind the United States and China. The great advance in productivity is due mainly to poultry breeding. New technologies in the field of animal genomics that have provided tools such as marker-assisted selection. This study aimed to identify polymorphisms in six genes (*FGFBP1*, *FGFBP2*, *CAPN1*, *CAPN3*, *MyoG* and *MSTN*) of an experimental population, validate them in a business population and perform the association of polymorphisms with traits of economic interest in poultry. To identify polymorphisms, we used 11 birds (F_1) belonging to an experimental population of Embrapa Swine and Poultry, and a polymorphism of each gene was selected for genotyping on average of 180 chickens from an F_2 experimental population from Embrapa and 311 broilers from a commercial population using *TaqMan*[®] probes. SNP 2014G>A (*FGFBP1*) was associated with gutted weight (GW), and the genotypes of SNP 651G>A (*FGFBP2*) were associated with water loss by exudation (EXSU) and meat red content (a^*). Polymorphism g.2554T>C (*CAPN1*) was associated with body weight at 35 to 42 days, thigh weight, breast weight, carcass weight and meat lightness content. The SNP g.15486C>T (*CAPN3*) was associated with thigh performance, water losses by cooking the meat and meat shear force. Polymorphism g.2947A>G (*MyoG*) was associated with protein percentage and ash in the mineral matter, ash percentage in dry matter, gutted weight, leg weight and weight to selection for 38 days. The SNP g.324C>T (*MSTN*) showed associations with liver weight, feed conversion, slaughter weight and gutted weight. The results indicate that the type polymorphisms SNP shown here as molecular markers, which are important tools for breeding programs aimed at poultry selection of genetically superior animals for of performance, carcass, muscle development and meat quality traits.

Keywords: Growth; Broiler; Genomics; Tenderness

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem registrando avanços consideráveis em sua produtividade, a qual emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente em suas atividades, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF, 2010).

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango com 12,230 milhões de toneladas produzidas em 2010 (UBABEF, 2010), abaixo apenas dos Estados Unidos com 16,648 milhões de toneladas, e da China cuja produção em 2010 foi 12,550 milhões de toneladas, segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Desde 2004, o Brasil se mantém na posição de maior exportador mundial de carne de frango, com 3,819 milhões de toneladas embarcadas somente em 2010 para mais de 150 países (UBABEF, 2011). Em 2010, o consumo *per capita* de carne de frango no Brasil alcançou a média de 44 Kg por habitante/ano (UBABEF, 2011) ocupando o primeiro lugar no *ranking* das carnes mais consumidas no Brasil, superando a carne bovina (USDA, 2011).

Toda essa evolução na produtividade avícola resulta da melhoria contínua do sistema e das ferramentas dos programas de melhoramento genético (YANG et al., 1999). No entanto, os avanços da genômica têm o potencial de acelerar o progresso genético principalmente para características de difícil mensuração. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares, várias abordagens vêm sendo utilizadas como, obtenção de marcadores, construção de mapas de ligação, mapeamento de *QTLs* (*Quantitative Trait Loci*), sequenciamento genômico, estudos de genes candidatos e expressão gênica. Assim, com estas abordagens a seleção genética poderá ocorrer de maneira precoce e mais precisa quando baseada no genótipo do animal (ZHOU et al., 2006).

A galinha foi o primeiro animal doméstico a ter o genoma sequenciado, o que resultou em novos estudos científicos (HILLIER et al., 2004), sendo considerada um importante modelo de organismo para o desenvolvimento da biologia, contribuindo como ferramenta complementar para o melhoramento genético clássico (BURT, 2007).

Mesmo com todos esses avanços na genômica animal, ainda existe um fator limitante, que é a identificação dos genes relacionados com o controle das características quantitativas. Segundo Gao (2007), embora a estratégia de genes candidatos seja considerada eficiente para determinar a associação de uma variante

específica com o fenótipo, a proporção de genes causais responsáveis pelas características econômicas ainda é muito limitada.

Estudos de mapeamento de QTLs tem sido usados para definir regiões genômicas que controlam essas características, sendo considerados um método importante na busca por genes candidatos, já que os QTLs podem auxiliar na localização desses genes (WONG et al., 2004). Estes genes são denominados candidatos por estarem posicionados em uma região de QTL, ou por serem genes conhecidos biologicamente por estarem envolvidos no desenvolvimento ou fisiologia de uma determinada característica de interesse. Eles podem ser estruturais ou genes de vias regulatórias ou bioquímicas afetando a expressão da característica (BRYNE; McMULLEN, 1996).

Em 1999, iniciou no Brasil, o Projeto Brasileiro de Genômica da Galinha, uma parceria entre a Embrapa Suínos e Aves e a Universidade de São Paulo/Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, a qual desenvolveu duas populações referência para mapeamento de QTLs e estudos de genes associados com características de desempenho e carcaça. Essas populações apresentam delineamento do tipo F₂, e foram formadas a partir do cruzamento de uma linhagem parental de corte (TT) e uma de postura (CC) e denominadas TCTC e CTCT devido aos cruzamentos recíprocos dessas linhagens.

Diversos estudos foram e estão sendo realizados nessas populações. Na população TCTC foram construídos mapas de ligação e foram mapeados inúmeros QTLs para características de desempenho e carcaça no cromossomo 1 (NONES et al., 2006), em outros cromossomos (MOURA et al., 2006; RUY et al., 2007) e em todo o genoma (AMBO et al., 2009; CAMPOS et al., 2009; BARON et al., 2010; NONES et al., 2012). Na população CTCT, trabalhos iniciais envolveram o estudo dos cromossomos 1, 3 e 4 e a construção de mapas de ligação (ROSÁRIO, et al., 2009, 2010). Estudos dos cromossomos 2 e 5 também estão sendo realizados nesta população.

O estudo de genes candidatos e polimorfismos de base única (SNPs) podem ser métodos eficazes para melhorar o progresso genético das características como desenvolvimento muscular, carcaça e qualidade da carne. Com a identificação de milhares de SNPs no genoma da galinha, tem sido possível o desenvolvimento de estratégias de mapeamento fino, com intuito de reduzir os intervalos de regiões de QTLs e realizar testes de associação entre SNPs e características de interesse

econômico (GEORGES, 2007). SNPs podem ser utilizados como marcadores genéticos com o objetivo de acompanhar os padrões de hereditariedade das regiões cromossômicas de geração em geração (BROOKES, 1999).

Exemplos bem sucedidos de genes candidatos na produção animal são os genes *Halotano* e do Rendimento de Napoli (*RN*) que em suínos afetam a qualidade da carne (DE VRIES, 1998), e o gene da miostatina associado à formação da musculatura dupla em bovinos (GROBET et al., 1997).

Na galinha, mais de 2,8 milhões de SNPs já foram identificados a partir da comparação da sequência do genoma do ancestral da galinha (*Gallus gallus*) com sequências obtidas em três linhagens domesticadas: um macho de corte (*White Cornish*), uma fêmea de postura (*White Leghorn*) e outra fêmea de uma espécie ornamental (*Silkie* chinesa). A taxa global média de substituição de bases nitrogenadas foi de 5 SNPs.kb⁻¹ (WONG et al., 2004).

No presente estudo, seis genes foram selecionados como possíveis candidatos por estarem relacionados com características de interesse econômico na avicultura.

Os genes *Proteína de Ligação do Fator de Crescimento do Fibroblasto1* (*FGFBP1*) e *Proteína de Ligação do Fator de Crescimento do Fibroblasto2* (*FGFBP2*) foram selecionados por estarem posicionados em regiões de QTLs, e por suas funções. Já os genes *Calpaína1* (*CAPN1*), *Calpaína3* (*CAPN3*), *Miogenina* (*MyoG*), *Miostatina* (*MSTN*) foram selecionados com base em estudos nos quais foram encontradas evidências funcionais de que estes genes estão relacionados principalmente com características de qualidade da carne e desenvolvimento muscular.

Em galinhas, o gene *FGFBP1* apresenta 1.182 pb distribuídos em dois exons e 208 aminoácidos, e o *FGFBP2* possui 980 pb distribuídos em dois exons e codifica uma proteína com 307 aminoácidos. Ambos *FGFBP1* e *FGFBP2* estão localizados no cromossomo 4 entre os marcadores microssatélites flanqueadores *MCW0240-LEI0063*, e possuem 34 e 21 SNPs, respectivamente, descritos na galinha no banco público de dados *dbSNP* (2012). Não existem estudos de identificação e associação de SNPs nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* com características de interesse econômico na avicultura.

Em galinhas, o gene *CAPN1* está localizado no cromossomo 3, possui 10.384 pb distribuídos em 21 exons e 20 introns, e apresenta uma proteína com 705

aminoácidos. Existem 118 SNPs descritos de acordo com o banco de dados NCBI (2012). Este gene apresenta uma similaridade de 53,62% com a sequência do RNAm de bovinos. Zhang et al. (2008) estudaram populações divergentes de galinhas e encontraram três polimorfismos no gene *CAPN1* (C2546T; G3535A e C7198A) e seus haplótipos foram associados com peso vivo, peso de carcaça, peso do músculo peitoral, peso do músculo de pernas, peso eviscerado e densidade da fibra muscular peitoral.

A *CAPN3* está localizada no cromossomo 5 em galinhas. Este gene apresenta 24 exons e 23 introns, num total de 24.011 pares de bases, e sua proteína possui 810 aminoácidos. Já estão descritos 152 SNPs no banco de dados público do NCBI na galinha (2012). Zhang et al. (2009) identificaram dois SNPs em linhagens divergentes de frangos de corte (11818T>A e 12814T>G) no intron 8 e exon 10, respectivamente. Os polimorfismos foram associados com as características de peso corporal, peso da carcaça, peso do músculo peitoral e peso muscular da perna.

Miogenina é um gene que pertence à família do gene *MyoD*, o qual promove a diferenciação das células musculares (OLSON, 1990; RUDNICKI; JAENISCH, 1995). A *Miogenina* é requerida para diferenciação bioquímica e morfológica na maturação do tecido muscular esquelético (PERRY; RUDNICKI, 2000).

Wang et al. (2008) estudando o gene da *Miogenina* em galinhas de cinco linhagens puras e três combinações híbridas, identificaram polimorfismos associados com peso do músculo peitoral, porcentagem de músculo de pernas e densidade de fibras musculares. O gene *MyoG* está localizado no cromossomo 26, apresenta 3 exons, 1075 pares de bases e sua proteína apresenta 227 aminoácidos.

O gene da *Miostatina* conhecido como GDF8 é um membro da família TGF- β , e atua como um regulador negativo do desenvolvimento da musculatura esquelética e crescimento em mamíferos (McPHERRON; LEE, 1997), e participa da deposição e metabolismo de gordura (GU et al., 2003). Zhang et al. (2011) estudaram quatro populações de galinhas (Bian, Jinghai, Youxi e Arbor Acre) e encontraram quatro polimorfismos no gene da *Miostatina* (G2283A, C7552T, C7638T e T7661A) associados com peso vivo em 6-18 semanas de idade. Esse gene está localizado no cromossomo 7 em galinhas, e possui 3 exons, distribuídos em 1128 pb, e 227 aminoácidos.

Desta forma, devido à escassez de informações a respeito do potencial da utilização de marcadores moleculares na caracterização da frequência de polimorfismos de genes ligados às características de desenvolvimento muscular e qualidade de carne de aves e à dificuldade em obter dados fenotípicos destas características, este estudo poderá trazer resultados esclarecedores com benefícios tanto para as indústrias de genética e processadoras avícolas como para o mercado consumidor. Este fato justifica-se em virtude da possibilidade de identificação e seleção de animais com crescimento e qualidade de carne superiores.

Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo geral identificar polimorfismos em genes candidatos de uma população experimental de galinhas e uma população comercial de frangos de corte, visando contribuir para o melhor entendimento das relações existentes entre esses genes e suas associações com características de interesse econômico na avicultura.

Objetivos Específicos

- (i) Identificar polimorfismos em seis genes candidatos, sendo um em cada gene, relacionados às características de desenvolvimento muscular, desempenho, carcaça e de qualidade de carne em uma população F_2 da Embrapa Suínos e Aves e uma população comercial de frangos de corte;
- (ii) Caracterizar as frequências dos polimorfismos identificados nos seis genes candidatos;
- (iii) Realizar estudos de associação dos seis SNPs selecionados com características de desenvolvimento muscular, desempenho, carcaça e de qualidade de carne em galinhas nas populações experimental e comercial.

Referências

- AMBO, M.; MOURA, A.S.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.; BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; CAMPOS, R.L.; BOSCHIERO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 200-208, 2009.
- BARON, E.E.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.B.; BOSCHIERO, C.; RUY, D.C.; NONES, K.; ZANELLA, E.L.; ROSARIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 117-124, 2010.
- BROOKES, A J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, NL, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.
- BRYNE, P.F.; MCMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, London, GB, v.7, n. 3, p.24-27, 1996.
- BURT, D.W. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. **Poultry Science**, Ithaca, US, v. 86, n. 7, p. 1460-1471, 2007.
- CAMPOS, R.L.; NONES, K.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.; PINTO, L.F.; AMBO, M.; BOSCHIERO, C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; NINOV, K.; ALTENHOFEN, C.A.; SILVA, R.A.; ROSÁRIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with fatness in a broiler-layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, GB, v. 40, n. 5, p. 729-736, 2009.
- DE VRIES, A.G.; SOSNICKI, A.; GARNIER, J.P.; PLASTOW, G.S. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. **Meat Science**, Barking, v. 49, Supplementum 1 S245-S255, 1998.
- GAO, Y. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat Science**, Barking, v. 77, n. 1, p. 37-45, 2007.
- GEORGES, M. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 8, p. 131-162, 2007.
- GROBET, L. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. **Nature Genetics**, New York, v.17, n. 1, p.71-74, 1997.
- GU, Z.L.; ZHU, D.H.; LI, N.; LI, H.; DENG, X.M.; WU, C.X. Polymorphisms of myostatin gene and its relationship with the development of skeletal muscle and fat in chickens. **Science in China Series C: Life Sciences**, Beijing, v. 33, n. 3, p. 273-280, 2003.
- HILLIER, L.W. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, London, GB, v. 9, n. 432, p. 695-716, 2004.

MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M., LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, London, v.387, n. 6628, p.83-90, 1997.

MOURA, A.S.A.M.T.; COUTINHO, L.L.; SCHMIDT, G.S. Genetic and phenotypic parameters for organs, body and carcass weights, and haematocrit value, in a broiler x layer cross resource population. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006. Belo Horizonte, 2006. **Proceedings...** Belo Horizonte, 2006.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Acesso em: 02 abr. 2012.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MELO, C.M.; MOURA, A.S.; 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, GB v. 37, n. 2, p. 95-100, 2006.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; KLEIN, C.; PINTO, L.F.B.; MOURA, A. S.A.M.T.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; AMBO, M.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIEIRO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with chemical composition of the chicken carcass. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2012.

OLSON, E.N. MyoD family: a paradigm for development. **Genes and Development**, New York, v.4, n. 9, p.1454, 1990.

PERRY, R.S.; RUDNICK, M.A. Molecular mechanism regulating myogenic determination and differentiation. **Science**, Landmark, v.5, n. 1, p. 750-767, 2000.

ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Genotypic characterization of microsatellite markers in broiler and layer selected chicken lines and their reciprocal F₁s. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 66, n. 2, p. 150-158, 2009.

ROSÁRIO, M.F.; MARGARIDO, G.R.A.; BOSCHIERO, C.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Precision of distances and ordering of microsatellite markers in consensus linkage maps of chromosomes 1, 3 and 4 from two reciprocal chicken populations using bootstrap sampling. **Genetics Molecular Research**, Ribeirão Preto, SP, v. 9, n.3, p. 1357-1376, 2010.

RUDNICKI, M.A.; JAENISCH RUDOLF. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. **BioEssays**: advances in molecular, cellular and developmental biology, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 203-209, 1995.

RUY, D.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; NONES, K.; BARON, E.E.; LEDUR, M.C.; CAMPOS, R.L.R.; AMBO, M.; MELO, C.M.R.; COUTINHO, L.L. Detection of QTL for performance, fatness and carcass traits on chicken chromosomes 3 and 5. In: QTLMAS, 9., 2007, Toulouse. **Anais...** Toulouse: Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), p. 26-29, 2007.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. A indústria avícola. 2010. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/indústria-avicola/historia-avicola.php>>. Acesso em: 03 fev. 2012.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. Relatório Anual de 2010/2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em: 03 fev. 2011.

USDA. United States department of Agriculture. In: UBABEF. Relatório Anual 2010/2011. 2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>>. Acesso em: 03 fev. 2011.

WANG, Q.; LIU, Y.P.; JIANG, X.S.; YANG, C.W.; DU, H.R.; QIU, M.H.; ZHU, Q. Correlation analysis of relationships between polymorphisms of high quality chicken myogenin gene and slaughter and meat quality traits. **Frontiers of Agriculture in China**. Beijing, v. 2, n. 4, p. 512-518, 2008.

WONG, GK; LIU, B; WANG, J; ZHANG, Y; YANG, X; ZHANG, Z; MENG, Q; ZHOU, J; LI, D; ZHANG, J; NI, P; LI, S; RAN, L; LI, H; ZHANG, J; LI, R; LI, S; ZHENG, H; LIN, W; LI, G; WANG, X; ZHAO, W; LI, J; YE, C; DAI, M; RUAN, J; ZHOU, Y; LI, Y; HE, X; ZHANG, Y; WANG, J; HUANG, X; TONG, W; CHEN, J; YE, J; CHEN, C; WEI, N; LI, G; DONG, L; LAN, F; SUN, Y; ZHANG, Z; YANG, Z; YU, Y; HUANG, Y; HE, D; XI, Y; WEI, D; QI, Q; LI, W; SHI, J; WANG, M; XIE, F; WANG, J; ZHANG, X; WANG, P; ZHAO, Y; LI, N; YANG, N; DONG, W; HU, S; ZENG, C; ZHENG, W; HAO, B; HILLIER, LW; YANG, SP; WARREN, WC; WILSON, RK; BRANDSTRÖM, M; ELLEGREN, H; CROOIJMANS, RP; VAN, DER, POEL, JJ; BOVENHUIS, H; GROENEN, MA; OVCHARENKO, I; GORDON, L; STUBBS, L; LUCAS, S; GLAVINA, T; AERTS, A; KAISER, P; ROTHWELL, L; YOUNG, JR; ROGERS, S; WALKER, BA; VAN, HATEREN, A; KAUFMAN, J; BUMSTEAD, N; LAMONT, SJ; ZHOU, H; HOCKING, PM; MORRICE, D; DE, KONING, DJ; LAW, A; BARTLEY, N; BURT, DW; HUNT, H; CHENG, HH; GUNNARSSON, U; WAHLBERG, P; ANDERSSON, L; KINDLUND, E; TAMMI, MT; ANDERSSON, B; WEBBER, C; PONTING, CP; OVERTON, IM; BOARDMAN, PE; TANG, H; HUBBARD, SJ; WILSON, SA; YU, J; WANG, J; YANG, H;. A genetic variation map for chicken with 2.8 milion single-nucleotide polymorphisms. **Nature**, London, GB, v. 432, n. 7018, p.717-722, 2004.

YANG, A.; EMMERSON, D.A.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Heterosis and developmental stability of body and organ weight at hatch for parental line broiler breeders and specific crosses among them. **Poultry Science**, Ithaca, v.78, n. 7, p.942-948, 1999.

ZHANG, G.; DING, F.; WANG, J.; DAI, G.; XIE, K.; ZHANG, L.; WANG, W.; ZHOU, S. Polymorphism in exons of the myostatin gene and its relationship with body weight traits in the Bian chicken. **Biochemical Genetics**, New York, v. 49, n. 1-2, p. 9-19, 2011.

ZHANG, Z.R.; LIU, Y.P.; JIANG, X.; DU, H.R.; ZHU, Q. Study on association of single nucleotide polymorphism of CAPN1 gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken populations. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v.125, n. 4, p. 258-264, 2008.

ZHANG, Z.R.; LIU, Y.P.; YAO, Y.G.; JIANG, X.S.; DU, H.R.; ZHU, Q. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain 3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens. **BMC Genetics**, Lunger, v. 5, n. 10, p. 10, 2009.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M.; ASHWELL, C.M.; LAMONT, S.J. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. II. Body composition. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, n. 10, p. 1712-1721, 2006.

2 POLIMORFISMOS NOS GENES *FGFBP1* E *FGFBP2* ASSOCIADOS COM CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA E QUALIDADE DA CARNE EM GALINHAS

Resumo

Até recentemente, o foco dos programas de melhoramento genético de aves de corte era a seleção de animais, principalmente para a melhoria do desempenho e carcaça, o que resultou em problemas relacionados com a qualidade da carne. Desse modo, as características de qualidade da carne tiveram maior importância nos programas de melhoramento genético. A partir de resultados de estudos anteriores, nos quais foram mapeados QTLs para características de peso aos 35, e 42 dias no GGA4, foi definida uma região no intervalo entre os marcadores *MCW0240* e *LEI0063*. Nesta região foram selecionados dois genes da Proteína de Ligação do Fator de Crescimento de Fibroblastos (*FGFBP*). Estes genes desempenham um papel importante na embriogênese, diferenciação e proliferação celular em galinhas. O objetivo deste trabalho foi identificar e associar polimorfismos do tipo SNP nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2*, localizados em regiões de QTLs, com características de desempenho, carcaça e qualidade de carne em duas populações distintas de galinhas. Na população comercial o SNP g.2014G>A foi associado com peso eviscerado e os genótipos do SNP g.651G>A foram associados com perdas de água por exsudação e teor de vermelho da carne. Foram construídos quatro haplótipos com base nos dois SNPs identificados e associados com peso de peito, perdas de água por exsudação e teor de vermelho da carne na população comercial. Os diplótipos foram associados com perdas de água por exsudação, teor de luminosidade e teor de vermelho da carne. Os SNPs avaliados poderão ser utilizados como marcadores em programas de melhoramento genético de aves, visando uma melhoria nas características de crescimento e qualidade de carne.

Palavras chave: Crescimento; Fibroblasto; Melhoramento genético; QTL; SNP

Abstract

Until recently, the focus of breeding programs of broiler was the selection of animals, mainly to improve yield and carcass, which resulted in problems related to meat quality. Thus, the meat quality traits became more important in breeding programs. Based on results of previous studies, which mapped QTLs for features of weight at 35 and 42 days in GGA4, a region was defined in the interval between markers *MCW0240-LEI0063*. In this region, we selected two genes Fibroblast Growth Factor Binding Protein (*FGFBP*). These genes play an important role in embryogenesis, cellular differentiation and proliferation in chickens. The objective of this study was to identify and associate polymorphisms type SNP in genes *FGFBP1* and *FGFBP2* located in QTL regions, with performance, carcass and meat quality in two distinct populations of chickens. The SNP g.2014G>A was associated with gutted weight and the SNP genotypes g.651G>A were associated with water loss through exudation and meat red content. Four haplotypes were constructed based on two SNPs and associated with breast weight, water loss by exudation and meat red content. The diplotypes were associated with water loss by exudation, lightness content and meat red content. The SNPs evaluated may be used as markers in breeding programs of poultry, aiming at improving the growth and meat quality traits.

Keywords: Growth; Fibroblast; Breeding; QTL; SNP

2.1 Introdução

O aumento da população mundial, assim como o maior poder aquisitivo da faixa mais pobre desta população tem resultado numa crescente demanda por produtos de origem animal. Para atender a esta demanda, a indústria e, em particular a avicultura, têm melhorado seus índices de produtividade devido principalmente ao melhoramento genético (YANG et al., 1999).

Até recentemente, o foco dos programas de melhoramento genético de aves de corte foi a seleção de animais baseando-se principalmente nas características de desempenho e carcaça. No entanto, este foco resultou em problemas relacionados com a qualidade da carne (ANTHONY, 1998; DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999) e levou a inclusão das características de qualidade em alguns programas de melhoramento genético. Esta mudança está em sintonia tanto com a indústria processadora de carne quanto com o consumidor final que estão cada vez mais preocupados e exigentes quanto às características relacionadas à qualidade da carne (PARK et al., 2002).

Alterações na qualidade da carne podem ocorrer devido a correlação entre as características de rendimento e as características de qualidade. Dransfield e Sosnicki (1999) relataram que a seleção para maior peso de peito tende aumentar a incidência de carne *PSE* (*pale, soft and exudative*) em frangos. Estes resultados divergiram de Le Bihan-Duval et al. (2008) que encontraram correlações genéticas altas e negativas entre peso e rendimento de peito e perdas de água por gotejamento, e cozimento ($-0,65 \pm 0,10$ e $-0,80 \pm 0,06$, respectivamente) em frangos. Gaya et al. (2011) encontraram correlação genética moderada e negativa ($-0,42 \pm 0,119$) entre peso de peito e perdas de água por cozimento, indicando que a seleção para maior peso de peito poderia melhorar a capacidade de retenção de água da carne em frangos.

Os avanços na área da genômica animal têm gerado novas ferramentas que podem ser utilizadas na identificação de regiões genômicas e seleção de alelos envolvidos com características de interesse econômico (DEKKERS, 2004).

Inúmeros QTLs já foram mapeados para características de desempenho e carcaça em diversos cromossomos

(<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>). Baron et al. (2010) mapearam um QTL para porcentagem de coxa e sobrecoxa no cromossomo 4 da galinha entre os marcadores *MCW0240-LEI0063* (121 cM) na população F₂ da Embrapa. Em trabalho anterior conduzido por nosso grupo, Ambo et al. (2009), trabalhando com uma população F₂ (corte e postura) mapearam um QTL para peso aos 35 e 42 dias entre os marcadores microssatélites flanqueadores *MCW0240* (198,7 cM) e *LEI0063* (235,2 cM) no cromossomo 4 da galinha. O estudo desta região de QTL permitiu a identificação de dois genes candidatos associados à características de interesse econômico: Proteína de Ligação do Fator de Crescimento do Fibroblasto 1 (*FGFBP1*) e Proteína de Ligação do Fator de Crescimento do Fibroblasto 2 (*FGFBP2*).

O *FGFBP* desempenha um papel importante durante a embriogênese. Em humanos, estudos revelaram alta expressão do *FGFBP* em células cancerígenas (KAGAN et al., 2003; CZUBAYKO et al., 1997). Estudos imunohistoquímicos realizados em ratos observaram em algumas fases da embriogênese, a expressão de *FGFBP* em tecidos relacionada com a fase de diferenciação (AIGNER et al., 2002).

FGFBP1 (ou também conhecido como *HBP17*), se liga aos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) como o *FGF1* e *FGF2* (WU et al., 1991), bem como *FGF7*, 10 e 22 (BEER et al., 2005). Estudos relatam que o *FGFBP1* tem a capacidade de mobilizar *FGF2* a partir da matriz extracelular e melhorar as atividades biológicas de *FGF1* e *FGF2* (AIGNER et al., 2001; TASSI et al., 2001). O *FGF2* desempenha um papel essencial na regulação da diferenciação, proliferação e apoptose de osteoblastos em humanos (MARIE et al., 2002).

FGFBP2 também conhecido como *KSP37*, é altamente expresso em células malignas em humanos, e em tecidos normais (ELGAAEN et al., 2010). Trabalhos mostram que os genes *FGFBP1* e *FGFBP2* estão relacionados com fases da embriogênese em galinhas e apresentam contribuições importantes para o desenvolvimento de galinhas (GIBBY et al., 2009).

Em galinhas, o gene *FGFBP1* apresenta 1.182 pb distribuídos em dois exons e 208 aminoácidos, e o gene *FGFBP2* possui 980 pb distribuídos em dois exons e codifica uma proteína com 307 aminoácidos. Os genes *FGFBP1* e *FGFBP2* possuem 34 e 21 SNPs, respectivamente, descritos no banco público de dados *dbSNP* (2012). No entanto, não existe estudo de identificação e associação de SNPs

para os genes *FGFBP1* e *FGFBP2* com características de interesse econômico na avicultura.

Este estudo teve como objetivos (1) identificar polimorfismos nos genes candidatos *FGFBP1* e *FGFBP2*; e (2) realizar estudos de associação desses SNPs com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em duas populações, uma experimental e uma comercial de frangos de corte.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

Populações

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas duas populações de aves, uma F_2 experimental (Embrapa Suínos e Aves) e outra comercial.

A população experimental utilizada foi de uma linhagem F_2 (TCTC) desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves através de cruzamentos entre machos da linhagem de corte (TT) e fêmeas da linhagem de postura (CC). CC é uma linhagem de postura originada da raça *White Leghorn*, na qual o programa de seleção objetivou melhorar a produção de ovos, peso do ovo, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade de ovo, conversão alimentar, viabilidade e redução do peso corporal. TT é uma linhagem de corte originada das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*, que foi selecionada para melhorar conversão alimentar, peso corporal, rendimentos de carcaça e de peito, fertilidade, viabilidade, redução da gordura abdominal e síndromes metabólicas (ascite e morte súbita).

A geração F_1 foi formada a partir de sete machos TT cruzados com sete fêmeas CC, gerando aproximadamente 50 animais F_1 TC. A formação da geração F_2 procedeu-se de um total de sete machos e 21 fêmeas na proporção de um macho para três fêmeas de cada família da geração F_1 , onde cada macho F_1 foi acasalado com três fêmeas F_1 não aparentadas. Cada fêmea F_1 produziu aproximadamente 100 animais F_2 , em um total de aproximadamente 2.100 progênies, obtidas ao longo de 17 incubações em oito meses (ROSÁRIO et al., 2009).

O estudo da população comercial utilizou um banco de dados do rebanho elite comercial (também designado rebanho de *pedigree*) de frangos de corte, no qual é realizado o processo de seleção para composição de uma linhagem macho de frangos de corte da empresa. As informações dos irmãos completos destas aves

foram utilizadas no processo de seleção, programa denominado *sib test*. Este teste tem a finalidade de auxiliar a escolha dos melhores indivíduos durante o programa de seleção do rebanho elite, o qual origina todas as aves da linhagem.

As aves foram alojadas em galpões da Granja de Pedigree desta empresa e criadas com programas de vacinação e manejo nutricional semelhantes aos preconizados para frangos de corte, com a diferença de estarem em um ambiente rigidamente controlado, visando garantir a saúde e o desempenho destas aves.

Ao atingirem 42 dias de idade, cada lote de animais *sib test*, composto por machos e fêmeas, foi sexado e alojado em caixas, sendo transportados ao Matadouro - Escola do campus da USP em Pirassununga. Foram coletados dados de desempenho, carcaça e histológicos de 1.300 aves e destas, todas foram submetidas à coleta de informações de qualidade de carne, as quais foram realizadas no referido Matadouro, no Laboratório de Carnes, no Laboratório de Citologia e Imunohistoquímica e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP. Esse banco de dados da população comercial é mantido pelo Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia (GMAB) do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP desde 2002.

Fenótipos e extração de DNA

Foram avaliadas na população experimental F₂ da Embrapa as características relacionadas ao **desempenho** (peso ao nascer, peso aos 35 dias, peso aos 41 dias, peso vivo aos 42 dias, ganho de peso de 35 a 41 dias, consumo de ração de 35 a 41 dias, eficiência alimentar de 35 a 41 dias, comprimento do intestino, conversão alimentar de 35 a 41 dias), **carcaça** (peso vivo aos 35 dias, peso vivo aos 41 dias, peso vivo aos 42 dias, peso dos pés, peso das coxas e sobrecoxas, peso do peito com pele e ossos, peso da cabeça, peso das asas, peso do dorso, peso da carcaça obtido através da soma das partes, rendimento de pés, rendimento de coxas e sobrecoxas, rendimento de peito, rendimento de cabeça, rendimento de asas, rendimento de dorso, e rendimento de carcaça), **orgãos** (peso do fígado, peso do coração, peso da moela, peso do pulmão, hematócrito, rendimento de fígado, rendimento de coração, rendimento de moela e rendimento de pulmão), **gordura** (peso da gordura abdominal, rendimento de gordura abdominal, níveis séricos de colesterol total, de triglicérides e de colesterol + triglicerídeos), e **composição**

(porcentagem de matéria seca na carcaça, porcentagem de umidade na carcaça, porcentagem de proteína bruta na matéria seca, porcentagem de extrato etéreo na matéria seca, porcentagem de cinzas na matéria seca, porcentagem de proteína bruta na matéria natural, porcentagem de extrato etéreo na matéria natural, porcentagem de cinzas na matéria natural, proteína bruta em gramas, extrato etéreo em gramas e cinzas em gramas). Os detalhes da descrição das características de composição química estão em Nones et al. (2012).

O DNA genômico de 179 aves das gerações F_1 e F_2 da população experimental foi extraído a partir de amostras de sangue através do reagente DNAzol® (Life Technologies). As amostras foram diluídas na concentração padrão de 20 ng DNA μL^{-1} e armazenadas em *freezer* a -18°C . A qualidade do DNA genômico obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e corada com GelRed™ (Life Technologies).

Na população comercial foram avaliadas as seguintes características: **desempenho** (peso à seleção aos 38 dias e peso ao abate), **carcaça** (peso de carcaça eviscerada, peso de peito desossado e sem pele, peso de pernas), **qualidade de carne** (pH 24 horas após o abate, valores colorimétricos medidos 24 horas após o abate: parâmetros L^* - luminosidade, a^* - teor de vermelho, b^* - teor de amarelo), perdas de água por exsudação, perdas de água por descongelamento, perdas de água por cozimento, força de cisalhamento), e **histológicas** (diâmetros das fibras musculares, as áreas das fibras musculares e número de fibras musculares por campo histológico visualizado). As análises das características de qualidade de carne e histológicas foram realizadas no músculo *Pectoralis major* em sua porção crânio-ventral.

O DNA genômico de 311 animais foi extraído a partir de cortes histológicos de tecido muscular embebidos em parafina com o uso de uma solução de lise (NaOH 200 mM) e uma solução neutralizadora (HCl 200 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,5). As amostras foram identificadas e armazenadas em *freezer* a -18°C .

Seleção dos genes candidatos

Os genes candidatos *FGFBP1* e *FGFBP2* foram selecionados por estarem localizados em uma região do cromossomo 4 da galinha, onde foram mapeados QTLs em estudos anteriores para peso aos 35 e 42 dias entre os marcadores *MCW0240* (198,7 cM) e *LEI0063* (235,2 cM) na população F_2 da Embrapa (AMBO et

al., 2009; BARON et al., 2010). Além disso, estes genes foram escolhidos por apresentarem funções diretamente associadas ao QTL. Na Figura1 pode-se observar o mapa de ligação da região-alvo onde foram mapeados QTLs para peso aos 35 e 42 dias entre os marcadores *MCW0240- LEI0063* e os SNPs selecionados nos dois genes candidatos estudados *FGFBP1* (228,8 cM) e *FGFBP2* (228,7 cM).

Figura 1 - Representação da região-alvo estudada no GGA4 através do mapa de ligação parcial com os respectivos marcadores microssatélites (AMBO et al., 2009; BARON et al., 2010) e a posição de dois SNPs identificados nos genes *FGFBP1* (g.651G>A) e *FGFBP2* (g.2014>G). As posições dos marcadores estão em centimorgans (cM). O primeiro marcador representado neste é o *LEI0078* posicionado a 82,9 cM no Mapa Consenso da galinha (SCHMID et al., 2005). Para a representação gráfica deste mapa foi utilizado o programa *MapChart*, versão 2.1 (VOORRIPS, 2002)

Condições da PCR e sequenciamento

Os *primers* foram desenhados para amplificar regiões de exons e introns a partir de sequências da galinha dos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* depositadas no *GenBank* (nº de acesso: NC_006091.3) (2012) com auxílio do programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Através do programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>) foi analisada a qualidade desses *primers* (Tabela 1).

Tabela 1 - Primers desenhados para amplificar fragmentos dos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* da galinha

Gene	Sequência dos primers (5'-3')	pb ¹	°C ²
<i>FGFBP1</i>	D - GCTGTGAAAGGCAGAAGGAG	696	60
	R - TTGCTGAGATCGGACTGTTG		
<i>FGFBP2</i>	D - GGATGAAGAGATGAAAGCGAGA	656	58
	R - AAACCCCCAGAAGCCACA		

¹Tamanho do fragmento; ²Temperatura de anelamento

A amplificação dos fragmentos dos genes estudados foi feita por PCR, que foi realizada em um volume final de 25 µL e consistiu de 20 ng DNA genômico, 5 µL de tampão 10x (50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,5), 0,3 mM de MgCl₂ (50 mM), 0,4 mM de dNTP (10 mM), 2 pmol de cada *primer*, 1U de enzima Platinum[®] *Taq* DNA Polymerase (Life Technologies[™]). Para a amplificação desses fragmentos foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por um minuto, 30x (95 °C por um minuto, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* por um minuto, extensão a 72 °C por um minuto) e extensão final a 72 °C por dez minutos. O tamanho dos fragmentos amplificados foi determinado utilizando o marcador de peso molecular Φx 174 (Life Technologies), avaliado em gel de agarose a 1%.

Os produtos de PCR foram purificados e a seguir foi realizada a reação de sequenciamento de acordo com o protocolo do Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram purificadas e aplicadas no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser[®] (Applied Biosystems). As sequências dos nucleotídeos foram editadas, montadas e analisadas utilizando os programas *Phred*, *Phrap* e *Consed* (EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998).

Genotipagem dos polimorfismos

Depois de detectados os polimorfismos nos animais F₁ da população da Embrapa, dois SNPs, um em cada gene (*FGFBP1* e *FGFBP2*), foram selecionados com base em duas famílias (F₁) de irmãos completos mais informativas (genótipos heterozigóticos) para a genotipagem de 179 aves da geração F₂ da Embrapa e 311 animais da população comercial através da discriminação alélica com sistema de detecção *TaqMan*[®] (Applied Biosystems), com sondas específicas para cada alelo. As reações foram realizadas no equipamento *LightCycler 480 System II*[®] (Roche),

pelo método *Endpoint Genotyping*, com formato de detecção *Dual Color Hydrolysis Probe* com fluorescências *FAM* e *VIC*.

As reações consistiram de 1 µL de DNA genômico (20 ng.µL⁻¹), 5 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Life Technologies) composta por tampão *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, *AmpErase®* uracil-N-glycosylase (UNG) e dNTPs, e 0,25 µL de *Custom TaqMan® SNP Genotyping Assay* (*Aplied Biosystems*) que inclui *primers* específicos e sondas do tipo *TaqMan®* e 3,75 µL de água ultrapura para completar um volume de 10 µL.

As etapas das condições de ciclagem foram: pré-incubação, amplificação e resfriamento. As temperaturas da pré-incubação foram 50 °C por 2 minutos com taxa de rampa de 4,40 °C/s para ativação da UNG, e 95 °C por 10 minutos a 4,40 °C/s para ativação da *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*. As condições de amplificação foram 95 °C por 15 segundos a 4,40 °C/s (desnaturação), 60 °C por um minuto a 2,20 °C/s (anelamento) e 72 °C por um segundo a 4,40 °C/s (extensão) consistindo 45 ciclos. O resfriamento foi a 40 °C por 10 segundos a 1,50 °C/s.

Os resultados foram analisados através do programa *LightCycler 480 SW 1,5* (Roche).

Análises estatísticas

As frequências alélicas e genótípicas foram estimadas para cada *locus*, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente, conforme descrito por Falconer e Mackay (2001).

Para avaliar as implicações dos resultados moleculares em relação às características avaliadas nas aves, foram utilizadas análises individuais com cada característica sendo considerada uma variável dependente.

Os efeitos dos genótipos encontrados para os dois marcadores (*FGFBP1* e *FGFBP2*) foram avaliados a partir do modelo geral apresentado abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + M_k + e_{ijkl}$$

em que: Y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado para uma dada característica nas aves; μ = é uma constante inerente a todas as observações; C_i = é o efeito fixo de grupo de contemporâneos; S_j = é o efeito aleatório de macho j , com média 0 e variância σ_s^2 ; M_k = é o efeito fixo do genótipo para cada um dos marcadores SNPs avaliados

(*FGFBP1* e *FGFBP2*); e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijkl} , com média 0 e variância σ_e^2 .

Os efeitos dos diferentes haplótipos, bem como, dos diplótipos encontrados para os dois marcadores avaliados, foram avaliados a partir do modelo acima descrito, substituindo-se fator genótipos para o marcador (M_k) por H_k , para os quatro haplótipos ou por D_k para os diplótipos avaliados.

De acordo com Falconer e Mackay (2001), as estimativas do efeito aditivo (α) para cada polimorfismo podem ser obtidos pela diferença entre as médias dos genótipos homozigotos. Já os desvios atribuídos à dominância (δ) são estimados pela diferença entre a média genotípica dos heterozigotos em relação média dos genótipos dos dois homozigotos. As estimativas dos efeitos aditivos e desvios atribuídos à dominância foram avaliados por meio do Teste t de Student ($P < 0,05$).

As estimativas dos efeitos médios de substituição gênica para os polimorfismos avaliados em termos de genótipos, haplótipos e diplótipos, foram calculadas por meio de análises de regressão linear, considerando o número de alelos favoráveis (FALCONER; MACKAY, 2001).

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System* versão 9.2 (SAS Institute, 2004), por intermédio dos procedimentos PROC FREQ e PROC MIXED.

Construção dos haplótipos

Os haplótipos foram construídos com base nos dois SNPs identificados em 311 animais da população comercial através do programa PHASE 2.0 (STEPHENS et al., 2001). Os efeitos genéticos dos haplótipos foram analisados através do modelo misto descrito acima.

2.2.2 Resultados e Discussão

População experimental da Embrapa

Identificação de SNPs nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2*

O sequenciamento de regiões-alvo de 11 indivíduos F_1 permitiu a identificação de cinco sítios polimórficos. No gene *FGFBP1* foram encontrados três polimorfismos no exon 2: g.1849T>C (NCBI_ss494474886), g.1999G>A (NCBI_ss494474887) e g.2014G>A (NCBI_rs15620312). O SNP g.2014G>A foi selecionado para a genotipagem dos animais, e está descrito no banco de SNPs do NCBI. No gene

FGFBP2 foram identificados dois polimorfismos na região de 656 pb flanqueados pelo *primer FGFBP2* (Tabela 1), um no exon 1, g.465C>T (NCBI_rs14491579), e outro no intron 1, g.651G>A (NCBI_rs13664051), sendo esse último selecionado para a genotipagem dos animais. Os dois SNPs do gene *FGFBP2* já estão descritos no dbSNP do NCBI. As mutações identificadas nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* são sinônimas e não houve mudança de aminoácidos.

Caracterização das informações fenotípicas avaliadas

As estatísticas descritivas (número de observação e as estimativas de médias, desvios-padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos) das características fenotípicas estudadas na população F_2 da Embrapa são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Estatísticas descritivas das características avaliadas para o SNP g.2014G>A (*FGFBP1*) e o SNP g.651G>A (*FGFBP2*) na população F_2 Embrapa

Característica	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
PV35 (g)	178	824,00	121,97	14,80	480,00	1133,00
PV41 (g)	179	1048,46	167,56	15,98	407,00	1439,00
PV42 (g)	179	1011,53	163,74	16,19	402,00	1379,00
PES (g)	178	41,76	8,03	19,22	16,00	61,00
COXA (g)	179	222,63	41,61	18,69	67,00	323,00
PEITO (g)	179	167,11	32,59	19,50	55,00	248,00
CARC (g)	179	665,61	118,74	17,84	234,00	940,00
PB (g)	166	189,08	32,27	17,07	78,15	264,27
CZ (g)	166	27,08	5,09	18,79	11,06	40,33

PV35= peso vivo aos 35 dias; PV41= peso vivo aos 41 dias; PV42= peso vivo aos 42 dias; PES= peso dos pés; COXA= peso das coxas e sobrecoxas; PEITO= peso do peito com pele e ossos; CARC= peso da carcaça obtido através da soma das partes; PB= proteína bruta em gramas; CZ= cinzas em gramas

A população F_2 da Embrapa resultante do cruzamento de linhagens puras apresentou maior variabilidade comparada à população comercial.

Frequências genotípicas e alélicas

As frequências genotípicas e alélicas associadas aos polimorfismos 2014G>A (*FGFBP1*) e 651G>A (*FGFBP2*) são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) da população F₂ Embrapa

Polimorfismo	Frequência genotípica			Frequência alélica	
	GG	GA	AA	G	A
g.2014G>A (<i>FGFBP1</i>)	32,72	50,62	16,67	0,58	0,42
g.651G>A (<i>FGFBP2</i>)	53,66	46,34	-	0,77	0,23

O genótipo AA foi o menos frequente para o SNP 2014G>A, sendo que o genótipo GA prevaleceu sobre o genótipo GG. Para o SNP 651G>A, o genótipo AA não foi observado, e a frequência do genótipo GG foi maior que GA.

As frequências alélicas observadas para os SNPs 2014G>A e 651G>A demonstraram que o alelo “A” encontra-se com frequência inferior ao alelo G.

Associação dos polimorfismos com as características avaliadas

A importância das análises dos efeitos individuais dos marcadores moleculares nos estudos de associação com características fenotípicas reflete a possibilidade de identificação do tipo de interação intra-alélica que pode controlar uma determinada característica.

Os resultados de associação entre os SNPs nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* e as características avaliadas na população são mostradas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.2014G>A (*FGFBP1*) da população F₂ Embrapa

Característica	Efeito aditivo			Desvio de Aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PV35 (g)	35,06	29,39	0,24	-2,40	16,37	0,88	16,83	13,99	0,23
PV41 (g)	26,8	40,03	0,50	14,08	22,49	0,53	17,46	19,03	0,36
PV42 (g)	40,69	37,92	0,29	13,25	21,89	0,55	24,33	17,98	0,18
PES (g)	0,79	1,58	0,62	1,43	0,90	0,11	0,81	0,75	0,28
COXA (g)	6,36	9,62	0,51	5,01	5,32	0,35	4,60	4,58	0,32
PEITO (g)	8,12	8,15	0,32	2,97	4,56	0,52	4,91	3,87	0,21
CARC (g)	19,01	28,00	0,50	10,06	15,64	0,52	12,39	13,32	0,35
PB (g)	14,22	6,71	0,04*	5,47	4,57	0,23	8,28	3,21	0,01*
CZ (g)	2,73	1,29	0,04*	0,84	0,78	0,29	1,62	0,60	0,01*

*P<0,05

PV35= peso vivo aos 35 dias; PV41= peso vivo aos 41 dias; PV42= peso vivo aos 42 dias; PES= peso dos pés; COXA= peso das coxas e sobrecoxas; PEITO= peso do peito com pele e ossos; CARC= peso da carcaça obtido através da soma das partes; PB= proteína bruta em gramas; CZ= cinzas em gramas

As características PB e CZ apresentaram efeitos aditivo e de substituição alélica significativos (P<0,05) do polimorfismo g.2014G>A (*FGFBP1*). A presença de um alelo A proporcionou em média 8,28 g de proteína bruta e 1,62 g de cinzas a mais na carcaça nos animais heterozigotos e aproximadamente 16,56 g de PB e 3,24 g de cinzas nos animais homozigotos AA. As demais características fenotípicas apresentaram resultados não-significativos (P>0,05) dos efeitos avaliados.

Para o SNP g.651G>A (Tabela 4), em virtude de não ter sido verificado animais com genótipo AA, foram estimados efeitos de substituição alélica somente entre animais GG e GA. Efeitos significativos (P<0,05) foram evidenciados para todas as características descritas na Tabela 4. Aves com o genótipo GA apresentaram maior peso vivo nas diferentes idades e maior peso dos cortes quando comparados às aves com genótipo GG.

Tabela 5 - Estimativas do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g. 651G>A (*FGFBP2*) da população F₂ Embrapa

Característica	Efeito de substituição		
	β_{1i}	EP	P > t
PV35 (g)	35,52	14,65	0,02*
PV41 (g)	54,75	21,11	0,01*
PV42 (g)	57,40	20,41	0,01*
PES (g)	3,73	0,86	<.0001***
COXA (g)	15,09	4,86	0,002**
PEITO (g)	12,26	4,09	0,003**
CARC (g)	38,49	14,32	0,01*
PB (g)	12,58	4,23	0,004**
CZ (g)	2,56	0,70	0,0004***

*P<0,05, **P<0,001, ***P<0,0001

PV35= peso vivo aos 35 dias; PV41= peso vivo aos 41 dias; PV42= peso vivo aos 42 dias; PES= peso dos pés; COXA= peso das coxas e sobrecoxas; PEITO= peso do peito com pele e ossos; CARC= peso da carcaça obtido através da soma das partes; PB= proteína bruta em gramas; CZ= cinzas em gramas

População comercial

O uso de uma população experimental do tipo F₂, oriunda do cruzamento de linhagens melhoradas com objetivos diferentes, maximiza a possibilidade de detecção de QTLs oriundos de alelos que foram selecionados de maneira divergente entre as linhagens. No entanto, para que estes QTLs possam ser empregados em programas comerciais de melhoramento é necessário que sejam conduzidos estudos de validação em populações independentes e preferencialmente de programas comerciais. Desta forma, os animais da população comercial foram genotipados com base nos dois polimorfismos identificados nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* da população experimental.

Caracterização das informações fenotípicas avaliadas

As estatísticas descritivas (número de observação e as estimativas de médias, desvios-padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos) das características fenotípicas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Estatísticas descritivas das características avaliadas na população comercial

Característica	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
PS (g)	310	1528,90	160,00	10,46	970,00	1980,00
PA (g)	310	3101,37	278,09	8,97	1231,00	3753,00
PE (g)	310	2214,41	196,59	8,88	1318,00	2762,00
PEI (g)	310	641,76	81,71	12,73	356,00	892,00
PER (g)	310	757,13	75,81	10,01	358,00	918,00
pHf	311	6,18	0,20	3,31	5,44	6,83
EXSU (%)	310	2,20	0,75	34,35	0,96	6,27
CONG (%)	310	3,92	2,75	70,16	0,28	28,36
COZ (%)	311	14,13	4,01	28,41	4,63	25,16
PERDTOT (%)	311	20,19	5,68	28,10	8,63	56,18
L*	308	54,98	3,29	5,98	44,61	63,90
a*	308	5,94	1,24	20,92	3,42	10,42
b*	308	14,41	1,57	10,92	10,35	20,16
AREA (μm^2)	311	1791,91	546,33	30,48	776,35	3714,60
DIAMETRO (μm)	311	46,50	6,95	14,95	31,11	67,92
NCEL	311	9,60	3,40	35,46	2,00	19,50
FC (Kgf)	311	1,59	0,51	31,98	0,50	4,00

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs

As frequências genotípicas e alélicas obtidas dos dois polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) avaliados na população comercial são apresentadas na Tabela 7. Foi observado que o genótipo GA do SNP g.2014G>A do gene *FGFBP1* foi o mais freqüente, e o SNP g.651G>A (*FGFBP2*) apresentou com maior frequência o genótipo GG.

A frequência do alelo G do SNP g.2014G>A, foi ligeiramente maior, quando comparado ao alelo A. As frequências alélicas observadas do SNP g.651G>A demonstrou que o alelo G encontra-se praticamente fixado nesta população comercial.

Tabela 7 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) na população comercial

Polimorfismo	Frequência genotípica			Frequência alélica	
	GG	GA	AA	G	A
g.2014G>A (<i>FGFBP1</i>)	30,65	48,39	20,96	0,55	0,45
g.651G>A (<i>FGFBP2</i>)	92,6	6,11	1,29	0,96	0,04

Associação dos SNPs com as características estudadas

As estimativas do efeito aditivo, do desvio da aditividade e do efeito de substituição alélica do polimorfismo g.2014G>A no gene *FGFBP1* são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituições alélicas (β_{ii}) para características fenotípicas do SNP g.2014G>A (*FGFBP1*) na população comercial

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{ii}	EP	P > t
PS (g)	32,26	25,75	0,21	19,14	17,47	0,27	18,12	12,76	0,16
PA (g)	33,06	43,61	0,45	10,83	30,53	0,72	17,66	21,54	0,41
PE (g)	69,33	31,34	0,03**	4,99	21,26	0,81	35,15	15,51	0,02**
PEI (g)	19,82	11,90	0,10	3,42	7,93	0,67	10,23	5,90	0,08*
PER (g)	22,50	12,65	0,08*	1,20	8,64	0,89	11,37	6,26	0,07*
pHf	-0,06	0,03	0,07*	-0,01	0,02	0,71	-0,03	0,02	0,06*
EXSU (%)	0,15	0,13	0,23	-0,03	0,09	0,73	0,07	0,06	0,25
CONG (%)	0,05	0,43	0,92	0,33	0,29	0,26	0,05	0,21	0,81
COZ (%)	0,44	0,53	0,40	-0,27	0,36	0,46	0,20	0,26	0,45
PERDTOT (%)	0,61	0,78	0,44	0,12	0,53	0,81	0,32	0,39	0,42
L*	-0,25	0,45	0,59	-0,31	0,31	0,31	-0,15	0,23	0,50
a*	0,29	0,17	0,09*	0,09	0,12	0,45	0,15	0,08	0,07*
b*	0,08	0,22	0,71	0,07	0,16	0,63	0,05	0,11	0,66
AREA (μm^2)	39,42	68,51	0,57	47,88	46,34	0,30	0,07	0,19	0,73
DIAMETRO (μm)	-0,47	0,88	0,59	0,50	0,59	0,40	-15,17	33,95	0,66
NCEL	0,13	0,39	0,74	0,004	0,26	0,99	-0,19	0,43	0,66
FC (kgf)	0,13	0,07	0,07*	-0,03	0,05	0,52	0,06	0,03	0,08*

*P<0,10; **P<0,05

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIAMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

A característica PE apresentou resultados significativos de efeito aditivo e de substituição alélica do SNP g.2014G>A (*FGFBP1*). Aves com genótipo AA apresentaram em média 70 g a mais de peso eviscerado em relação às aves com genótipos GA e GG, sem apresentar qualquer efeito negativo sobre as características de qualidade de carne. Considerando que este alelo não está presente em alta frequência na população, existe potencial para um aumento na frequência deste alelo na população.

Os resultados das análises de associação entre o SNP g.651G>A no gene *FGFBP2* são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.651G>A

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PS (g)	106,80	80,88	0,19	-31,49	52,57	0,55	35,99	28,11	0,20
PA (g)	29,85	136,49	0,83	45,20	92,23	0,62	38,63	48,33	0,42
PE (g)	-61,63	98,83	0,53	44,84	64,84	0,49	-6,47	34,76	0,85
PEI (g)	-8,58	37,34	0,82	3,15	24,20	0,90	-2,56	13,08	0,85
PER (g)	-32,68	39,82	0,41	9,19	26,26	0,73	-11,36	14,01	0,42
pHf	-0,01	0,10	0,94	-0,03	0,07	0,63	-0,02	0,04	0,55
EXSU (%)	1,57	0,38	<.0001**	-0,53	0,25	0,03*	0,49	0,13	0,0003**
CONG (%)	-0,29	1,36	0,83	-0,15	0,88	0,87	-0,23	0,47	0,63
COZ (%)	0,01	1,65	1,00	1,18	1,09	0,28	0,64	0,58	0,27
PERDTOT (%)	1,10	2,45	0,66	0,60	1,60	0,71	0,88	0,85	0,30
L*	0,28	1,42	0,85	0,82	0,92	0,37	0,59	0,49	0,23
a*	1,22	0,53	0,02*	-0,59	0,35	0,09	0,29	0,18	0,12
b*	0,21	0,70	0,76	0,41	0,46	0,37	0,33	0,24	0,18
AREA (μm^2)	59,59	215,25	0,78	-32,81	140,05	0,82	11,69	74,82	0,88
DIÂMETRO (μm)	0,69	2,75	0,80	-0,54	1,79	0,76	0,05	0,96	0,96
NCEL	-0,35	1,24	0,78	0,55	0,80	0,49	0,13	0,43	0,76
FC (Kgf)	0,03	0,22	0,89	-0,06	0,15	0,69	-0,02	0,08	0,83

*P<0,05, **P<0,0001

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Os efeitos estimados de aditividade, dominância e substituição alélica do SNP g.651G>A (*FGFBP2*) foram significativos sobre EXSU. A estimativa do efeito médio

de substituição significa que cada alelo A está associado à perdas de aproximadamente 0,5 % a mais de água na carne das carcaças. Neste caso, o alelo desfavorável está em pequena frequência na população e o impacto deste marcador em programa de melhoramento para esta população seria pequeno.

A característica a* apresentou efeito aditivo significativo do SNP g.651 G>A. Para as demais características fenotípicas não foram observados resultados significativos ($P < 0,05$) dos efeitos avaliados.

Construção de haplótipos e diplótipos e suas frequências

Foram construídos quatro haplótipos baseados nos dois SNPs identificados neste estudo dos 311 animais da população comercial (Tabela 10).

Tabela 10 - Frequências dos haplótipos dos polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) na população comercial

Haplótipos	g.2014G>A	g.651G>A	Frequência (%)
H1	G	G	52,74
H2	G	A	2,10
H3	A	G	42,90
H4	A	A	2,26

Com base nos haplótipos encontrados na população comercial, foram obtidos seis diplótipos, que estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Frequências dos diplótipos observados nos polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) na população comercial

Diplótipos	Frequência (%)
H1H1	30,32
H3H1	44,84
H3H2	3,55
H3H3	17,42
H3H4	2,58
H4H4	0,97

Associações dos haplótipos e diplótipos com características de interesse econômico

Foram realizadas análises de associação entre haplótipos e diplótipos com as características fenotípicas. Os resumos das ANOVAs das fontes de variação haplótipos e diplótipos encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Resumo das análises de associação considerando os haplótipos e os diplótipos observados dos polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) na população comercial

Variável	Haplótipos				Diplótipos			
	GL Num	GL Den	Valor F	P > F	GL Num	GL Den	Valor F	P > F
PS (g)	3	268	1,08	0,3553	5	264	0,94	0,4540
PA (g)	3	268	1,50	0,2142	5	264	0,74	0,5961
PE (g)	3	268	2,56	0,0539*	5	264	1,10	0,3614
PEI (g)	3	268	3,22	0,0226**	5	264	0,89	0,4915
PER (g)	3	268	1,74	0,1576	5	264	0,79	0,5543
pHf	3	269	1,39	0,2444	5	265	1,11	0,3566
EXSU (%)	3	268	4,68	0,0031***	5	264	7,69	<,0001***
CONG (%)	3	268	0,33	0,8048	5	264	0,34	0,8885
COZ (%)	3	269	1,68	0,1697	5	265	1,21	0,3023
PERDTOT (%)	3	269	1,04	0,3755	5	265	1,06	0,3842
L*	3	266	0,53	0,6642	5	262	2,16	0,0590
a*	3	266	4,02	0,0076***	5	262	2,51	0,0305**
b*	3	266	1,05	0,3699	5	262	0,96	0,4399
AREA (μm^2)	3	269	0,22	0,8837	5	265	0,63	0,6773
DIÂMETRO (μm)	3	269	0,19	0,9022	5	265	0,54	0,7487
NCEL	3	269	0,22	0,8792	5	265	0,31	0,9086
FC (Kgf)	3	269	1,77	0,1518	5	265	1,66	0,1449

*P<0,10, **P<0,05, ***P<0,001

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; PHF= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Nas análises dos haplótipos, verificaram-se resultados significativos ($P<0,05$) para as características PEI, EXSU (%) e valores de a*. Para as demais características não foram observados resultados significativos. Já nas análises considerando os efeitos dos diplótipos formados, a partir dos haplótipos, resultados significativos ($P<0,05$) foram detectados das características EXSU e a*. As demais características avaliadas não apresentaram resultados significativos ($P>0,05$) para a fonte de variação diplótipos.

As estimativas de médias e erros padrão das características avaliadas segundo os quatro haplótipos podem ser observadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Estimativas de médias e erros padrão obtidas nas análises de associação considerando os haplótipos observados nos polimorfismos g.2014G>A (*FGFBP1*) e g.651G>A (*FGFBP2*) na população comercial

Variável	H1 (GG)		H2 (GA)		H3 (AG)		H4 (AA)	
	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP
PS (g)	1521,64	13,14	1553,56	42,47	1531,18	13,59	1588,49	41,51
PA (g)	3088,56	19,24	3020,10	73,99	3088,10	20,16	3225,21	74,60
PE (g)	2193,50	15,63	2102,53	51,73	2214,56	16,18	2264,40	52,20
PEI (g)	634,80	6,73 AB	591,01	19,38 B	639,07	6,91 AB	666,03	19,56 A
PER (g)	752,01	6,13	715,07	20,99	758,96	6,36	761,34	21,18
pHf	6,19	0,02	6,23	0,05	6,17	0,02	6,10	0,05
EXSU (%)	2,15	0,06 B	2,55	0,21 AB	2,20	0,06 B	2,81	0,20 A
CONG (%)	4,02	0,22	3,64	0,72	4,14	0,23	3,65	0,70
COZ (%)	14,27	0,25	16,01	0,89	14,62	0,26	14,41	0,86
PERDTOT (%)	20,40	0,41	22,15	1,29	20,90	0,42	20,79	1,26
L*	55,61	0,24	56,43	0,75	55,52	0,24	55,72	0,73
a*	5,74	0,08 B	5,55	0,28 B	5,81	0,09 B	6,62	0,27 A
b*	14,42	0,11	14,40	0,37	14,43	0,11	15,06	0,37
AREA (μm^2)	1818,01	35,15	1777,22	113,26	1797,11	36,29	1854,12	110,70
DIAM (μm)	46,83	0,46	46,26	1,45	46,56	0,47	47,09	1,41
NCEL	9,29	0,22	9,15	0,65	9,34	0,22	9,76	0,63
FC (Kgf)	1,57	0,03	1,65	0,12	1,64	0,03	1,52	0,12

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Pela Tabela 13, verifica-se que os haplótipos H1, H3 e H4 foram os que apresentaram maiores médias de PEI. Os haplótipos H2 e H4 foram os que apresentaram maiores perdas de água por exsudação (EXSU). Animais com haplótipo H4 apresentaram carnes com teores significativamente ($P<0,01$) mais elevado da cor vermelha (a*) em comparação aos demais haplótipos.

As estimativas de médias e erros padrão das características avaliadas segundo os diplótipos podem ser observadas na Tabela 14.

Por meio da Tabela 14, evidencia-se que aves com diplótipos H4H4 (AAAA), H3H2 (AGGA) e H3H3 (AGAG) apresentaram perdas de água por exsudação (EXSU) significativamente maiores quando comparados aos diplótipos H1H1 (GGGG), H3H1 (AGGG) e H3H4 (AGAA). O diplótipo H3H2 foi o que apresentou

maior luminosidade (L^*). Por outro lado, aves com diplótipo H4H4 foram as que apresentaram carnes com maiores teores de vermelho (a^*) quando comparadas aos demais diplótipos.

A cor da carne é influenciada pelo declínio do pH durante 24 h após o abate. Quanto mais rápida a queda do pH mais intensa a coloração vermelha (a^*), a qual está associada à rápida glicólise após a morte das aves (LE BIHAN-DUVAL et al., 2003). O pH 24h da carne de frango deve apresentar valores entre 5,7 e 5,9. Segundo Berri et al. (2005), o pH acima de 6,0 implica em maior capacidade de retenção de água e maior intensidade da cor vermelha. Gaya et al. (2011) reportaram associação entre a^* e pH24 ($-0,38 \pm 0,130$) e correlação genética alta entre a^* e EXSU ($0,50 \pm 0,130$). Os mesmos autores encontraram uma correlação negativa e alta ($-0,69 \pm 0,132$) entre pH24 e perdas de água por exsudação. Essas características parecem estar relacionadas entre si de acordo com suas correlações genéticas, e os genes *FGFBP1* e *FGFBP2* podem ser considerados possíveis candidatos em programas de seleção genética avícola.

Os resultados do presente estudo foram semelhantes ao encontrado por Berri et al. (2005) quanto a intensidade da cor vermelha, no entanto divergiram quanto a perda de água por exsudação que foi maior. A maior perda de água por exsudação não é desejável tanto para a indústria avícola como para o consumidor final. Esta perda provoca além de problemas relacionados com o rendimento e qualidade de processados, afeta as características sensoriais como suculência, palatabilidade, aparência e textura (BARBUT, 1997).

Os fatores de crescimento de fibroblasto (FGFs) são importantes para o desenvolvimento muscular esquelético, os quais induzem a proliferação de mioblastos e a diferenciação dos miócitos. As proteínas codificadas pelos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* estimulam a iniciação da transcrição dos fatores de crescimento de fibroblasto, podendo ser chamadas de carreadoras. Essas proteínas reconhecem regiões promotoras do DNA, e influenciam na transcrição de vários outros genes simultaneamente (KASTNER et al., 2000).

Badu et al. (2010) estudando uma população F_2 de frangos de corte, identificaram QTLs para peso vivo, comprimento de canela (SL) e diâmetro de canela (SD) nos GGA 2, 4 e 26. Os QTLs mapeados para peso vivo de 5 a 9 semanas de idade, SL e SD no cromossomo 4 estão localizados entre os marcadores *MCW0240-LEI0073* (198-220 cM) e associados com desenvolvimento

Tabela 14 - Estimativas de médias e erros padrão obtidas nas análises de associação considerando os diplótipos observados para os polimorfismos 2014G>A (*FGFBP1*) e 651G>A (*FGFBP2*) na população comercial

	H1H1 (GGGG)		H3H1 (AGGG)		H3H2 (AGGA)		H3H3 (AGAG)		H3H4 (AGAA)		H4H4 (AAAA)							
Característica	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP	Média	EP						
PS	1503,31	18,50	1539,58	15,60	1542,31	47,37	1526,79	23,07	1557,13	55,67	1627,63	90,62						
PA	3075,97	29,51	3099,23	24,60	3093,07	81,86	3076,76	37,42	3239,41	101,90	3247,21	155,18						
PE	2177,77	22,25	2205,94	18,83	2228,43	56,18	2234,90	27,33	2190,00	69,70	2359,11	107,53						
PEI	629,37	9,02	639,27	7,79	633,46	21,25	642,65	10,83	634,48	26,25	704,71	40,64						
PER	746,48	8,87	756,00	7,47	755,43	23,00	768,27	11,00	734,93	28,57	794,31	43,96						
pHf	6,21	0,02	6,18	0,02	6,12	0,06	6,16	0,03	6,18	0,07	6,00	0,11						
EXSU	2,15	0,08	C	2,13	0,07	C	2,84	0,22	B	2,24	0,10	BC	1,82	0,26	C	4,32	0,42	A
CONG	3,88	0,31		4,24	0,26		4,06	0,80		3,99	0,39		3,37	0,94		4,20	1,53	
COZ	14,38	0,37		14,18	0,31		16,35	0,98		14,91	0,46		14,39	1,15		14,61	1,87	
PERDTOT	20,33	0,57		20,56	0,48		23,26	1,44		21,03	0,70		19,48	1,69		22,94	2,76	
L*	55,90	0,33	AB	55,25	0,29	B	57,59	0,83	A	55,61	0,40	AB	55,01	0,97	AB	57,03	1,58	AB
a*	5,62	0,12	B	5,87	0,10	AB	5,53	0,31	B	5,77	0,15	AB	6,18	0,36	AB	7,31	0,59	A
b*	14,40	0,16		14,44	0,14		15,06	0,41		14,34	0,19		14,76	0,49		15,52	0,79	
AREA	1812,59	50,13		1831,67	42,47		1876,87	126,12		1756,37	61,50		1707,96	148,27		2072,16	241,43	
DIAMETRO	46,78	0,65		46,94	0,55		47,46	1,61		46,17	0,79		45,20	1,90		49,83	3,09	
NCEL	9,28	0,30		9,32	0,25		9,26	0,73		9,25	0,36		10,31	0,85		9,06	1,39	
FC	1,55	0,05		1,58	0,04		1,66	0,13		1,73	0,06		1,39	0,15		1,65	0,25	

Médias seguidas por uma mesma letra na linha não diferem entre si ($P>0,05$ ou $P>0,01$) pelo Teste *t* de Student

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; diâmetro= diâmetro de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

muscular e crescimento ósseo. Nesta região do GGA4 encontram-se os genes candidatos posicionais, *FGFBP1* e *FGFBP2*.

Em outro estudo mais recente, Nassar et al. (2012) identificaram um QTL no GGA4 entre 151,5 e 160,5 cM numa população F₂ de frangos (*New Hampshire* x *White Leghorn*) para peso vivo, peso de carcaça, peso de peito, peso de pernas e peso de asas. Nessa região, esses autores também relataram que os genes *FGFBP1* e *FGFBP2* podem influenciar a qualidade da carcaça e o desenvolvimento muscular desses animais.

Em galinhas foram identificados vários polimorfismos nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2*, porém não existem trabalhos de identificação e associações de polimorfismos nestes genes com características de interesse econômico na avicultura. Esses genes podem apresentar contribuições importantes para o desenvolvimento muscular, já que estão relacionados com fases de embriogênese, diferenciação e proliferação celular em galinhas (MARIE et al., 2002; GIBBY et al., 2009).

Neste estudo foram identificados polimorfismos de base única (SNP) nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* localizados em uma região de QTL para peso vivo aos 35 e 41 dias entre os marcadores *MCW0240-LEI0063* associados à características de crescimento e qualidade de carne (PEI, EXSU, L* e a*), o que corrobora com os estudos de Badu et al. (2010) e Nassar et al. (2012). Estas características são consideradas de suma importância para a indústria avícola, já que a seleção para o rápido crescimento em aves relacionada com a qualidade da carne.

Os resultados significativos nas diferentes populações mostraram que os polimorfismos identificados nos genes *FGFBP1* e *FGFBP2* localizados em regiões de QTLs podem ser considerados como possíveis genes candidatos em programas de melhoramento genético avícola através da seleção assistida por marcadores moleculares das características relacionadas com crescimento, rendimento de carcaça e qualidade da carne.

2.3 Conclusões

Os polimorfismos identificados nos genes candidatos *FGFBP1* e *FGFBP2* das populações estudadas (experimental e comercial) podem contribuir para um melhor

entendimento das relações existentes entre esses genes e suas associações com características de interesse econômico na avicultura.

Outros estudos podem ser realizados com o objetivo de buscar outros genes no intervalo onde foi mapeado o QTL, ou próximo a ele que estejam associados com características de crescimento e qualidade de carne em galinhas.

Referências

AIGNER, A.; BUTSCHEID, M.; KUNKEL, P.; KRAUSE, E.; LAMSZUS, K.; WELLSTEIN, A.; CZUBAYKO, F. An FGF-binding protein FGF-BP exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. **International Journal of Cancer**, New York, v. 92, n. 4, p.510-517, 2001.

AIGNER, A.; RAY, P.E.; CZUBAYKO, F.; WELLSTEIN, A. Immunolocalization of an FGF-binding protein reveals a widespread expression pattern during different stages of mouse embryo development. **Histochemistry and Cell Biology**, Berlin, v. 117, n. 1, p. 1-11, 2002.

AMBO, M.; MOURA, A.S.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.; BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; CAMPOS, R.L.; BOSCHIERO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L.; Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 200-208, 2009.

ANKRA-BADU, G.A.; LE BIHAN-DUVAL, E.; MIGNON-GRASTEAU, S.; PITEL, F.; BEAUMONT, C.; DUCLOS, M.J.; SIMON, J.; CARRÉ, W.; PORTER, T.E.; VIGNAL, A.; COGBURN, L.A.; AGGREY, S.E. Mapping QTL for growth and shank traits in chickens divergently selected for high or low body weight. **Animal Genetics**, Oxford, v. 41, n. 4, p. 400-405, 2010.

ANTHONY, N.B. A review of genetics practices in poultry: efforts to improve meat quality. **Journal of Muscle Food**, Malden, v. 9, n. 1, p. 25-33, 1998.

BARBUT, S. Occurrence of pale soft exudative meat in mature turkey hens. **British Poultry Science**, London, v.38, n. 1, p. 74-77, 1997.

BARON, E.E.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.B.; BOSCHIERO, C.; RUY, D.C.; NONES, K.; ZANELLA, E.L.; ROSARIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 117-124, 2010.

BEER, H.D.; BITTNER, M.; NIKLAUS, G.; MUNDING, C.; MAX, N.; GOPPELT, A.; WERNER, S. The fibroblast growth factor binding protein is a novel interaction partner of FGF-7, FGF-10 and FGF-22 and regulates FGF activity: implications for epithelial repair. **Oncogene**, Basingstoke, v. 24, n. 34, p. 5269-5277, 2005.

BERRI, C.; DEBUT, M.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; ARNOULD, C.; BOUTTEN, B.; SELLIER, N.; BAÉZA, E.; JEHL, N.; JÉGO, Y.; DUCLOS, M.J.; LE BIHAN-DUVAL, E. Variations in chicken breast meat quality: implications of struggle and muscle glycogen content at death. **British Poultry Science**, London, v. 46, n. 5, p. 572-579, 2005.

CZUBAYKO, F.; LIAUDET-COOPMAN, E.D.E.; AIGNER, A.; TUVESON, A.T.; BERCHEM, G.; WELLSTEIN, A. A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch for human cancer. **Nature Medicine**, New York, v. 3, n. 10, p. 1137-1140, 1997.

DEKKERS, J.C.M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 82, n. 13, Supplementum E, p. 313-328, 2004.

DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A.A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. **Poultry Science**, Ithaca v.78, n. 5, p.743-746, 1999.

ELGAAEN, B.V.; HAUG K.B.F.; WANG, J.; OLSTAD, O.K.; FORTUNATI, D.; ONSRUD, M.; STAFF, A.C.; SAUER, T.; GAUTVIK, K.M. POLD2 and KSP37 (FGFBP2) Correlate Strongly with Histology, Stage and Outcome in Ovarian Carcinomas. **Plos One**, San Francisco, v. 5, n. 11, p. 13837, 2010.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II, Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, n. 3, p. 186-194, 1998.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introducción a la genética cuantitativa**. 4.ed. Zaragoza, Espanha, 2001. 469p.

GAO, Y. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. **Meat Science**, Barking, v. 77, n. 1, p. 37-45, 2007.

GAYA, L.G.; FERRAZ, J.B.S.; REZENDE, F.M.; MOURÃO, G.B.; MATTOS, E.C.; ELER, J.P.; MICHELAN FILHO, T. Heritability and genetic correlations estimates for performance, carcass and body composition traits in a male broiler line. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, n.5 p. 837-843, 2006.

GAYA, L.G.; MOURÃO, G.B.; FERRAZ, J.B.S.; MATTOS, E.C.; COSTA, A.M.M.A. C.; FILHO, T.M.; ROSA, A.F.; FELÍCIO, A.M.; ELER, J.P. Estimates of heritability and genetic correlations for meat quality traits in broilers. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, p. 620-625, 2011.

GIBBY, K.A.; MCDONNELL, K.; SCHMIDT, M.O.; WELLSTEIN, O. A distinct role for secreted fibroblast growth factor-binding proteins in development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 21, p. 8585-8590, 2009.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 3, p. 195-202, 1998.

KAGAN, B.L.; HENKE, R.T.; CABAL-MANZANO, R.; STOICA, G.E.; NGUYEN, Q.; WELLSTEIN, A. Complex regulation of the fibroblast growth factor-binding protein in MDA-MB-468 breast cancer cells by CCAAT/enhancer-binding protein beta. **Cancer Research**, Baltimore, v. 63, n. 7, p. 1696-1705, 2003.

KASTNER, S.; ELIAS, M.C.; RIVERA, A. J.; YABLONKA- REUVENI Z. Gene expression patterns of the fibroblast growth factors and their receptors during myogenesis of rat satellite cells. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 48, n. 8, p. 1079-1096, 2000.

LE BIHAN-DUVAL E.; BERRI, C.; BAEZA, E.; SANTE ,V.; ASTRUC, T.; RÉMIGNON, H.; LE POTTIER, G.; BENTLEY, J.; BEAUMONT, C.; FERNANDEZ, X. Genetic parameters of meat technological quality traits in a grand-parental commercial line of turkey. **Genetics, Selection, Evolution**, Paris, v. 35, n.6, p. 623-635, 2003.

LE BIHAN-DUVAL, E.; DEBUT, M.; BERRI, C.M.; SELIER, N.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; JÉGO, Y.; BEAUMONT, C. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. **BMC Genetics**, Lunger, v. 9, n. 53, p.234-244, 2008.

MARIE, P.J.; DEBIAIS, F.; HAY, E. Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 17, n. 3, p. 877-885, 2002.

NASSAR, M.K.; GORAGA, Z.S.; BROCKMANN, G.A. Quantitative trait loci segregating in crosses between New Hampshire and White Leghorn chicken lines. II Muscle weight and carcass composition. **Animal Genetics**, Online version of Record published before inclusion in an issue/DOI: 10.1111/j. 1365-2052.2012.02344.x, 2012.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Acesso em: 02 abr. 2012.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; KLEIN, C.; PINTO, L.F.B.; MOURA, A. S.A.M.T.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; AMBO, M.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIEIRO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with chemical composition of the chicken carcass. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2012.

PARK, G.B.; MOON, S.S.; KO, YD.; HA, J.K.; Lee, J.G.; Chang, H.H.; Joo, S.T. Influence of slaughter yield and quality grades of Hanwoo (Korean native cattle) carcasses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 1, p. 129-136, 2002.

ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Genotypic characterization of microsatellite markers in broiler and layer selected chicken lines and their reciprocal F₁s. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 66, n. 2, p. 150-158, 2009.

SAS. SAS/STAT User's Guide: version 9.1. SAS Institute, North Caroline, 5136, 2004.

SEWALEN, A.; MORRICE, D.M.; LAW, A.; WINDSOR, D.; HALEY, C.S.; IKEOBI, C.; 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, n. 12, p. 1775-1781, 2002.

STEPHENS, M.; SMITH, N.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 68, n. 4, p. 978-989, 2001.

TASSI, E.; AL-ATTAR, A.; AIGNER, A.; SWIFT, M.R.; MCDONNELL, K.; KARAVANOV, A.; WELLSTEIN, A. Enhancement of fibroblast growth factor FGF activity by an FGF-binding protein. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 40, p. 247-253, 2001.

WU, D.Q.; KAN, M.K.; SATO, G.H.; OKAMOTO, T.; SATO, J.D. Characterization and molecular cloning of a putative binding protein for heparin-binding growth factors. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 167, p. 78-85, 1991.

YANG, A.; EMMERSON, D.A.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B. Heterosis and developmental stability of body and organ weight at hatch for parental line broiler breeders and specific crosses among them. **Poultry Science**, Ithaca, v.78, n. 7, p.942-948, 1999.

3 IDENTIFICAÇÃO E ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CANDIDATOS *CAPN1* E *CAPN3* RELACIONADOS COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E QUALIDADE DA CARNE EM GALINHAS

Resumo

A qualidade da carne é de suma importância para a indústria avícola e está associada com a satisfação do consumidor. O gene *Calpain 1* (*CAPN1*) está relacionado com o processo de maciez da carne no pós-morte, e o gene *Calpain 3* (*CAPN3*) desempenha um papel importante na organização miofibrilar e está associado com distrofia muscular e crescimento. O objetivo deste trabalho foi identificar polimorfismos nestes genes e realizar a associação dos polimorfismos com características de interesse econômico na avicultura. Para a identificação de polimorfismos foram utilizadas 11 aves (F_1) pertencentes à uma população experimental da Embrapa Suínos e Aves, e foram encontrados quatro polimorfismos de base única (SNP) no gene *CAPN1* e um SNP no gene *CAPN3*. Um polimorfismo de cada gene foi selecionado para a genotipagem de 152 galinhas da geração F_2 da população experimental da Embrapa e 311 frangos de corte de uma população comercial. O polimorfismo g.2554T>C (*CAPN1*) foi associado com peso vivo aos 35 a 42 dias, peso da coxa, peso do peito, peso da carcaça e teor de luminosidade da carne. O SNP g.15486C>T (*CAPN3*) foi associado com rendimento da coxa, perdas de água por cozimento e força de cisalhamento da carne. Os resultados observados sugerem a possibilidade da utilização de marcadores moleculares nos genes *CAPN1* e *CAPN3* como ferramentas auxiliares para programas de melhoramento avícola de características relacionadas ao desempenho e qualidade da carne.

Palavras-chave: Avicultura; Força de cisalhamento; Marcador genético; *Calpain*

Abstract

Meat quality is an significant importance for the poultry industry and is associated with consumer satisfaction. *Calpain 1* gene (*CAPN1*) relates to the tenderness process of the meat *post-mortem* and *Calpain 3* gene (*CAPN3*) plays an important role in myofibrillar organization and growth. The objective of this study was to identify polymorphisms in these genes and associate the polymorphisms with traits of economic interest in poultry. To identify the polymorphisms, we used 11 chickens (F_1) belonging to an experimental population at Embrapa Swine and Poultry, and we found four single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CAPN1* gene and one SNP in the *CAPN3* gene. A polymorphism of each gene was selected for the genotyping of 152 chickens of the F_2 experimental population from Embrapa and 311 broilers from a commercial population. Polymorphism g.2554T> C (*CAPN1*) was associated with body weight at 35 to 42 days, thigh weight, breast weight, carcass weight and meat lightness content. The SNP g.15486C> T (*CAPN3*) was associated with thigh yield, water loss during cooking and meat shear force. The results suggest the possibility of using molecular markers in *CAPN1* and *CAPN3* genes as auxiliary tools for poultry breeding programs related to performance and meat quality traits.

Keywords: Poultry; Shear force; Genetic marker; Calpain

3.1 Introdução

O melhoramento genético é de fundamental importância para o crescimento econômico da agropecuária e, neste sentido, a avicultura é a atividade que apresentou maior índice de desenvolvimento com o melhoramento das linhagens nas últimas décadas.

O sucesso da produção da carne de frango está fortemente relacionado com melhorias no crescimento e rendimento de carcaça, e com isso, o mercado avícola tem se destacado na produção das partes nobres do frango e produtos processados (Le Bihan-Duval et al., 2003). Desse modo, a seleção intensa para essas características pode ter levado também a alterações nos atributos de qualidade da carne, principalmente na maciez (DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999).

De acordo com Park et al. (2002), as características relacionadas à qualidade da carne são de grande importância tanto para a indústria processadora, quanto para os consumidores. Por isso, estas características qualitativas passaram a ser consideradas como objeto de estudos nos programas de seleção.

A utilização da genômica na produção animal tem possibilitado importantes avanços na qualidade de produtos de origem animal pelo aumento da eficiência nos cruzamentos e no reconhecimento da fisiologia animal (HOCQUETTE et al., 2007).

Com o avanço da biotecnologia, novas metodologias de marcadores moleculares estão sendo utilizadas em programas de melhoramento genético de aves, sendo os polimorfismos de base única (SNP), um dos mais utilizados. SNPs podem ser utilizados como marcadores genéticos com o objetivo de acompanhar os padrões de hereditariedade das regiões cromossômicas de geração em geração e são consideradas ferramentas eficazes no estudo de fatores genéticos associadas às características de interesse (BROOKES, 1999).

Os marcadores SNPs são fundamentais para a descoberta de novas estratégias para mapeamento fino de QTLs e em estudos de genes candidatos. Estes genes são denominados candidatos por estarem posicionados em uma região de QTL, ou por serem genes conhecidos biologicamente por estarem envolvidos no desenvolvimento ou fisiologia de uma determinada característica de interesse. Eles podem ser estruturais ou genes de vias regulatórias ou bioquímicas afetando a expressão da característica (BRYNE; McMULLEN, 1996).

No presente estudo, os genes *Calpaína 1* (*CAPN1*) e *Calpaína3* (*CAPN3*) foram selecionados com base em estudos onde foram encontradas evidências

funcionais de que estes genes estão relacionados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne.

Calpaínas são proteases neutras dependentes de cálcio (Ca^{2+}), as quais incluem isoformas onipresentes e tecido-específico em organismos superiores. Em mamíferos, os tipos de isoformas das calpaínas μ e m são diferenciadas pela concentração de Ca^{2+} necessária para a atividade da protease na sequência de μM e mM de Ca^{2+} respectivamente, de acordo com Sorimachi e Suzuki (2001).

O gene *CAPN1* codifica uma proteína protease cisteína, a qual degrada proteínas miofibrilares no período *postmortem* e é considerada a enzima primária no processo de maciez da carne no *postmortem* (KOOHMARAIE, 1996). Em galinhas, existem 118 SNPs descritos no gene *CAPN1* de acordo com o banco de dados NCBI (2012).

De acordo com Poussard et al. (1996), a *CAPN3* está relacionada principalmente com distrofia muscular e crescimento, e desempenha um papel importante na integridade miofibrilar. Este gene está especificamente ligado ao músculo conectivo, em uma região onde a proteólise tem sido associada com a maciez da carne no *postmortem* (TAYLOR et al., 1995). A *CAPN3* está localizada no cromossomo 5 em galinhas. Este gene apresenta 24 exons e 23 introns, num total de 24.011 pares de bases, e sua proteína possui 810 aminoácidos. Já estão descritos 152 SNPs na galinha no banco de dados público do NCBI (2012).

Este estudo teve como objetivos (1) identificar polimorfismos nos genes candidatos *CAPN1* e *CAPN3* e (2) realizar estudos de associação desses SNPs com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em duas populações (experimental e comercial) de frangos.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

Populações

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas duas populações de galinhas, uma F_2 experimental (Embrapa Suínos e Aves) e outra comercial de frangos de corte.

A população experimental utilizada foi de uma linhagem F_2 (TCTC) desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves através de cruzamentos entre machos da linhagem de corte (TT) e fêmeas da linhagem de postura (CC). CC é uma linhagem

de postura originada da raça *White Leghorn*, na qual o programa de seleção objetivou melhorar a produção de ovos, peso do ovo, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade de ovo, conversão alimentar, viabilidade e redução do peso corporal. TT é uma linhagem de corte originada das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*, que foi selecionada para melhorar conversão alimentar, peso corporal, rendimentos de carcaça e de peito, fertilidade, viabilidade, redução da gordura abdominal e síndromes metabólicas (ascite e morte súbita).

A geração F_1 foi formada a partir de sete machos TT cruzados com sete fêmeas CC, gerando aproximadamente 50 animais F_1 TC. A formação da geração F_2 procedeu-se de um total de sete machos e 21 fêmeas na proporção de um macho para três fêmeas de cada família da geração F_1 , onde cada macho F_1 foi acasalado com três fêmeas F_1 não aparentadas. Cada fêmea F_1 produziu aproximadamente 100 animais F_2 , em um total de aproximadamente 2.100 progênies, obtidas ao longo de 17 incubações em oito meses. Rosário et al. (2009) apresentam estas duas linhagens (TT e CC) com maiores detalhes.

O estudo da população comercial utilizou um banco de dados do rebanho elite comercial (também designado rebanho de *pedigree*) de frangos de corte, no qual é realizado o processo de seleção para composição de uma linhagem macho de frangos de corte da empresa. As informações dos irmãos completos destas aves foram utilizadas no processo de seleção, programa denominado *sib test*. Este teste tem a finalidade de auxiliar a escolha dos melhores indivíduos durante o programa de seleção do rebanho elite, o qual origina todas as aves da linhagem. Esse banco de dados da população comercial é mantido pelo Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia (GMAB) do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP desde 2002.

As aves foram alojadas em galpões da Granja de Pedigree desta empresa e criadas com programas de vacinação e manejo nutricional semelhantes aos preconizados para frangos de corte, com a diferença de estarem em um ambiente rigidamente controlado, visando garantir a saúde e o desempenho destas aves.

Ao atingirem 42 dias de idade, cada lote de animais *sib test*, composto por machos e fêmeas, foi sexado e alojado em caixas, sendo transportados ao Matadouro - Escola do campus da USP em Pirassununga. Foram coletados dados de desempenho, carcaça e histológicos de 1.300 aves e destas, todas foram submetidas à coleta de informações de qualidade de carne, as quais foram

realizadas no referido Matadouro, no Laboratório de Carnes, no Laboratório de Citologia e Imunohistoquímica e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

Fenótipos e extração de DNA

Na população experimental F₂ da Embrapa foram avaliadas as seguintes características fenotípicas: **desempenho** (peso ao nascer, peso aos 35 dias, peso aos 41 dias, peso vivo aos 42 dias, ganho de peso de 35 a 41 dias, consumo de ração de 35 a 41 dias, eficiência alimentar de 35 a 41 dias, comprimento do intestino, conversão alimentar de 35 a 41 dias), **carcaça** (peso vivo aos 35 dias, peso vivo aos 41 dias, peso vivo aos 42 dias, peso dos pés, peso das coxas e sobrecoxas, peso do peito com pele e ossos, peso da cabeça, peso das asas, peso do dorso, peso da carcaça obtido através da soma das partes, rendimento de pés, rendimento de coxas e sobrecoxas, rendimento de peito, rendimento de cabeça, rendimento de asas, rendimento de dorso, e rendimento de carcaça), **orgãos** (peso do fígado, peso do coração, peso da moela, peso do pulmão, hematócrito, rendimento de fígado, rendimento de coração, rendimento de moela e rendimento de pulmão), **gordura** (peso da gordura abdominal, rendimento de gordura abdominal, níveis séricos de colesterol total, de triglicérides e de colesterol + triglicerídeos), e **composição** (porcentagem de matéria seca na carcaça, porcentagem de umidade na carcaça, porcentagem de proteína bruta na matéria seca, porcentagem de extrato etéreo na matéria seca, porcentagem de cinzas na matéria seca, porcentagem de proteína bruta na matéria natural, porcentagem de extrato etéreo na matéria natural, porcentagem de cinzas na matéria natural, proteína bruta em gramas, extrato etéreo em gramas e cinzas em gramas).

O DNA genômico de 152 aves das gerações F₁ e F₂ da população experimental foi extraído a partir de amostras de sangue através de DNAzol[®] (Life Technologies). Após a identificação de cada amostra, a quantidade de DNA genômico extraído foi quantificada em espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-20000). As amostras foram diluídas na concentração padrão de 20 ng DNA μL^{-1} e armazenadas em *freezer* a -18 °C. A qualidade do DNA genômico obtido foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% e corada com GelRed[™] (Life Technologies).

Foram avaliadas na população comercial as características relacionadas ao **desempenho** (peso à seleção aos 38 dias e peso ao abate), **carcaça** (peso de carcaça eviscerada, peso de peito desossado e sem pele, peso de pernas), **qualidade de carne** (pH 24 horas após o abate, valores colorimétricos medidos 24 horas após o abate: parâmetros L* - luminosidade, a* - teor de vermelho, b* - teor de amarelo), perdas de água por exsudação, perdas de água por descongelamento, perdas de água por cozimento, força de cisalhamento), e **histológicas** (diâmetros das fibras musculares, as áreas das fibras musculares e número de fibras musculares por campo histológico visualizado). As características de qualidade de carne e histológicas foram avaliadas no músculo *Pectoralis major* em sua porção crânio-ventral.

A partir dos fragmentos de tecido muscular embebidos em parafina foi extraído o DNA genômico através de cortes histológicos, e em seguida, foram adicionados uma solução de lise (NaOH 200 mM) e uma solução neutralizadora (HCl 200 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,5). As amostras foram armazenadas em *freezer* a -18°C. A qualidade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo GelRed™ (Life Technologies). Também foi mensurada a quantidade de DNA extraído através da espectrofotometria em absorvância a 260 nm.

Seleção dos genes candidatos

Os genes *Calpaína 1* (*CAPN1*) e *Calpaína 3* (*CAPN3*) foram selecionados com base em estudos que reportaram evidências funcionais de que estes genes estão relacionados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne.

Condições da PCR e sequenciamento

Foi desenhado um par de *primers* para cada gene, para amplificar regiões de exons e introns a partir de sequências da galinha para os genes *CAPN1* e *CAPN3* depositadas no *GenBank* (nº de acesso: NC_006090.3 e NC_006092.3) (NCBI, 2012) com auxílio do programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Através do programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>) foi analisada a qualidade desses *primers* (Tabela15).

Tabela 15 - Primers desenhados para amplificar fragmentos dos genes *CAPN1* e *CAPN3* da galinha

Gene	Sequência dos <i>Primers</i> (5' - 3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)
<i>CAPN1</i>	D - GCTCACAATGTAGGCTGGTTC R - AGGGGTCAGGCAAGTGTAGA	732	58
<i>CAPN3</i>	D - AGAGTGGAACCTTCATTGATG R - GTAGCATAGCCCCCATCAGA	447	58

A amplificação dos fragmentos dos genes estudados foi feita por PCR, que foi realizada em um volume final de 25 µL, e consistiu de 20 ng DNA genômico, 2,5 µL de tampão 10x (50 mM de KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,5), 0,3 mM de MgCl₂ (50 mM), 0,4 mM de dNTP (10 mM), 2 pmol de cada *primer*, 1U de enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Life Technologies™). Para a amplificação desses fragmentos foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por um minuto, 30x (95 °C por um minuto, temperatura de anelamento específica para cada par de *primer* por um minuto, extensão a 72 °C por um minuto) e extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram avaliados em gel de agarose (1%).

Os produtos de PCR foram purificados e a seguir foi realizada a reação de sequenciamento de acordo com o protocolo do Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram purificadas e aplicadas no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser® (Applied Biosystems). As sequências dos nucleotídeos foram editadas, montadas e analisadas usando os programas *Phred*, *Phrap* e *Consed* (EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998).

Genotipagem dos polimorfismos

Detectados os polimorfismos nos animais F₁ da população da Embrapa, dois SNPs, sendo um de cada gene (*CAPN1* e *CAPN3*), foram selecionados com base em duas famílias (F₁) de irmãos completos mais informativas (genótipos heterozigotos) para a genotipagem de 152 animais da geração F₂ da Embrapa e 311 frangos de corte da população comercial através da discriminação alélica pelo sistema de detecção *TaqMan*® (*Applied Biosystems*), com sondas específicas para cada alelo. As reações foram realizadas no equipamento *LightCycler 480 System II*® (Roche) pelo método *Endpoint Genotyping* com formato de detecção *Dual Color Hydrolysis Probe* com fluorescências *FAM* e *VIC*.

As reações consistiram de 1 µL de DNA genômico (20 ng.µL⁻¹), 5 µL de *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* (Life Technologies) composta por tampão *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, AmpErase[®] uracil-N-glycosylase (UNG) e dNTPs, e 0,25 µL de Custom *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay* (*Aplied Biosystems*) que inclui *primers* específicos e sondas do tipo *TaqMan*[®] e 3,75 µL de água ultrapura para completar um volume de 10 µL.

As etapas das condições de ciclagem foram: pré-incubação, amplificação e resfriamento. As temperaturas da pré-incubação foram 50 °C por 2 minutos com taxa de rampa de 4,40 °C/s para ativação da UNG, e 95 °C por 10 minutos a 4,40 °C/s para ativação da *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*. As condições de amplificação foram 95 °C por 15 segundos a 4,40 °C/s (desnaturação), 60 °C por um minuto a 2,20 °C/s (anelamento) e 72 °C por um segundo a 4,40 °C/s (extensão) consistindo 45 ciclos. O resfriamento foi a 40 °C por 10 segundos a 1,50 °C/s.

Os resultados foram analisados através do programa LightCycler 480 SW 1,5 (Roche).

Análises estatísticas

As frequências genotípicas e alélicas foram estimadas para cada *locus*, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente, conforme descrito por Falconer e Mackay (2001).

Para avaliar as implicações dos resultados moleculares em relação às características avaliadas nas aves, foram utilizadas análises individuais com cada característica sendo considerada uma variável dependente.

Os efeitos dos genótipos encontrados para os dois marcadores (*CAPN1* e *CAPN3*) foram avaliados a partir do modelo geral apresentado abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + M_k + e_{ijkl}$$

em que: Y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado para uma dada característica nas aves; μ = é uma constante inerente a todas as observações; C_i = é o efeito fixo de grupo de contemporâneos; S_j = é o efeito aleatório de macho j , com média 0 e variância σ_s^2 ; M_k = é o efeito fixo do genótipo para cada um dos marcadores SNPs avaliados (*CAPN1* e *CAPN3*); e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijkl} , com média 0 e variância σ_e^2 .

De acordo com Falconer e Mackay (2001), as estimativas do efeito aditivo (α) para cada polimorfismo podem ser obtidos pela diferença entre as médias dos genótipos homozigotos. Já os desvios atribuídos à dominância (δ) são estimados pela diferença entre a média genotípica dos heterozigotos em relação média dos genótipos dos dois homozigotos. As estimativas dos efeitos aditivos e desvios atribuídos à dominância foram avaliados por meio do Teste *t* de Student ($P < 0,05$).

As estimativas dos efeitos médios de substituição gênica para os polimorfismos avaliados em termos de genótipos foram calculadas por meio de análises de regressão linear, considerando o número de alelos favoráveis (FALCONER; MACKAY, 2001).

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System* versão 9.2 (SAS Institute, 2004), por intermédio dos procedimentos PROC FREQ e PROC MIXED.

3.2.2 Resultados e Discussão

População experimental da Embrapa

Identificação de polimorfismos nos genes *CAPN1* e *CAPN3*

O sequenciamento de regiões-alvo permitiu a identificação de cinco sítios polimórficos nos dois genes estudados. Foram identificados quatro polimorfismos localizados no intron 5 do gene *CAPN1* (GGA3): g.2456T>A (ss494474888), g.2460C>T (ss494474889), g.2554T>C (ss494474890), g.2629C>T (ss494474891), sendo que o SNP g.2554T>C foi selecionado para a genotipagem dos animais. Apenas o polimorfismo g.15486C>T (ss494474891), localizado no exon 3 foi identificado no gene *CAPN3* (GGA5), o qual é uma mutação sinônima e não houve mudança de aminoácido.

Em galinhas, 118 e 152 SNPs foram descritos nos genes *CAPN1* e *CAPN3*, respectivamente (NCBI, 2012). Os cinco novos SNPs identificados neste estudo foram depositados no banco de dados de SNPs do NCBI (dbSNP - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Informações descritivas dos fenótipos avaliados

As estatísticas descritivas (número de observação e as estimativas de médias, desvios-padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos) para as características fenotípicas analisadas são apresentadas na Tabela 16.

Tabela 16 - Estatísticas descritivas das características avaliadas na população F₂ Embrapa

Característica	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
PV35	152	788,20	123,52	15,67	554,00	1085,00
PV41	152	1001,92	170,80	17,05	578,00	1398,00
PV42	152	963,82	169,91	17,63	549,00	1391,00
COXA	152	206,15	41,89	20,32	109,00	329,00
PEITO	152	157,66	30,96	19,64	77,00	237,00
CARC	152	625,61	116,32	18,59	341,00	944,00
REND_COXA	152	21,32	1,35	6,34	18,31	31,40

PV35= peso vivo aos 35 dias; PV41= peso vivo aos 41 dias; PV42= peso vivo aos 42 dias; PES= peso dos pés; COXA= peso das coxas e sobrecoxas; PEITO= peso do peito com pele e ossos; CARC= peso da carcaça obtido através da soma das partes; REND_COXA= rendimento de coxas e sobrecoxas

Como esperado, por ter sido originada do cruzamento entre uma linhagem de corte e uma de postura, a população F₂ apresentou alta variabilidade nas características estudadas.

Frequências genotípicas e alélicas

As frequências genotípicas e alélicas dos SNPs g.2554T>C (*CAPN1*) e g.15486C>T (*CAPN3*) são apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2554T>C (*CAPN1*) e g.15486C>T (*CAPN3*) da galinha

Polimorfismo	Frequências genotípicas			Frequências alélicas	
g.2554T>C	f(TT)= 30,20	f(TC)= 46,31	f(CC)= 23,49	f(T)= 0,53	f(C)= 0,47
g.15486C>T	f(CC)= 11,54	f(CT)= 53,85	f(TT)= 34,62	f(C)= 0,38	f(T)= 0,62

O genótipo TC do SNP g.2554T>C (*CAPN1*) foi o mais frequente. O genótipo CC foi o menos frequente do SNP g.15485C>T (*CAPN3*), sendo que o CT prevaleceu sobre o genótipo TT.

As frequências alélicas dos SNPs (g.2554T>C e g.15486 C>T) demonstraram que o alelo “T” encontra-se com frequência superior ao alelo C em ambos os SNPs.

Associação dos polimorfismos com as características avaliadas

Os resultados de associação entre os SNPs dos genes *CAPN1* e *CAPN3* e características avaliadas na população experimental são mostrados nas Tabelas 18 e 19, respectivamente.

Tabela 18 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvios da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) do SNP g.2554T>C (*CAPN1*) sobre as características fenotípicas

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PV35	72,48	22,99	0,002**	-53,53	18,19	0,004**	30,46	11,68	0,01*
PV41	91,55	27,98	0,001**	-65,51	22,20	0,004**	39,11	14,22	0,01*
PV42	89,66	27,80	0,002**	-64,93	22,05	0,004**	38,24	14,12	0,01*
COXA	19,07	7,11	0,01*	-18,76	5,64	0,001**	7,63	3,64	0,04*
PEITO	18,26	5,77	0,002**	-11,01	4,58	0,02*	8,02	2,90	0,01*
CARC	60,27	19,88	0,003**	-46,85	15,77	0,004**	25,39	10,11	0,01*
REND_COXA	-0,07	0,27	0,81	-0,45	0,22	0,04*	-0,08	0,14	0,57

*P<0,05, **P<0,001

PV35= peso vivo aos 35 dias; PV41= peso vivo aos 41 dias; PV42= peso vivo aos 42 dias; PES= peso dos pés; COXA= peso das coxas e sobrecoxas; PEITO= peso do peito com pele e ossos; CARC= peso da carcaça obtido através da soma das partes; REND_COXA= rendimento de coxas e sobrecoxas

O SNP g.2554T>C apresentou efeitos significativos de aditividade, dominância e substituição alélica (P<0,05) sobre as características descritas na Tabela 18, exceto para a característica REND_COXA, a qual apresentou efeito apenas de dominância (P<0,05).

Tabela 19 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas e do SNP g.15486C>T (*CAPN3*)

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PV35 (g)	42,17	31,28	0,18	26,46	18,04	0,14	10,90	14,24	0,45
PV41 (g)	46,33	41,63	0,27	20,39	23,63	0,39	15,42	18,80	0,41
PV42 (g)	46,46	40,90	0,26	20,78	23,25	0,37	15,33	18,48	0,41
COXA (g)	21,09	10,42	0,05*	6,18	5,94	0,30	8,21	4,71	0,08*
PEITO (g)	6,29	8,27	0,45	2,24	4,72	0,64	2,29	3,73	0,54
CARC (g)	36,98	28,84	0,20	14,13	16,41	0,39	13,12	13,03	0,32
REND_COXA	1,02	0,36	0,01**	0,17	0,22	0,44	0,45	0,16	0,01**

*P<0,10, **P<0,05

PV35= peso vivo aos 35 dias; PV41= peso vivo aos 41 dias; PV42= peso vivo aos 42 dias; PES= peso dos pés; COXA= peso das coxas e sobrecoxas; PEITO= peso do peito com pele e ossos; CARC= peso da carcaça obtido através da soma das partes; REND_COXA= rendimento de coxas e sobrecoxas

O SNP g.15486C>T apresentou resultados significativos dos efeitos aditivo e de substituição alélica sobre a característica REND_COXA. Animais com o genótipo

TT apresentaram 0,90% a mais de rendimento de coxa em relação aos com genótipo CC.

População Comercial

Os animais da população comercial foram genotipados com base nos dois polimorfismos selecionados nos genes *CAPN1* e *CAPN3* da população experimental.

Caracterização das informações fenotípicas avaliadas

As estatísticas descritivas (número de observação e as estimativas de médias, desvios-padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos) das características fenotípicas estudadas são apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20 - Estatísticas descritivas das características avaliadas dos SNPs g.2554T>C e SNP g.15486C>T na população comercial

Característica	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
PS (g)	310	1528,90	160,00	10,46	970,00	1980,00
PA (g)	310	3101,37	278,09	8,97	1231,00	3753,00
PE (g)	310	2214,41	196,59	8,88	1318,00	2762,00
PEI (g)	310	641,76	81,71	12,73	356,00	892,00
PER (g)	310	757,13	75,81	10,01	358,00	918,00
pHf	311	6,18	0,20	3,31	5,44	6,83
EXSU (%)	310	2,20	0,75	34,35	0,96	6,27
CONG (%)	310	3,92	2,75	70,16	0,28	28,36
COZ (%)	311	14,13	4,01	28,41	4,63	25,16
PERDTOT (%)	311	20,19	5,68	28,10	8,63	56,18
L*	308	54,98	3,29	5,98	44,61	63,90
a*	308	5,94	1,24	20,92	3,42	10,42
b*	308	14,41	1,57	10,92	10,35	20,16
AREA (μm^2)	311	1791,91	546,33	30,49	776,35	3714,60
DIAMETRO (μm)	311	46,50	6,95	14,95	31,11	67,92
NCEL	311	9,60	3,40	35,46	2,00	19,50
FC (Kgf)	311	1,59	0,51	31,98	0,50	4,00

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= Área das fibras musculares; DIAMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs

As frequências genotípicas e alélicas obtidas dos dois polimorfismos g.2554T>C (*CAPN1*) e g.15486C>T (*CAPN3*) avaliados na população comercial são apresentadas na Tabela 21.

Tabela 21 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2554T>C (*CAPN1*) e g.15486C>T (*CAPN3*) na população comercial de frangos de corte

Polimorfismo	Frequências genotípicas			Frequências alélicas	
g.2554T>C (<i>CAPN1</i>)	f(TT)= 24,44	f(TC)= 49,84	f(CC)= 25,72	f(T)= 0,49	f(C)=0,51
g.15486C>T (<i>CAPN3</i>)	f(CC)= 75,00	f(CT)= 21,10	f(TT)= 3,90	f(C)= 0,86	f(T)= 0,14

O genótipo TC foi o mais frequente do SNP g.2554T>C (*CAPN1*). Para o SNP g.15486C>T (*CAPN3*) observou-se uma distribuição assimétrica de seus genótipos e o genótipo TT foi o menos frequente.

As frequências do alelos C e T do SNP g.2554T>C foram próximas. O polimorfismo g.15486C>T apresentou frequência do alelo T inferior quando comparado ao alelo C.

Associação dos polimorfismos com as características estudadas

As estimativas do efeito aditivo, do desvio da aditividade e do efeito de substituição alélica do polimorfismo g.2554T>C do gene *CAPN1* são apresentadas na Tabela 22.

Tabela 22 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas e do SNP g.2554T>C (*CAPN1*)

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PS (g)	10,99	26,22	0,68	13,16	17,65	0,46	5,65	13,10	0,65
PA (g)	-19,22	43,24	0,66	23,25	30,52	0,45	-9,76	21,61	0,06*
PE (g)	-59,53	31,56	0,06*	37,26	21,34	0,08*	-29,52	15,81	0,36
PEI (g)	-11,20	12,19	0,36	2,65	8,05	0,74	-5,55	6,08	0,20
PER (g)	-16,59	12,63	0,19	17,99	8,64	0,04**	-8,19	6,35	0,57
pHf	-0,02	0,03	0,56	-0,03	0,02	0,23	-0,01	0,02	0,94
EXSU (%)	0,01	0,13	0,95	0,17	0,09	0,05*	0,00	0,06	0,47
CONG (%)	0,31	0,44	0,47	-0,01	0,30	0,98	0,16	0,22	0,21
COZ (%)	0,65	0,52	0,22	0,55	0,36	0,13	0,33	0,26	0,14
PERDTOT (%)	1,13	0,79	0,15	0,53	0,53	0,32	0,58	0,40	0,09*
L*	-0,79	0,45	0,08*	0,59	0,31	0,06*	-0,39	0,23	0,01**
a*	0,41	0,17	0,01**	-0,11	0,12	0,35	0,21	0,08	0,81
b*	0,06	0,22	0,80	0,23	0,15	0,14	0,03	0,11	0,33
AREA (μm^2)	79,78	69,04	0,25	-53,52	46,64	0,25	39,47	34,57	0,25
DIAMETRO (μm)	0,88	0,89	0,32	-0,64	0,60	0,28	0,43	0,44	0,51
NCEL	0,06	0,40	0,89	0,28	0,27	0,29	0,03	0,20	0,87
FC (Kgf)	0,05	0,07	0,51	0,002	0,05	0,97	0,02	0,03	0,51

*P<0,10, **P<0,05

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= Área das fibras musculares; DIAMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

SNP g.2554T>C (*CAPN1*) apresentou efeito de substituição alélica sobre a característica L*. A presença de um alelo “C” proporcionou em média um maior teor de luminosidade da carne de 0,39 em animais heterozigotos. As demais características fenotípicas não apresentaram efeitos significativos (P>0,05) dos genótipos avaliados. O mesmo polimorfismo apresentou efeitos significativos de aditividade e de dominância sobre as características a* e PER, respectivamente.

Os resultados das análises de associação entre o SNP g.15486C>T do gene *CAPN3* e as características estudadas são mostrados na Tabela 23.

O polimorfismo g.15486C>T (*CAPN3*) apresentou efeito de dominância (P<0,05) sobre as características CONG% e PERDTOT%. O mesmo SNP foi associado (efeito de substituição alélica) com as características COZ% e FC.

Animais com genótipo TT apresentaram em média, carne mais macia em 0,22 Kg e com uma menor perda de água por cozimento em 1,46 %.

Tabela 23 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.651G>A (*CAPN3*)

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PS (g)	51,65	48,57	0,29	-15,90	30,32	0,60	17,14	17,78	0,34
PA (g)	72,14	79,69	0,37	-25,93	51,64	0,62	22,17	28,79	0,44
PE (g)	8,33	59,61	0,89	-30,45	37,45	0,42	-12,33	21,84	0,57
PEI (g)	19,98	22,93	0,38	-12,69	14,17	0,37	3,06	8,45	0,72
PER (g)	7,41	23,73	0,76	-16,00	15,05	0,29	-4,92	8,69	0,57
pHf	0,01	0,06	0,88	0,04	0,04	0,25	0,03	0,02	0,20
EXSU (%)	0,15	0,23	0,53	-0,13	0,14	0,38	0,00	0,08	0,96
CONG (%)	0,90	0,81	0,27	-1,18	0,51	0,02**	-0,19	0,30	0,53
COZ (%)	-0,64	0,96	0,51	-0,77	0,62	0,22	-0,73	0,35	0,04**
PERDTOT (%)	0,28	1,47	0,85	-1,94	0,92	0,04**	-0,92	0,54	0,09*
L*	1,01	0,86	0,24	-1,00	0,54	0,06*	-0,04	0,32	0,91
a*	-0,32	0,32	0,31	0,13	0,20	0,51	-0,09	0,12	0,45
b*	0,15	0,41	0,73	0,05	0,27	0,86	0,10	0,15	0,52
AREA (μm^2)	32,52	129,74	0,80	11,58	81,32	0,89	22,56	47,45	0,63
DIAMETRO (μm)	0,39	1,67	0,81	0,34	1,04	0,74	0,38	0,61	0,53
NCEL	-0,10	0,76	0,90	-0,75	0,47	0,11	-0,46	0,28	0,10
FC (Kgf)	-0,04	0,13	0,74	-0,16	0,08	0,05*	-0,11	0,05	0,02**

*P<0,10, ** P<0,05

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= Área das fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Os genes *Calpaína1* e *Calpaína3* foram selecionados por apresentarem evidências funcionais de que estão relacionados com características de interesse econômico. Existem poucos trabalhos de identificação e associação de SNPs dos genes *CAPN1* e *CAPN3* em galinhas descritos na literatura.

No presente estudo, foram identificados quatro SNPs no gene *CAPN1* e um no gene *CAPN3*, e as associações entre esses polimorfismos e características de desempenho, carcaça e qualidade da carne indicaram a viabilidade da utilização desses marcadores como ferramentas moleculares, visando tanto o aumento do peso vivo e pesos dos cortes como maior maciez da carne.

Rendimento e qualidade da carne de frangos de corte são os principais fatores considerados pela indústria avícola e para os consumidores. A seleção para essas características pode ter levado a alterações nos atributos de qualidade da carne, principalmente na maciez (DRANSFIELD; SOSNICKI, 1999).

O gene *CAPN1* codifica uma proteína protease cisteína, a qual degrada proteínas miofibrilares no período *postmortem* e é considerada a enzima primária no processo de maciez da carne no *postmortem* (KOOHMARAIE, 1996).

Neste estudo, o polimorfismo g.2554T>C identificado no gene *CAPN1* foi associado com peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, peso das coxas e sobrecoxas, peso do peito e peso da carcaça na população experimental. Esse SNP, na população comercial, foi associado com peso vivo aos 42 dias, peso eviscerado, peso de pernas, perdas de água da carne por exsudação, perda de água total da carne, teor de luminosidade e teor de vermelho da carne.

Associações de peso vivo, peso eviscerado, peso de pernas, peso da carcaça e peso de peito com SNP no gene *CAPN1* também foram relatados por Zhang et al. (2008) que estudaram populações divergentes de galinhas e encontraram três polimorfismos no gene *CAPN1* (C2546T; G3535A e C7198A) e seus haplótipos foram associados com peso vivo, peso de carcaça, peso do músculo peitoral, peso do músculo de pernas, peso eviscerado e densidade da fibra muscular peitoral. Zhang et al. (2007) identificaram polimorfismos em diferentes populações de galinhas, e um polimorfismo no gene *CAPN1* foi encontrado na posição 9950G>A, localizado na região 3'UTR. Esses autores encontraram associações entre esse polimorfismo com as características de carcaça e densidade de fibras musculares.

Le Bihan-Duval et al. (2008) encontraram correlações genéticas altas e negativas entre rendimento de peito e L*, perdas de água por gotejamento, perdas de água por cozimento e força de cisalhamento ($-0,55 \pm 10$, $-0,65 \pm 0,10$, $-0,80 \pm 0,06$ e $-0,60 \pm 10$, respectivamente) indicando que a seleção para maior peso de peito poderia melhorar a capacidade de retenção de água e maciez da carne em frangos. Segundo Gaya et al. (2006; 2011), a estimativa de correlação genética encontrada entre EXSU e a* (0,50) foi indicativa de uma associação genética entre essas características. EXSU e L* (0,19) não apresentaram uma associação genética importante. As características PE, PER e PEITO apresentaram correlações genéticas altas com PV42. De acordo com essas estimativas de correlações, as características parecem estar associadas, e capazes de responder

à seleção genética, e o SNP g. 2554T>C poderá ser utilizado em programas de melhoramento de frangos.

O gene *CAPN3* é expresso no músculo esquelético (SORIMACHI et al., 1989), está relacionado com a maciez da carne (KEMP et al., 2010), distrofia muscular e crescimento, e desempenha um papel importante na integridade miofibrilar (POUSSARD et al., 1996).

Os resultados deste estudo mostraram que o SNP g.651G>A (*CAPN3*) localizado no cromossomo 5 em galinhas, foi associado com rendimento de coxas e sobrecoxas na população experimental. O mesmo SNP foi associado com perdas de água por exsudação e descongelamento, perda de água total da carne, teor de luminosidade da carne, e força de cisalhamento da carne na população comercial.

Segundo Gaya et al., (2011), as estimativas de correlações genéticas encontradas entre CONG e COZ (0,44) e entre FC e L* (0,58) foram indicativas de associações genéticas importantes. CONG e COZ apresentaram associações altas com FC (0,77 e 0,80, respectivamente). Desse modo, a seleção genética para redução das perdas de água da carne pode reduzir a força de cisalhamento ou aumentar a maciez da carne (GAYA, 2006; Gaya et al., 2011; ANADON, 2002). Essas características parecem estar relacionadas entre si de acordo com suas correlações genéticas, e os SNPs identificados no gene *CAPN3* podem ser considerados possíveis ferramentas em programas de seleção genética de aves.

Zhang et al. (2009) identificaram dois SNPs (11818T>A e 12814T>G) no gene *CAPN3* em galinhas (linhagens divergentes). Os haplótipos foram construídos, e em seguida, foram feitas as análises de associação dos genótipos dos SNPs, haplótipos e dos diplótipos com as características avaliadas. Foram encontradas diversas associações dos genótipos, haplótipos e diplótipos com peso vivo, peso da carcaça, peso do músculo do peito e peso do músculo das pernas. Em galinhas, o gene *CAPN3* foi altamente expresso em tecidos do músculo de peito e do músculo de pernas em diferentes idades 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 (ZHANG et al., 2012).

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, os polimorfismos identificados nos genes *CAPN1* e *CAPN3* foram relacionados principalmente com características de desempenho, carcaça e qualidade da carne, os quais podem trazer melhorias nas características de interesse econômico na avicultura. Desse modo, os SNPs estudados nos genes candidatos *CAPN1* e *CAPN3* poderão ser

usados como marcadores genéticos em programas de melhoramento avícola através da seleção assistida por marcadores (MAS).

3.3 Conclusões

Os polimorfismos identificados nos genes candidatos *CAPN1* e *CAPN3* da população experimental F₂ de galinhas da Embrapa foram avaliados em uma população comercial, e podem ser consideradas mutações causais responsáveis pelas características estudadas ou estarem somente ligados à elas (desequilíbrio de ligação), auxiliando nos programas de melhoramento genético de frangos de corte.

Referências

ANADÓN, H. L. S. **Biological, nutritional and processing factors affecting breast meat quality of broilers**. 2002. 171 f. Tese (Doutorado) - Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 2002.

BROOKES, A J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

BRYNE, P.F.; MCMULLEN, M.D. Defining genes for agricultural traits: QTL analysis and the candidate gene approach. **Probe**, London, v. 7, n. 1, p.24-27, 1996.

DRANSFIELD, E.; SOSNICKI, A.A. Relationship between muscle growth and poultry meat quality. **Poultry Science**, Ithaca, v. 78, n. 5, p. 743-746, 1999.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II, Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, n. 3, p.186-194, 1998.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introducción a la genética cuantitativa**. 4. ed. Zaragoza, Espanha, 2001. 469p.

GAYA, L. G. **Estudo genético da qualidade de carne em linhagem macho de frangos de corte**. 2006, 127f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Capturado em 19 ago. 2012. Online. Disponível na Internet <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-05102006>.

GAYA, L.G.; FERRAZ, J.B.S.; REZENDE, F.M.; MOURÃO, G.B.; MATTOS, E.C.; ELER, J.P.; MICHELAN FILHO, T. Heritability and genetic correlations estimates for performance, carcass and body composition traits in a male broiler line. **Poultry Science**, Savoy, v.85, n. 5, p.837-843, 2006.

GAYA, L.G.; MOURÃO, G.B.; FERRAZ, J.B.S.; MATTOS, E.C.; COSTA, A.M.M.A. C.; FILHO, T.M.; ROSA, A.F.; FELÍCIO, A.M.; ELER, J.P. Estimates of heritability

and genetic correlations for meat quality traits in broilers. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, p. 620-625, 2011.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, n. 3, p.195-202, 1998.
HOCQUETTE, J.F.; LEHNERT, S.; BARENDSE, W.; CASSAR-MALEK, I.; PICARD, B. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. **Animal**, New York, v.1, n. 1, p. 159-173, 2007.

KEMP, C.M.; SENSKY, P.L.; BARDSLEY, R.G.; BUTTERY, P.J.; PARR, T. Tenderness - An enzymatic view. **Meat Science**, Barking, v. 84, n. 2, p. 248-256, 2010.

KOOHMARAIE, M. Biochemical factors regulations the toughening and tenderization process of meat. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 43, n.1, p. 193-201, 1996.

LE BIHAN-DUVAL, E.; BERRI, C.; BAEZA, E.; SANTE, V.; ASTRUC, T.; REMIGNON, H.; LE POTTIER, G.; BENTLEY, J.; BEAUMONT, C.; FERNANDEZ, X. Genetic parameters of meat technological quality traits in a grand-parental commercial line of turkey. **Genetics, Selection, Evolution**, Versailles, v.35, n. 6, p. 623-635, 2003.

LE BIHAN-DUVAL, E.; DEBUT, M.; BERRI, C. M.; SELIER, N.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; JÉGO, Y.; BEAUMONT, C. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. **BMC Genetics**, Lunger, v. 9, n. 53, p. 234-244, 2008.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Acesso em: 30 mar. 2012.

PARK, G.B.; MOON, S.S.; KO, Y.D.; HA, J.K.; LEE, J.G.; CHANG, H.H.; JOO, S. T. Influence of slaughter yield and quality grades of Hanwoo (Korean native cattle) carcasses. **Journal of Animal Science**, Albany, v. 80, n. 1, p. 129-136, 2002.

POUSSARD, S.; DUVERT, M.; BALCERZAK, D.; RAMASSAMY, S.; BRUSTIS, J.J.; COTTIN, P.; DUCASTAING, A. Evidence for implication of muscle-specific calpain (p94) in myofibrillar integrity. **Cell & Growth Differentiation**, Philadelphia, v. 7, n. 11, p. 1461-1469, 1996.

ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Genotypic characterization of microsatellite markers in broiler and layer selected chicken lines and their reciprocal F₁s. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 66, n. 2, p. 150-158, 2009.

SAS/STAT User's Guide: version 9.1. North Carolina: SAS Institute, 2004. 5136p.

SORIMACHI, H.; IMAJOH-OHMI, S.; EMORI, Y.; KAWASAKI, H.; OHNO, S.; MINAMI, Y.; SUZUKI, K. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. Specific expression of the mRNA in

skeletal muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 264, n. 33, p. 20106-20111, 1989.

SORIMACHI, H.; SUZUKI, K. The structure of calpain. **The Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 129, n. 5, p. 653-664, 2001.

TAYLOR, R.G.; GEESINK, G.H.; THOMPSON, V.F.; KOOHMARAIE, M.; GOLL, D. E. Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? **Journal of Animal Science**, Albany, v. 73, n. 5, p. 1351-1367, 1995.

ZHANG, Z.R.; ZHU, Q.; JIANG, X.S.; DU, H.R. Study on correlation between single nucleotide polymorphism of *CAPN1* gene and muscle tenderness and carcass traits in chicken. **Yi Chuan Xue Bao**, Beijing, v. 29, n. 8, p. 982-988, 2007.

ZHANG, Z.R.; LIU, Y.P.; JIANG, X.; DU, H.R.; ZHU, Q. Study on association of single nucleotide polymorphism of *CAPN1* gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken populations. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 125, n. 4, p. 258-264, 2008.

ZHANG, Z.R.; LIU, Y.P.; YAO, Y.G.; JIANG, X.S.; DU, H.R.; ZHU, Q. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain 3 (*CAPN3*) gene with carcass traits in chickens. **BMC Genetics**, Lunger, v. 10, n. 10, p. 10, 2009.

ZHANG, Z.R.; ZHU, Q.; YAO, Y.G.; JIANG, X.S.; DU, H.R.; LIU, Y.P. Characterization of the expression profile of calpain-3 (*CAPN3*) gene in chicken. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 4, p. 3517-3521, 2012.

4 ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS NOS GENES *MIOGENINA* E *MIOSTATINA* COM CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E CARCAÇA EM GALINHAS

Resumo

O gene da *Miogenina* (*MyoG*) é responsável pela diferenciação das células musculares, já o gene da *Miostatina* (*MSTN*) atua como regulador negativo de crescimento muscular esquelético durante a miogênese e a fase adulta. Devido a importante função destes genes no crescimento muscular animal, o presente estudo teve como objetivo associar polimorfismos de base única (SNP) do gene *MyoG* e do gene *MSTN* previamente descritos na literatura com características de crescimento e carcaça em duas populações distintas de galinhas. Foram genotipados 179 aves pertencentes à uma população experimental F₂ da Embrapa Suínos e Aves, e 311 frangos de corte de uma população comercial por discriminação alélica pelo sistema de detecção *TaqMan*[®]. O SNP g.2947A>G (*MyoG*) foi associado com porcentagem de proteína e cinzas na matéria natural, porcentagem de cinzas na matéria seca, peso eviscerado, peso de pernas e peso à seleção aos 38 dias (P<0,05). Foram observadas associações entre o SNP g.324C>T (*MSTN*) e peso do fígado, conversão alimentar, peso ao abate e peso eviscerado (P<0,05) nas duas populações estudadas. Estes resultados mostram que estes marcadores do tipo SNPs podem ser incluídos em programas de melhoramento genético que utilizam a ferramenta molecular seleção assistida por marcadores (MAS) para estas características de interesse econômico avícola.

Palavras-chave: Desempenho; Desenvolvimento; Galinha; SNP

Abstract

The gene *Myogenin* (*MyoG*) is responsible for the differentiation of muscle cells. The gene *Myostatin* (*MSTN*) acts as a negative regulator of skeletal muscle growth during myogenesis and adulthood. Given the important roles of these genes in animal muscle growth, this study aimed to associate single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes *MyoG* and *MSTN* previously described in the literature as growth and carcass traits in two distinct populations of chickens. We genotyped 179 chickens belonging to an F₂ experimental population of Embrapa Swine and Poultry, and 311 broilers from a commercial population by allelic discrimination by the detection system *TaqMan*[®]. The SNP g.2947A>G (*MyoG*) was associated with the percentage of protein and ash in the natural matter, ash percentage in the dry matter, eviscerated weight, leg weight and selection weight for 38 days. For the SNP g.324C> T (*MSTN*), associations were observed in liver weight, feed conversion, slaughter weight and eviscerated weight in the populations studied. The results show that these SNP markers can be included in breeding programs that use the tool of molecular marker-assisted selection (MAS) for traits of economic interest poultry.

Keywords: Performance; Development; Chicken; SNP

4.1 Introdução

A intensa seleção genética das últimas décadas resultou em aves com alto desempenho para as características zootécnicas de produção e carcaça, como ganho de peso, conversão alimentar e deposição de tecido muscular, mas que apresentam, eventualmente, novas desordens fisiológicas, acarretando diminuição da aceitação pelo consumidor, além de perdas econômicas diretas por morte ou redução do rendimento no processamento (ANTHONY, 1998). Animais com desenvolvimento muscular acelerado podem ter alterações na via metabólica relacionadas à glicólise, o que pode acarretar em alterações nas características de qualidade da carne como, maciez, cor e capacidade de retenção de água (DEBUT et al., 2003).

A seleção fenotípica intensiva utilizada por várias gerações em aves de corte pelos programas de melhoramento genético originou linhagens altamente musculares. Maior deposição muscular está relacionada à eficiência no *turnover* protéico (TESSERAUD; CHAGNEAU; GRIZARD, 2000) o que pode afetar as fibras musculares, seja alterando seu número ou tamanho das fibras, ou ambos. Suínos que crescem mais rapidamente e desenvolvem maior massa muscular, também, têm maior número de fibras musculares (DWYER; STICKLAND, 1991; DWYER; FLETCHER; STICKLAND, 1993).

O desenvolvimento do músculo esquelético, em aves, ocorre em dois períodos distintos. Primeiro, na fase embrionária, o número de fibras musculares é estabelecido quando um grande número de células precursoras é determinado a expressar genes músculo-específicos (CHRIST; BRAND-SABERI, 2002). Posteriormente, no período pós eclosão, ocorre a hipertrofia das fibras musculares, principalmente através do acréscimo de proteína e núcleos originados da proliferação e fusão de células satélites (MOSS, 1968). O músculo *Pectoralis* de galináceos é composto, quase exclusivamente, de fibras glicolíticas de rápida contração (SMITH; FLETCHER, 1998; SAMS; JANKY, 1990; ONO et al., 1993).

Para entender a importância dos fatores que afetam o crescimento e a deposição protéica no músculo das aves, é necessário considerar o impacto desses fatores sobre a qualidade do músculo que será transformado em alimento. Mas a qualidade da carne não é só determinada pelas influências intrínsecas (fisiológicas) e as extrínsecas (meio ambiente) sobre o músculo da ave no período que precede à sua morte. Como o músculo é um tecido dinâmico, ele responde também as

influências do meio ambiente durante e depois da morte do animal. O tipo de processamento, considerando-se o sacrifício da ave e o processamento da carcaça, interage com as características do músculo e, juntos, vão determinar a qualidade da carne (PEARSON; YOUNG, 1989).

Em animais de produção, as características da fibra muscular também desempenham um papel chave na qualidade da carne. Mesmo com o progresso genético alcançado para a taxa de crescimento de frangos de corte, não é interessante incrementar a deposição muscular das aves se esta for de qualidade inferior (SAMS, 1999). A qualidade da carne é uma das principais características desejadas pela indústria da carne de frango, pois interfere diretamente na escolha e na compra da carne pelo consumidor final e pode representar perdas econômicas significativas tanto na venda de carne *in natura* quanto de produtos processados.

As características de qualidade da carne de frango como perda de água por gotejamento, perda de água por cozimento e força de cisalhamento (*shear force*) apresentam valores de herdabilidades moderados ($0,26 \pm 0,04$; $0,35 \pm 0,04$; $0,34 \pm 0,05$, respectivamente), segundo os estudos de Le Bihan-Duval et al. (2008), representando um desafio aos programas de seleção genética. Os avanços na área da genômica animal têm gerado novas ferramentas biotecnológicas que podem ser utilizadas na identificação e seleção de alelos envolvidos com características de interesse econômico (DEKKERS; HOSPITAL, 2002).

Mesmo com todos esses avanços na genômica animal, ainda existe um fator limitante, que é a identificação dos genes relacionados com o controle das características quantitativas que são controladas por muitos genes. O estudo de genes candidatos e polimorfismos de base única (SNPs) podem ser métodos eficazes para melhorar o progresso genético de características relacionadas com o desenvolvimento muscular, carcaça e qualidade da carne.

No presente estudo, os genes *Miogenina* (*MyoG*) e *Miostatina* (*MSTN*) foram selecionados como possíveis candidatos com base em evidências funcionais de que estes genes estão relacionados principalmente com características de desenvolvimento muscular em diferentes espécies.

Miogenina, pertence a família do gene *MyoD*, o qual promove a diferenciação das células musculares (OLSON, 1990; RUDNICKI; JAENISCH, 1995), e é requerida para diferenciação bioquímica e morfológica na maturação do tecido muscular esquelético (PERRY; RUDNICKI, 2000). Wang et al. (2008) estudaram o gene da

Miogenina em cinco linhagens puras e três combinações híbridas em galinhas e identificaram polimorfismos associados com peso do músculo peitoral, porcentagem de músculo de pernas e densidade de fibras musculares.

O gene da *Miostatina* (*GDF8*) é um membro da família TGF- β e atua como um regulador negativo do desenvolvimento da musculatura esquelética e crescimento em mamíferos (McPHERRON; LEE, 1997), e participa da deposição e metabolismo de gordura (GU et al., 2003). Zhang et al. (2011) estudaram quatro populações de galinhas (Bian, Jinghai, Youxi e Arbor Acre) e encontraram quatro polimorfismos no gene da *Miostatina* (G2283A, C7552T, C7638T e T7661A) associados com peso vivo em 6-18 semanas de idade.

Este trabalho teve como objetivo realizar estudos de associação entre os genes candidatos *MyoG* e *MSTN* e características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em uma população experimental de galinhas e uma população comercial de frangos de corte.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

Populações

Foram utilizadas para este trabalho aves de duas populações distintas: uma população F₂ desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves e a outra uma população comercial desenvolvida por uma empresa multinacional de genética de aves.

A população F₂ (TCTC) Embrapa Suínos e Aves foi desenvolvida através do cruzamento entre machos da linhagem de corte (TT) e fêmeas da linhagem de postura (CC). CC é uma linhagem de postura originada da raça *White Leghorn*, na qual o programa de seleção objetivou melhorar a produção de ovos, peso do ovo, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade de ovo, conversão alimentar, viabilidade e redução do peso corporal. TT é uma linhagem de corte originada das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*, que foi selecionada para melhorar conversão alimentar, peso corporal, rendimentos de carcaça e de peito, fertilidade, viabilidade, redução da gordura abdominal e síndromes metabólicas (ascite e morte súbita).

A geração F₁ foi formada a partir de sete machos TT cruzados com sete fêmeas CC, gerando aproximadamente 50 animais F₁ TC. A formação da geração F₂ procedeu-se de um total de sete machos e 21 fêmeas na proporção de um macho

para três fêmeas de cada família da geração F_1 , onde cada macho F_1 foi acasalado com três fêmeas F_1 não aparentadas. Cada fêmea F_1 produziu aproximadamente 100 animais F_2 , em um total de aproximadamente 2.100 progênie, obtidas ao longo de 17 incubações em oito meses. Detalhes da população F_2 tem sido descrito por Rosário et al. (2009).

A população comercial utilizada apresenta informações de um banco de dados do rebanho elite comercial (também designado rebanho de *pedigree*) de frangos de corte, no qual é realizado o processo de seleção para composição de uma linhagem macho de frangos de corte da empresa. As informações dos irmãos completos destas aves foram utilizadas no processo de seleção, programa denominado *sib test*. Este teste tem a finalidade de auxiliar a escolha dos melhores indivíduos durante o programa de seleção do rebanho elite, o qual origina todas as aves da linhagem (detalhes estão em GAYA et al., 2006; 2011).

As aves foram alojadas em galpões da Granja de Pedigree desta empresa e criadas com programas de vacinação e manejo nutricional semelhantes aos preconizados para frangos de corte, com a diferença de estarem em um ambiente rigidamente controlado, visando garantir a saúde e o desempenho destas aves.

Ao atingirem 42 dias de idade, cada lote de animais *sib test*, composto por machos e fêmeas, foi sexado e alojado em caixas, sendo transportados ao Matadouro - Escola do campus da USP em Pirassununga. Foram coletados dados de desempenho, carcaça e histológicos de 1.300 aves e destas, todas foram submetidas à coleta de informações de qualidade de carne, as quais foram realizadas no referido Matadouro, no Laboratório de Carnes, no Laboratório de Citologia e Imunohistoquímica e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP. Esse banco de dados da população comercial é mantido pelo Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia (GMAB) do Departamento de Ciências Básicas da FZEA/USP desde 2002.

Fenótipos e extração de DNA

Na população F_2 Embrapa foram avaliadas características fenotípicas relacionadas ao **desempenho** (peso ao nascer, peso aos 35 dias, peso aos 41 dias, peso vivo aos 42 dias, ganho de peso de 35 a 41 dias, consumo de ração de 35 a 41 dias, eficiência alimentar de 35 a 41 dias, comprimento do intestino, conversão

alimentar de 35 a 41 dias), **carcaça** (peso vivo aos 35 dias, peso vivo aos 41 dias, peso vivo aos 42 dias, peso dos pés, peso das coxas e sobrecoxas, peso do peito com pele e ossos, peso da cabeça, peso das asas, peso do dorso, peso da carcaça obtido através da soma das partes, rendimento de pés, rendimento de coxas e sobrecoxas, rendimento de peito, rendimento de cabeça, rendimento de asas, rendimento de dorso, e rendimento de carcaça), **orgãos** (peso do fígado, peso do coração, peso da moela, peso do pulmão, hematócrito, rendimento de fígado, rendimento de coração, rendimento de moela e rendimento de pulmão), **gordura** (peso da gordura abdominal, rendimento de gordura abdominal, níveis séricos de colesterol total, de triglicérides e de colesterol + triglicerídeos), e **composição** (porcentagem de matéria seca na carcaça, porcentagem de umidade na carcaça, porcentagem de proteína bruta na matéria seca, porcentagem de extrato etéreo na matéria seca, porcentagem de cinzas na matéria seca, porcentagem de proteína bruta na matéria natural, porcentagem de extrato etéreo na matéria natural, porcentagem de cinzas na matéria natural, proteína bruta em gramas, extrato etéreo em gramas e cinzas em gramas). Os detalhes da descrição das características de composição química estão em Nones et al. (2012).

O DNA genômico de 180 aves das gerações F₁ e F₂ da população Embrapa foi extraído a partir de amostras de sangue utilizando reagente DNAzol® (Life Technologies). Após a identificação de cada amostra, O DNA genômico extraído foi quantificado por espectrometria em absorbância a 260 nm utilizando o espectrofotômetro HITACHI, modelo U-20000. As amostras foram diluídas na concentração padrão de 20 ng DNA μL^{-1} e armazenadas em *freezer* a -18 °C. A qualidade do DNA genômico dos animais dessa população foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, e corada com GelRed™ (Life Technologies).

Foram avaliadas na população comercial as seguintes características: **desempenho** (peso à seleção aos 38 dias e peso ao abate), **carcaça** (peso de carcaça eviscerada, peso de peito desossado e sem pele, peso de pernas), **qualidade de carne** (pH 24 horas após o abate, valores colorimétricos medidos 24 horas após o abate: parâmetros L* - luminosidade, a* - teor de vermelho, b* - teor de amarelo), perdas de água por exsudação, perdas de água por descongelamento, perdas de água por cozimento, força de cisalhamento), e **histológicas** (diâmetros das fibras musculares, as áreas das fibras musculares e número de fibras musculares por campo histológico visualizado). As análises das características de

qualidade de carne e histológicas foram realizadas no músculo *Pectoralis major* em sua porção crânio-ventral.

O DNA genômico de 311 frangos de corte da população comercial foi obtido a partir de cortes histológicos de amostras de tecido muscular embebidos em parafina, nas quais foram adicionados uma solução de lise (NaOH 200 mM) e uma solução neutralizadora (HCl 200 mM; Tris-HCl 100 mM pH 8,5). As amostras foram armazenadas em *freezer* a -18°C. A qualidade do DNA genômico foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo GelRed™ (Life Technologies).

Seleção dos genes candidatos

O polimorfismo g.2947A>G no gene da *Miogenina* (*MyoG*) utilizado neste trabalho foi identificado num estudo desenvolvido pelo nosso grupo (Souza, 2004). Já o polimorfismo g.324C>T no gene da *Miostatina* (*MSTN*) foi selecionado com base nos estudos de Xianghai et al. (2007). Ambos os polimorfismos foram identificados através do sequenciamento dos fragmentos desejados utilizando o Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Life Technologies). As reações de sequenciamento foram purificadas e aplicadas no sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyser® (Applied Biosystems). As sequências dos nucleotídeos foram analisadas usando os programas *Phred*, *Phrap* e *Consed* (EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998). Essas análises foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

Genotipagem por sondas *TaqMan*®

Foram genotipadas 180 aves da geração F₂ da Embrapa e 311 frangos de corte da população comercial por discriminação alélica utilizando sistema de detecção *TaqMan*® (*Applied Biosystems*), com sondas específicas para cada alelo. As análises foram realizadas no equipamento *LightCycler 480 System II*® (Roche), pelo método *Endpoint Genotyping*, com formato de detecção *Dual Color Hydrolysis Probe* com fluorescências *FAM* e *VIC*.

As reações consistiram de 1 µL de DNA genômico (20 ng.µL⁻¹), 5 µL de *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* (Life Technologies) composta por tampão *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, *AmpErase*® uracil-N-glycosylase (UNG) e dNTPs, e 0,25 µL de *Custom TaqMan*® *SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems*) que

inclui *primers* específicos e sondas do tipo *TaqMan*[®] e 3,75 µL de água ultrapura para completar um volume de 10 µL.

As etapas de ciclagem incluíram uma pré-incubação a 50 °C por 2 minutos com taxa de rampa de 4,40 °C.s⁻¹ para ativação da UNG e 95 °C por 10 minutos a 4,40 °C.s⁻¹ para ativação da AmpliTaq Gold DNA Polymerase. As condições de amplificação foram 95 °C por 15 segundos a 4,40 °C/s (desnaturação), 60 °C por um minuto a 2,20 °C.s⁻¹ (anelamento) e 72 °C por um segundo a 4,40 °C.s⁻¹ (extensão) consistindo 45 ciclos. O resfriamento foi a 40 °C por 10 segundos a 1,50 °C.s⁻¹. Os resultados foram analisados no programa LightCycler 480 SW 1,5 (Roche).

Análises estatísticas

As frequências alélicas e genóticas foram estimadas para cada *locus*, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente (FALCONER; MACKAY, 2001).

Para avaliar as implicações dos resultados moleculares em relação às características avaliadas nas aves, foram utilizadas análises individuais com cada característica sendo considerada uma variável dependente.

Os efeitos dos genótipos encontrados para os dois marcadores (*MyoG* e *MSTN*) foram avaliados a partir do modelo geral apresentado abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + S_j + M_k + e_{ijkl}$$

em que: Y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado para uma dada característica nas aves; μ = é uma constante inerente a todas as observações; C_i = é o efeito fixo de grupo de contemporâneos; S_j = é o efeito aleatório de macho j , com média 0 e variância σ_s^2 ; M_k = é o efeito fixo do genótipo para cada um dos marcadores SNPs avaliados (*MyoG* e *MSTN*); e_{ijkl} = efeito aleatório residual associado à característica Y_{ijkl} , com média 0 e variância σ_e^2 .

De acordo com Falconer e Mackay (2001), as estimativas do efeito aditivo (α) para cada polimorfismo podem ser obtidos pela diferença entre as médias dos genótipos homozigotos. Já os desvios atribuídos à dominância (δ) são estimados pela diferença entre a média genotípica dos heterozigotos em relação média dos genótipos dos dois homozigotos. As estimativas dos efeitos aditivos e desvios atribuídos à dominância foram avaliados por meio do Teste t de Student ($P < 0,05$).

As estimativas dos efeitos médios de substituição gênica para os polimorfismos avaliados em termos de genótipos foram calculadas por meio de análises de regressão linear, considerando o número de alelos favoráveis (FALCONER; MACKAY, 2001).

Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa *Statistical Analysis System* versão 9.2 (SAS Institute, 2004), utilizando os procedimentos PROC FREQ e PROC MIXED.

4.2.2 Resultados e Discussão

População F₂ da Embrapa

Identificação de SNPs nos genes *MyoG* e *MSTN*

Foi selecionado o polimorfismo g.2947A>G (ss494474893) no exon 3 do cromossomo 26 do gene *MyoG* e para o gene *MSTN* foi utilizado o SNP g.324C>T no exon 1 do cromossomo 7 da galinha, o qual corresponde ao polimorfismo g.2373C>T identificado por Xianghai et al. (2007). As duas mutações são consideradas transições e não acarretam mudanças de aminoácidos. Em galinhas, 17 e 30 SNPs foram descritos nos genes *MyoG* e *MSTN*, respectivamente (NCBI, 2012). O SNP estudado no gene *MyoG* foi depositado no *dbSNP* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Informações descritivas dos fenótipos avaliados

As estatísticas descritivas (número de observação e as estimativas de médias, desvios-padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos) das características fenotípicas estudadas na população F₂ Embrapa são apresentadas na Tabela 24.

Tabela 24 - Estatísticas descritivas das características avaliadas na população F₂ Embrapa

Característica	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
FIGADO	179	25,83	4,89	18,92	16,00	42,00
CA	177	2,83	0,72	25,54	1,52	7,23
REND_COXA	180	21,37	1,14	5,32	16,67	24,01
REND_DORSO	180	18,84	1,05	5,57	15,52	21,90
PB_MN	168	18,71	1,11	5,94	16,70	24,26
CZ_MN	168	2,71	0,34	12,55	2,02	4,18
CZ_MS	168	7,42	0,99	13,39	5,14	10,22

FIGADO= peso do fígado; CA= conversão alimentar; REND_COXA= rendimento de coxas e sobrecoxas; REND_DORSO= rendimento de dorso; PB_MN= porcentagem de proteína bruta na matéria natural; CZ_MN= porcentagem de cinzas na matéria natural; CZ_MS= porcentagem de cinzas na matéria seca

Frequências genotípicas e alélicas

As frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2947A>G (*MyoG*) e g.324C>T (*MSTN*) da população F₂ Embrapa são apresentadas na Tabela 25.

Tabela 25 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2947A>G (*MyoG*) e g.324C>T (*MSTN*) na população F₂ Embrapa

Polimorfismo	Frequências genotípicas			Frequências alélicas	
2947A>G	f(GG)= 13,33	f(AG)= 52,78	f(AA)= 33,89	f(G)= 0,40	f(A)= 0,60
324C>T	f(CC)= 28,74	f(CT)= 45,40	f(TT)= 25,86	f(C)= 0,51	f(T)= 0,49

O genótipo GG do SNP g.2947A>G (*MyoG*) apresentou uma menor frequência quando comparado aos genótipos AG e AA. O genótipo CT foi o mais frequente do polimorfismo g.324C>T (*MSTN*). As frequências alélicas do polimorfismo g.2947A>G demonstraram que o alelo A apresentou-se com frequência superior ao alelo G. O SNP g.324C>T apresentou as frequências dos seus alelos bem próximas.

Associação dos polimorfismos com as características avaliadas

Os resultados de associação entre os SNPs dos genes *MYOG* e *MSTN* e as características avaliadas na população F₂ Embrapa são mostrados nas Tabelas 26 e 27, respectivamente.

Tabela 26 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.2947A>G (*MyoG*) na população F₂ Embrapa

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	Pr > t	β_{1i}	EP	P > t
FIGADO	-0,59	1,08	0,58	-0,27	0,65	0,68	0,38	0,50	0,45
CA	0,28	0,19	0,14	0,00	0,12	0,98	-0,14	0,09	0,12
REND_COXA	0,20	0,25	0,43	-0,20	0,16	0,20	-0,03	0,12	0,79
REND_DORSO	0,25	0,25	0,32	0,00	0,15	0,98	-0,12	0,12	0,29
PB_MN	-0,51	0,21	0,02*	0,07	0,13	0,62	0,24	0,10	0,02*
CZ_MN	-0,19	0,09	0,03*	0,00	0,05	1,00	0,10	0,04	0,02*
CZ_MS	-0,56	0,26	0,03*	-0,01	0,16	0,97	0,28	0,12	0,02*

*P<0,05

FIGADO= peso do fígado; CA= conversão alimentar; REND_COXA= rendimento de coxas e sobrecoxas; REND_DORSO= rendimento de dorso; PB_MN= porcentagem de proteína bruta na matéria natural; CZ_MN= porcentagem de cinzas na matéria natural; CZ_MS= porcentagem de cinzas na matéria seca

SNP g.2947A>G apresentou resultados significativos (P<0,05) de efeitos aditivo e substituição alélica sobre as características PB_MN, CZ_MN e CZ_MS. A presença de um alelo A proporcionou em média 0,24 g de PB_MN, 0,10 g de CZ_MN e 0,28 g de CZ_MS a mais na carcaça para os animais heterozigotos. As demais características fenotípicas apresentaram resultados não-significativos (P>0,05) dos efeitos estudados.

Tabela 27 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.324C>T (*MSTN*) na população F₂ Embrapa

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
FIGADO	1,77	0,75	0,02*	0,16	0,56	0,77	0,88	0,37	0,02*
CA	-0,25	0,11	0,03*	-0,07	0,08	0,38	-0,12	0,06	0,03*
REND_COXA	-0,02	0,26	0,93	-0,43	0,19	0,03*	-0,01	0,13	0,95
REND_DORSO	-0,14	0,20	0,49	0,30	0,15	0,04*	-0,07	0,10	0,47
PB_MN	0,03	0,16	0,85	0,18	0,12	0,15	0,02	0,08	0,84
CZ_MN	0,05	0,06	0,36	0,00	0,04	0,93	0,03	0,03	0,36
CZ_MS	0,12	0,18	0,49	-0,06	0,13	0,67	0,06	0,09	0,49

*P<0,05

FIGADO= peso do fígado; CA= conversão alimentar; REND_COXA= rendimento de coxas e sobrecoxas; REND_DORSO= rendimento de dorso; PB_MN= porcentagem de proteína bruta na matéria natural; CZ_MN= porcentagem de cinzas na matéria natural; CZ_MS= porcentagem de cinzas na matéria seca

O SNP g.324C>T (*MSTN*) apresentou efeitos de aditividade e substituição alélica ($P < 0,05$) sobre as características peso do fígado e conversão alimentar, e efeito de dominância sobre REND_COXA e REND_DORSO. Para as demais características não foram observados resultados significativos dos efeitos avaliados.

População comercial

Os animais da população comercial foram genotipados com base nos dois polimorfismos dos genes *MYOG* e *MSTN* da população experimental.

Informações descritivas dos fenótipos avaliados

As estatísticas descritivas (números de observação e as estimativas de médias, desvios-padrão, coeficiente de variação, mínimos e máximos) das características fenotípicas estudadas na população comercial são apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28 - Estatísticas descritivas das características avaliadas na população comercial

Característica	N	MED	DP	CV	MIN	MAX
PS (g)	310	1528,90	160,00	10,46	970,00	1980,00
PA (g)	310	3101,37	278,09	8,97	1231,00	3753,00
PE (g)	310	2214,41	196,59	8,88	1318,00	2762,00
PEI (g)	310	641,76	81,71	12,73	356,00	892,00
PER (g)	310	757,13	75,81	10,01	358,00	918,00
pHf	311	6,18	0,20	3,31	5,44	6,83
EXSU (%)	310	2,20	0,75	34,35	0,96	6,27
CONG (%)	310	3,92	2,75	70,16	0,28	28,36
COZ (%)	311	14,13	4,01	28,41	4,63	25,16
PERDTOT (%)	311	20,19	5,68	28,10	8,63	56,18
L*	308	54,98	3,29	5,98	44,61	63,90
a*	308	5,94	1,24	20,92	3,42	10,42
b*	308	14,41	1,57	10,92	10,35	20,16
AREA (μm^2)	311	1791,91	546,33	30,49	776,35	3714,60
DIÂMETRO (μm)	311	46,50	6,95	14,95	31,11	67,92
NCEL	311	9,60	3,40	35,46	2,00	19,50
FC (Kgf)	311	1,59	0,51	31,98	0,50	4,00

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

Frequências genotípicas e alélicas dos SNPs

As frequências genotípicas e alélicas dos dois polimorfismos (g.2947A>G e g.324C>T) avaliados na população comercial são apresentadas na Tabela 29.

Tabela 29 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos g.2947A>G (*MyoG*) e g.324C>T (*MSTN*) na população comercial

Polimorfismo	Frequências genotípicas			Frequências alélicas	
g.2947A>G	f(GG)= 64,31	f(AG)= 30,87	f(AA)= 4,82	f(G)= 0,80	f(A)= 0,20
g.324C>T	f(CC)= 55,16	f(CT)= 36,45	f(TT)= 8,39	f(C)= 0,73	f(T)= 0,27

O genótipo AA do SNP g.2947A>G (*MYOG*) apresentou-se com uma menor frequência, sendo o genótipo GG o mais frequente. O SNP g.324C>T (*MSTN*).apresentou uma frequência maior do genótipo CC, sendo o genótipo TT o menos frequente.

Verificou-se que o alelo G do SNP g.2947A>G tem frequência superior que o alelo A. A mesma situação foi observada para o SNP g.324C>T, uma vez que foi verificado que o alelo C é mais frequente que o alelo T.

Associação dos polimorfismos com as características estudadas

As estimativas do efeito aditivo, do desvio de aditividade e do efeito médio de substituição alélica do polimorfismo g.2947A>G do gene *MYOG* na população comercial são apresentadas na Tabela 30.

Tabela 30 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.2947A>G (MYOG) na população comercial

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PS (g)	-76,36	43,00	0,08*	13,29	26,35	0,61	45,60	15,58	0,004***
PA (g)	-38,36	74,37	0,61	28,95	45,82	0,53	35,48	26,73	0,19
PE (g)	178,79	51,56	0,001***	95,52	31,64	0,002***	-36,32	19,09	0,05*
PEI (g)	38,21	19,54	0,05*	22,54	11,97	0,06	-6,68	7,22	0,36
PER (g)	68,33	20,77	0,001***	50,10	12,75	0,001***	-6,22	7,74	0,42
pHf	0,03	0,05	0,64	0,01	0,03	0,76	-0,01	0,02	0,72
EXSU (%)	0,01	0,21	0,97	0,003	0,13	0,98	-0,002	0,08	0,98
CONG (%)	-0,09	0,70	0,90	-0,30	0,44	0,49	-0,12	0,26	0,66
COZ (%)	0,49	0,87	0,58	-0,38	0,54	0,48	-0,45	0,32	0,16
PERDTOT (%)	0,35	1,27	0,79	-0,87	0,78	0,27	-0,64	0,47	0,18
L*	-0,38	0,74	0,60	-0,47	0,46	0,30	-0,07	0,27	0,81
a*	0,01	0,28	0,96	0,03	0,17	0,88	0,01	0,10	0,94
b*	0,17	0,37	0,65	-0,02	0,23	0,92	-0,10	0,14	0,48
AREA (μm^2)	111,62	110,75	0,31	141,55	68,56	0,04**	20,49	41,41	0,62
DIAMETRO (μm)	1,34	1,41	0,34	1,78	0,87	0,04**	0,29	0,53	0,58
NCEL	-0,29	0,64	0,64	-0,33	0,39	0,40	-0,03	0,24	0,90
FC (Kgf)	0,10	0,12	0,41	-0,01	0,07	0,90	-0,05	0,04	0,21

*P<0,10, **P<0,05, ***P<0,001

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIAMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

O SNP g.2947A>G apresentou efeito de dominância (P<0,05) sobre as características AREA e DIAMETRO. Foram observados resultados significativos (P<0,05) dos efeitos aditivo e de dominância sobre as características PE e PER. Já com respeito ao efeito de substituição alélica, verificou-se resultado significativo da característica PS. Aves com genótipo AA apresentaram em média 90 g a mais de peso à seleção aos 38 dias comparadas às aves com genótipo GG. Não foram observados resultados significativos das demais características.

Os resultados das análises de associação entre o SNP g.324C>T do gene *MSTN* da população comercial são mostrados na Tabela 31.

Tabela 31 - Estimativas do efeito aditivo (α), desvio da aditividade (δ) e do efeito médio de substituição alélica (β_{1i}) das características fenotípicas do SNP g.324C>T (*MSTN*) na população comercial

Característica	Efeito aditivo			Desvio da aditividade			Efeito de substituição		
	α	EP	P > t	δ	EP	P > t	β_{1i}	EP	P > t
PS (g)	-2,66	34,47	0,94	23,72	21,93	0,28	8,00	14,92	0,59
PA (g)	90,45	58,14	0,12	14,65	37,64	0,70	50,98	25,00	0,04**
PE (g)	81,10	41,90	0,05*	3,40	26,66	0,90	41,85	18,09	0,02**
PEI (g)	5,01	15,95	0,75	6,56	10,03	0,51	5,05	6,92	0,47
PER (g)	25,59	16,92	0,13	0,58	10,81	0,96	13,02	7,30	0,08*
pHf	-0,06	0,04	0,15	0,05	0,03	0,10	-0,01	0,02	0,48
EXSU (%)	0,03	0,17	0,84	-0,04	0,11	0,70	0,001	0,07	1,00
CONG (%)	0,38	0,58	0,51	0,17	0,37	0,65	0,26	0,25	0,31
COZ (%)	-0,40	0,70	0,57	-0,49	0,45	0,28	-0,39	0,30	0,20
PERDTOT (%)	0,05	1,05	0,96	-0,30	0,67	0,65	-0,10	0,45	0,83
L*	0,22	0,61	0,71	-0,35	0,39	0,36	-0,03	0,26	0,92
a*	-0,11	0,23	0,64	0,06	0,14	0,70	-0,03	0,10	0,75
b*	0,00	0,30	1,00	0,09	0,19	0,64	0,03	0,13	0,79
AREA (μm^2)	96,73	91,57	0,29	-76,59	58,28	0,19	17,67	39,66	0,66
DIÂMETRO (μm)	1,07	1,17	0,36	-0,96	0,74	0,20	0,15	0,51	0,77
NCEL	-0,22	0,53	0,67	0,40	0,33	0,23	0,05	0,23	0,83
FC (Kgf)	-0,01	0,09	0,91	0,08	0,06	0,18	0,03	0,04	0,51

*P< 0,10, **P<0,05

PS= peso à seleção aos 38 dias; PA= peso ao abate; PE= peso eviscerado; PEI= peso de peito; PER= peso de pernas; pHf= pH medido após 24h do abate; EXSU= perda de água da carne por exsudação; CONG= perda de água da carne por descongelamento; COZ= perda de água da carne por cozimento; PERDTOT= perda de água total da carne; L*= teor de luminosidade; a*= teor de vermelho da carne; b*= teor de amarelo da carne; AREA= área de fibras musculares; DIÂMETRO= diâmetro de fibras musculares; NCEL= número de fibras musculares; FC= força de cisalhamento

As características PA e PE apresentaram efeito de substituição alélica significativo (P<0,05) do SNP g.324C>T. A estimativa do efeito médio de substituição de cada alelo “T” está associado com ganhos de aproximadamente 51 g de peso ao abate e 42 g de peso eviscerado para animais heterozigotos.

Existem poucos estudos de identificação de polimorfismos nos genes *MyoG* e *MSTN* e associações com características de interesse econômico em galinhas. Os genes *Miogenina* e *Miostatina* foram estudados por apresentarem funções fisiológicas importantes como crescimento e desenvolvimento muscular esquelético. Neste trabalho, nós observamos que os SNPs dos genes *MyoG* e *MSTN* foram relacionados principalmente com características de desempenho e carcaça, sendo estas características consideradas fundamentais para a indústria avícola devido ao seu valor econômico.

A formação da massa muscular de um indivíduo é determinada pelo número e tamanho das miofibras. O número de fibras musculares é estabelecido na fase pré-natal, e é nesta fase que os fatores miogênicos e de crescimento controlam o desenvolvimento muscular (Te PAS, 2004). Na fase pós-natal, o indivíduo possui um número limitado de fibras musculares, e o crescimento muscular passa a ser determinado pela hipertrofia das miofibras (THOMAS et al., 2000).

O gene da *Miogenina* tem um papel importante no desenvolvimento muscular atuando diretamente na fase de diferenciação muscular e ativação de genes músculo-específicos (BRAUN; ARNOLD, 1995). É possível, que o gene *MyoG* seja responsável pela determinação do número de fibras musculares primárias que podem modificar o número e tipo de fibras musculares do animal, controlando o desenvolvimento muscular embrionário (STICKLAND; HANDEL, 1996). A mudança no perfil de expressão do gene *MyoG* ou na sua estrutura, o qual é causada por mutações, podem influenciar o processo de diferenciação, e consequentemente, as características musculares (WYSZYNSKA-KOKO et al., 2006).

No presente estudo, o SNP g.2947A>G do gene *MyoG* localizado no cromossomo 27 foi associado com peso eviscerado, peso de pernas, peso à seleção aos 38 dias, diâmetro e área de fibras musculares na população comercial. O mesmo SNP, na população experimental, foi associado com características de composição química corporal (PB_MN, CZ_MN e CZ_MS).

Segundo Gaya et al (2006), existe associação genética alta entre PE e PER com base na correlação genética (0,85) dessas características. A característica peso à seleção aos 38 dias (PS) apresentou correlações genéticas altas com PER (0,93) e com PE (0,97). Felício (2008) apresentou correlações moderadas entre PS e DIAMETRO (0,42) e AREA (0,39). Essas características parecem estar relacionadas entre si de acordo com suas correlações genéticas, e o gene *MyoG* pode ser considerado um possível candidato em programas de seleção genética de aves.

Algumas associações encontradas no presente estudo entre o SNP do gene *MyoG* e características de interesse econômico também foram relatadas por Wang et al. (2008), que estudaram o gene da *Miogenina* em galinhas como um candidato relacionado com número e diâmetro de fibras musculares, e encontraram uma mutação na região 5'UTR associada com peso do músculo de peito, porcentagem do músculo de peito e de pernas, densidade de fibra muscular e porcentagem de rendimento eviscerado. Ferri et al. (2009) observaram um aumento no nível de

RNA_m de *Miogenina* após a indução da diferenciação, atingindo o nível máximo de expressão no período intermediário da diferenciação em aves.

Xue et al. (2011) estudaram o gene da *Miogenina* em bovinos (raças chinesas), e identificaram um SNP (T314C) associado com características de comprimento de garupa, largura do quadril e comprimento corporal. Uma mutação foi encontrada no gene *Miogenina* em suínos, o qual apresentou um efeito no número de fibras musculares e relação com peso ao nascer, peso da carcaça e taxa de crescimento (SOUMILLION et al., 1997). Kim et al. (2009) identificaram um SNP no gene da *Miogenina* em suínos, e seus diplótipos foram associados com número de fibras musculares, área de fibras musculares e área de olho de lombo.

O gene da *Miostatina* (*MSTN*) tem sido estudado em várias espécies. Esse gene atua como um regulador negativo do desenvolvimento da musculatura esquelética e crescimento em mamíferos (McPHERRON; LEE, 1997).

Neste estudo, foram identificados na população experimental associações do SNP g.324C>T do gene *MSTN* (GGA7) com peso do fígado, conversão alimentar, rendimento de coxa e rendimento de dorso. Na população comercial, esse SNP foi associado com peso vivo e peso eviscerado.

Estudos estimaram correlação genética entre peso de fígado e conversão alimentar de 0,23, a qual foi moderada (RANCE et al., 2002; GAYA et al., 2006). Portanto, aves de maior conversão alimentar tendem a possuir maior peso de fígado. Segundo os mesmos autores, a seleção que busca maiores rendimentos de carcaça em aves pode provocar a diminuição do peso do fígado. Gaya et al. (2006) relataram uma correlação genética alta (0,95) entre peso vivo e peso eviscerado. Essas estimativas indicam que a seleção genética para peso vivo é capaz de proporcionar aves com maiores pesos eviscerado.

Xianghai et al. (2007) identificaram cinco SNPs em uma população comercial de frangos de corte, e encontraram associações entre os SNPs e características de crescimento, mortalidade, oxigênio no sangue, e anticorpos da vacina contra o vírus da doença Gumboro. Um dos SNPs identificados (MST2373) corresponde ao SNP do presente estudo (g.324C>T), o qual apresentou associação com as características peso vivo aos 7 dias, mortalidade após 14 dias, oxigênio no sangue em 5 semanas. No nosso trabalho, o mesmo SNP (g.324C>T) foi associado com peso vivo aos 42 dias, sendo a mesma base genética da população.

Zhang et al. (2011) estudaram quatro populações de galinhas (Bian, Jinghai, Youxi e Arbor Acre) e encontraram quatro polimorfismos no gene da *Miostatina* (G2283A, C7552T, C7638T e T7661A) associados com peso vivo em 6-18 semanas de idade. Gu et al. (2003) identificaram três SNPs em uma população F₂ de frangos, e relataram associações entre os SNPs e características de peso da gordura abdominal, peso vivo e peso de peito. Esses autores também encontraram associações dos SNPs com peso vivo, e concluíram que os polimorfismos estão associados com crescimento do músculo esquelético e com deposição de gordura.

Em trabalhos com ovelhas da raça Texel, encontraram associações entre o SNP g.6723G>A e característica de carcaça (HICKFORD et al., 2009). Sellick et al. (2007) trabalharam com bovinos do cruzamento entre Limousin e Jersey, e encontraram um polimorfismo associado com peso e porcentagem da carne e área de olho de lombo. Foram encontrados quatro polimorfismos no gene da *Miostatina* em suínos da raça Yorkshire associados com peso vivo aos 21, 28 e 70 dias, e ganho médio diário do nascimento aos 21, 28 e 70 dias.

As associações encontradas entre os SNPs dos genes *Miogenina* e *Miostatina* e as características avaliadas neste estudo, podem ter sido causadas por desequilíbrio de ligação com outras mutações localizadas nos locus *MyoG* e *MSTN* ou outros genes ligados, ou consideradas mutações causais.

Com base nesses resultados, os SNPs g.2947A>G (*MyoG*) e g.324C>T (*MSTN*) podem ser considerados como marcadores genéticos candidatos em programas de melhoramento genético, melhorando a eficiência da seleção de frangos de corte de características relacionadas ao crescimento e desenvolvimento muscular esquelético.

4.3 Conclusões

Os polimorfismos g.2947A>G e g.324C>T encontrados nos genes da *Miogenina* e *Miostatina* foram avaliados em populações experimental e comercial. Esses SNPs foram associados com características de desempenho, carcaça, histológicas e composição química corporal nas populações estudadas. Os resultados mostraram que estes marcadores em associação com a seleção fenotípica podem ser incluídos em programas de melhoramento genético avícola.

Referências

ANTHONY, N.B. A review of genetics practices in poultry: efforts to improve meat quality. **Journal of Muscle Foods**, Malden, v. 9, n. 1, p. 25-33, 1998.

BRAUN, T.; ARNOLD, H.H. Inactivation of myf-6 and myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. **European Molecular Biology Organization Journal**, Oxford, v.14, n. 6, p.1176-1186, 1995.

CHRIST, B.; BRAND-SABERI, B. Limb muscle development. **International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v.46, n. 7, p.905-914, 2002.

DEBUT, M.; BERRI, C.; BAÉZA, E.; SELLIER, N.; ARNOULD, C.; GUÉMENÉ, D.; JEHL, N.; BOUTTEN, B.; JEGO, Y.; BEAUMONT, C.; LE BIHAN-DUVAL, E. Variation of chicken technological meat quality in relation to genotype and preslaughter stress condition. **Poultry Science**, Ithaca, v.82, n. 12, p.1829-1838, 2003.

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

DWYER, C.M.; STICKLAND, N.C. Sources of variation in myofiber number within and between litters of pigs. **Animal Production**, Bletchley, v.52, n. 2, p.527-533, 1991.

DWYER, C.M.; FLETCHER, J.M.; STICKLAND, N.C. Muscle cellularity and postnatal growth in the pig. **Journal of Animal Science**, Albany, v.71, n. 12, p.3339-3343, 1993.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred* II, Error probabilities. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, n. 3, p.186-194, 1998.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introducción a la genética cuantitativa**. 4.ed. Zaragoza, Espanha, 2001. 469p.

FELÍCIO, A.M. **Estudo genético-quantitativo do número e diâmetro de fibras musculares em linhagem macho de frangos**. 2008. 96f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós Graduação em Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Capturado em 12 ago. 2012. Online. Disponível na Internet www.teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74131/tde-23062008.

FERRI, P.; BARBIERI, E.; BURATTINI, S.; GUESCINI, M.; D'EMILIO, A.; BIAGIOTTI, L.; DEL GRANDE, P.; DE LUCA, A.; STOCCHI, V.; FALCIERI, E. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, New York, v.108, n. 6, p. 1302-1317, 2009.

GAYA, L.G.; FERRAZ, J.B.S.; REZENDE, F.M.; MOURÃO, G.B.; MATTOS, E.C.; ELER, J.P.; MICHELAN FILHO, T. Heritability and genetic correlations estimates for performance, carcass and body composition traits in a male broiler line. **Poultry Science**, Savoy, v.85, n.5, p.837-843, 2006.

GAYA, L.G.; MOURÃO, G.B.; FERRAZ, J.B.S.; MATTOS, E.C.; COSTA, A.M.M.A. C.; FILHO, T.M.; ROSA, A.F.; FELÍCIO, A.M.; ELER, J.P. Estimates of heritability and genetic correlations for meat quality traits in broilers. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 6, p. 620-625, 2011.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.8, n. 3, p.195-202, 1998.

GU, Z.L.; ZHU, D.H.; LI, N.; LI, H.; DENG, X.M.; WU, C.X. Polymorphisms of myostatin gene and its relationship with the development of skeletal muscle and fat in chickens. **Science in China Series C: Life Sciences**, Beijing, v. 33, n. 3, p. 273-280, 2003.

HICKFORD, J.G.; FORREST, R.H.; ZHOU, H. Association between a g.6723G-A SNP in the myostatin gene (MSTN) and carcass traits in New Zealand Texel sheep. **Journal of Animal Science**, Albany, v.87,n. 6, p.1856-1864, 2009.

KIM, J.M.; CHOI, B.D.; KIM, B.C.; PARK, S.S.; HONG, K.C. Associations of the variation in the porcine myogenin gene with muscle fibre characteristics, lean meat production and meat quality traits. **Journal of Animal Breeding Genetics**, Berlin, v. 126, n. 2, p. 134-141, 2009.

LE BIHAN-DUVAL, E.L.; DEBUT, M.; BERRI, C.M.; SELIER, N.; SANTÉ-LHOUTELLIER, V.; JÉGO, Y.; BEAUMONT, C. Chicken meat quality: genetic variability and relationship with growth and muscle characteristics. **BMC Genetics**, London, v. 18, n. 53, p.234-244, 2008.

MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, London, v.387, n. 6628, p.83-90, 1997.

NCBI, National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Acesso em: 28 mar. 2012.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; KLEIN, C.; PINTO, L.F.B.; MOURA, A. S.A.M.T.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; AMBO, M.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIEIRO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with chemical composition of the chicken carcass. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2012.

OLSON, E.N. MyoD family: a paradigm for development. **Genes and Development**, New York, v.4, n. 9, p.1454, 1990.

ONO, Y.; IWAMOTO, H.; TAKAHARA, H. The relationship between muscle growth and the growth of different fiber types in the chicken. **Poultry Science**, Ithaca, v.72, n. 3, p.568-576, 1993.

PEARSON, A.M.; YOUNG, R.B. **Muscle and meat biochemistr**. San Diego: Academic Press, 1989. 457p.

PERRY, R.S.; RUDNICK, M.A. Molecular mechanism regulating myogenic determination and differentiation. **Science**, Landmark, v.5, n. 1, p.d750-d767, 2000.

RANCE, K.A.; McENTEE, G.M.; McDEVITT, R.M. Genetic and phenotypic relationships between and within support and demand tissues in a single line of broiler chicken. **British Poultry Science**, London, v. 43, n. 4, p. 518-527, 2002.

ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Genotypic characterization of microsatellite markers in broiler and layer selected chicken lines and their reciprocal F₁s. **Scientia Agricola**, Piracicaba, SP, v. 66, n. 2, p. 150-158, 2009.

RUDNICKI, M.A.; JAENISCH RUDOLF. The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. **BioEssays**: advances in molecular, cellular and developmental biology, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 203-209, 1995.

SAMS, A.R.; JANKY, D.M. Research note: Simultaneous histochemical determination of three fiber types in sigle sections of broiler skeletal muscles. **Poultry Science**, Ithaca, v.69, n. 8, p.1433-1436, 1990.

SAMS, A.R. Meat quality during processing. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, n. 5, p. 798-803, 1999.

SAS. SAS/STATUser's Guide: version 9.1. SAS Institute, North Caroline, 5136, 2004.

SELLICK, G.S.; PITCHFORD, W.S.; MORRIS, C.A.; CULLEN, N.G.; CRAWFORD, A.M.; RAADSMA, H.W.; BOTTEMA, C.D. Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 440–446, 2007.

SMITH, D.P.; FLETCHER, D.L. Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. **Poultry Science**, Ithaca, v.67, n. 6, p.908-913, 1998.

SOUMILLION, A.; ERKENS, J.H.F.; LENSTRA, J.A.; RETTENBERGER, G.; Te PAS, M.F.W. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. **Mammalian Genome**, New York, v. 8, n. 8, p. 564-568, 1997.

STICKLAND, N.C.; HANDEL, S.E. The numbers and types of muscle fibres in large and small breeds of pigs. **Journal of Anatomy**, London, v. 147, n. 5, p. 181-189, 1996.

TE PAS, M.F.W. Candidate genes for meat quality - the MRF genes. In: ANIMAL SCIENCE Papers and Reports, Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland, v. 22, n. 1, p. 115-118, 2004.

TESSERAUD, S.; CHAGNEAU, A. M.; GRIZARD, J. Muscle protein turnover early development in chickens divergently selected for growth rate. **Poultry Science**, Ithaca, v.79, n. 10, p.1465-1471, 2000.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 51, p. 40235-40243, 2000.

WANG, Q.; LIU, Y.P.; JIANG, X.S.; YANG, C.W.; DU, H.R.; QIU, M.H.; ZHU, Q. Correlation analysis of relationships between polymorphisms of high quality chicken myogenin gene and slaughter and meat quality traits. **Frontiers of Agriculture in China**, Beijing, v. 2, n. 4, p. 512-518, 2008.

WYSZYNSKA-KOKO, J.; PIERZCHALA, M.; FLISIKOWSKI, K.; KAMYCZEK, M.; RÓZYCKI, M.; KURY, J. Polymorphisms in coding and regulatory regions of the porcine MYF6 and MYOG genes and expression of the MYF6 gene in m. longissimus dorsi versus productive traits in pigs. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v.47, n. 2, p. 131-138, 2006.

XIANGHAI, Y.E.; BROWN, S.R.; NONES, K.; COUTINHO, L.L.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Associations of myostatin gene polymorphisms with performance and mortality traits in broiler chickens. **Genetics Selection Evolution**, Les Ulis, v. 39, n. 1, p. 73-89, 2007.

XUE, M.; ZAN, L.S.; GAO, L.; WANG, H.B. A novel polymorphism of the myogenin gene is associated with body measurement traits in native Chinese breeds. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 10, n. 4, p. 2721-2728, 2011.

ZHANG, G.; DING, F.; WANG, J.; DAI, G.; XIE, K.; ZHANG, L.; WANG, W.; ZHOU, S. Polymorphism in exons of the myostatin gene and its relationship with body weight traits in the Bian chicken. **Biochemical Genetics**, New York, v. 49, n. 1-2, p. 9-19, 2011.