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

Identificação da microbiota cecal de duas linhagens de galinha caipira e
associação com consumo alimentar residual

Shilton Reino Cavalcante

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

Piracicaba
2020

Shilton Reino Cavalcante
Zootecnista

Identificação da microbiota cecal de duas linhagens de galinha caipira e associação com
consumo alimentar residual

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

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

**Piracicaba
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Cavalcante, Shilton Reino

Identificação da microbiota cecal de duas linhagens de galinha caipira e associação com consumo alimentar residual / Shilton Reino Cavalcante. - - Piracicaba, 2020.

27 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Frango 2. Microbiota 3. Consumo 4. Sequenciamento 16S I. Título

*A minha mãe **Rosangela** e meu pai **Elias**, que tenho como exemplo de vida,
pessoas de coração grande e perseverança, dedico com amor.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois nenhuma folha de uma árvore cai sem o seu consentimento.

A minha mãe Rosângela e meu pai Elias, por sempre estarem comigo e aconselhado em minhas decisões.

Agradeço as mulheres guerreiras da minha família, vovó Euridece, tia Rute, tia Raque, Danielly, Daiane, Debora, Eliane e Elisa pelas risadas, carinho e amor que nossa família tem, que Deus continue nos unindo em seu Amor.

Aos homens trabalhadores, vovô Manoel, Everaldo, Júlio (Jujú), Dassayev, Diego, Danilo, Renan e Renato, que sejamos sempre evoluídos para mostrar nossos sentimentos sem ferir nossa masculinidade.

Aos amigos, Thiago e Patrícia, Reuton e Aline, uma segunda família que Deus nos oferece para ensinar que tempo e distancia não são suficientes para desfazer laços fraternos, gratidão.

Aos amigos PET Biotecnologia, Yasmin, Lucianne, Melqueades, Marcos e Caio, que nunca deixemos nossas raízes nordestinas sufocarem neste vasto mundo, pois árvores sem raízes profunda não crescem muito.

Aos meus orientadores acadêmicos, Luiz L. Coutinho, Júlia K. Sobral e Rachel M. L. Neves, por guiarem meus passos na vida acadêmica, ajudando assim em minha formação profissional e pessoal, pois aprendi com vocês não apenas coisas científicas mas também os detalhes da vida profissional em formação de pessoas, que todos vocês continuem passando esses conhecimentos e valores.

Aos amigos de laboratório, Horácio, Polyana, Gabriel, Priscila, Natalia, Graciela, Carolina e Luan que nossos cafés da tarde sejam sempre recheados com ciência e risada. Que este grupo continue sempre crescendo forte e unido, gratidão a todos por cada momento compartilhado, conselhos e ajudas.

Aos técnicos e funcionários do laboratório, Nirlei, Jorge, Ricardo, Marcela e Pilar, por compartilharem seus conhecimentos e práticas na bancada, que toda PCR amplifique em nossas fidas, menos o negativo é claro.

Aos amigos da república Paiol, Ananias, Danilo, Mailson, Marcos, Diana, Vinicius e Leandro, que nos ensinaram a conviver em grupo com pessoas tão diferentes e assim a sermos pessoas melhores.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa fornecida ao longo desse mestrado.

“Quando a gente anda sempre em frente, não pode ir muito longe...”

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1. Aves, alojamento, dieta e abate.....	11
2.2. Eficiência alimentar	11
2.3. Abate, coleta das amostras e extração de DNA	12
2.4. Preparo de biblioteca, sequenciamento e análise de dados	12
2.5. PCR – Quantitativa	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4. CONCLUSÕES	21
REFERÊNCIAS	23
APÊNDICES.....	27

RESUMO

Identificação da microbiota cecal de duas linhagens de galinha caipira e associação com consumo alimentar residual

As linhagens de galinha Caipirão e Caipirinha são tidas como linhagens caipira, com objetivo de criação extensionista esses animais apresentam características produtivas inferiores, como ganho de peso e rendimento de carcaça, quando comparados a linhagens de comerciais. As tecnologias de sequenciamento veem proporcionando novas linhas de pesquisas na avicultura, como por exemplo a metagenômica. O estudo de metagenômica tem como objetivo estudar a diversidade microbiológica intestinal das aves e assim torna-se uma ferramenta alternativa para melhorar o desempenho dos animais, além de conhecer quais microrganismos podem contribuir para futuros probióticos. Neste trabalho o objetivo foi de estudar a diversidade e abundância da microbiota cecal nas linhagens de galinha caipira (Caipirão e Caipirinha), selecionando os animais com base no consumo alimentar residual (CAR). Os resultados obtidos condizem com a literatura, ambas as linhagens apresentam como filos dominantes os firmicutes, bacteriodota e Euryarchaeota com aproximadamente 35%, 27% e 24% da comunidade microbiológica cecal. As análises de diversidade alpha e beta não houveram diferença significativa, apontando semelhança entre os grupos. As análises de microrganismos diferencialmente abundante foram realizadas pelo pacote EdgaR com Limma+Voom. A linhagem Caipirão não apresentou microrganismo diferencialmente abundante, já a linhagem Caipirinha o microrganismo *Ruminococcus lactaris* foi considerado significativamente mais abundante ao grupo com menor valor de CAR, ao *p-valor* de 0,05 e log de Fold change 1,33, assim tornando esse microrganismo um candidato ao bem-estar e produção animal.

Palavras-chave: Frango, Microbiota, Consumo, Sequenciamento 16S

ABSTRACT

Identification of cecal microbiota in two free-range chicken lines and association with residual feed intake

The Caipira and Caipirinha chicken lines are considered to be free cages chickens with the extensionist objective, these animals present lower productive characteristics such as weight gain and carcass yield, when compared to commercial lines. Sequencing technologies are providing new research lines, for example metagenomics. Therefore studying the chicken intestinal microbiological diversity becomes an alternative tool to improve production performance, and also known which microorganisms may contribute to future probiotics. This work had the objective to study the diversity and abundance of cecal microbiota in chicken lines free cages (Caipirão e Caipirinha), animal selection were based on residual feed intake (RFI), the results obtained were consistent with the literature, both lineages present as dominant phyla as Firmicutes, Bacteroidota e Euryarchaeota, with approximately 35, 27 e 24% the cecal microbiological community, respectively. Alpha and Beta diversity analyzes did not show significant differences between groups, pointing similarity between the RFI groups. The analysis of differentially abundant microorganisms were performed by the package EdgeR with Limma+Voom in R. Caipirão line did not show differentially abundant microorganism. For the Caipirinha line the microorganism *Ruminococcus lactaris* was considered significantly more abundant to the group with lower RFI, *p-value* of 0.05 and log of Fold change 1.33, thus making this microorganism a candidate for animal welfare and production.

Keywords: Chicken, Microbiota, Feed Intake, 16S sequencing

1. INTRODUÇÃO

A carne de frango tornou-se nas últimas décadas uma das principais fontes de proteína animal no mundo, junto ao aumento produtivo desses animais houveram críticas a forma de produção e bem-estar animal, abrindo assim novos nichos de mercado visando o consumo de galinhas caipiras (Chen et al., 2018).

As aves, de modo geral, possuem um trato gastrointestinal (TGI) composto por bico, papo, proventrículo, moela, duodeno, jejuno, ílio, ceco e colón, com uma vasta diversidade microbiana, e entre essas regiões o ceco apresenta a maior diversidade (Salanitro, Fairchilds, & Zgornicki, 1974; Xiao et al., 2017). Os primeiros estudos com microrganismo de trato gastrointestinal em galinhas foram realizados por meio de cultivo, hoje com os avanços nas tecnologias de sequenciamento surgem novas linhas de pesquisas como a metagenômica, que consiste em estudar microrganismos, independente de meio de cultivo (Marchesi & Ravel, 2015). Estimasse que no máximo 60% desta diversidade microbiana seja cultivada em laboratório e que 45% de toda microbiota tenha classificação conhecida em bancos de dados (De Cesare et al., 2019).

A microbiota ao longo do TGI desempenha diversas funções simbióticas e mutualistas, não apenas entre os microrganismos, mas principalmente com hospedeiro, assim estimulando o sistema imunológico, auxiliando na digestão de alimento e fornecendo substratos importantes como os ácidos graxos de cadeia curta (Stanley, Hughes, & Moore, 2014).

A interação simbiótica entre os microrganismo e o hospedeiro vem sendo estudada em animais modelos como Zebrafish e camundongos, e revelam a influência do hospedeiro sobre os microrganismos, seja pela secreções ao longo do epitélio intestinal, das vilosidades, movimentos peristálticos, alimentação ou habito de vida (Rawls, Mahowald, Ley, & Gordon, 2006). Em bovinos foi identificada a influência genética do hospedeiro sobre o perfil microbiano para animais selecionados para eficiência alimentar, associando polimorfismos de base única (SNP) a 14 taxas microbianas (Li et al., 2019).

Estudos apontam que galinhas caipiras não são competitivas no mercado, pois possuem rendimento de carcaça e peso de cortes nobres inferiores a linhagens melhoradas ao longo das últimas cinco décadas (José et al., 2007; Takahashi et al., 2006). Em galinhas caipiras os estudos com metagenoma ganharam destaque como forma de complementar o conhecimento sobre a saúde do trato gastrointestinal e identificar os microrganismos que possam auxiliar no melhor desempenho desses animais. (Chen et al., 2018).

A eficiência e conversão alimentar vem sendo associada a diversidade microbiana em aves (Pan & Yu, 2014; Singh et al., 2014; Waite & Taylor, 2014) outra forma de avaliar a eficiência destes animais é pelo uso do consumo alimentar residual (CAR) uma métrica com herdabilidade moderada, entre 0,3 e 0,4 e independente das características produtivas como peso e rendimento de carcaça, tornando esse índice uma alternativa em programas de melhoramento (Siegerstetter et al., 2017). O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil microbiano cecal de duas linhagens de galinha caipira, Caipirão e Caipirinha, e associar os microrganismos aos grupos de alto e baixo consumo alimentar residual.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Aves, alojamento, dieta e abate

Os lotes dos animais foram formados com 113 fêmeas e 29 galos da linhagem Caipirinha (HA) e 164 fêmeas e 40 machos da linhagem Caipirão (AO). O acasalamento foi realizado por inseminação artificial na proporção de quatro fêmeas para um galo, gerando mais de 3800 animais. Ao nascerem os animais foram anilhados afim de identificar sua linhagem parental. Os pintinhos foram agrupados em box coletivos aleatoriamente de forma a conter no mínimo filhos de cinco galos diferente por linhagem. Os pintinhos receberam ração comercial destinada a frango na fase inicial entre um e 30 dias de vida, e posteriormente ração para terminação até o dia de abate. A composição básica da dieta pode ser consultada na tabela 1. Todos os pintinhos foram pesados a cada sete dias para acompanhar o seu desenvolvimento, aos 42 dias foram selecionados entre 3 a 5 pintinhos de 25 galos para cada linhagem, totalizando 150 animais confinados em gaiolas individuais para teste de eficiência. Como critério de abate foi fixado o peso em 2800g com desvio padrão de 200g para ambas as linhagens.

Todo o manejo experimental encontra-se de acordo com a lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, sobre uso científico de animais, decreto nº 6899 de 15 de julho de 2009, sendo também aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP registrada com o nº 2018.5.393.11.4.

2.2. Eficiência alimentar

A ingestão de alimento foi mensurada nos dias 49, 56, 63, 70, 77, 84 e 91 de vida, sendo obtido pela diferença entre a ração fornecida e a sobra no comedouro, corrigido pelo desperdício ao decorrer da semana. Os animais também foram pesados nas mesmas datas e no dia de abate, o peso inicial para esta fase experimental foi obtido aos 42 dias. Para estimar o consumo alimentar residual (CAR) desses animais, foi utilizado o consumo total (CT), peso médio metabólico (PMM) e ganho de peso diário (GPD) entre os dias 42 e data de abate para cada animal. A análise de regressão foi realizada de forma individual para cada linhagem e o CAR foi estimado pelo resíduo de um modelo misto não linear com uso do R software versão 3.6.1 (R Core Development Team, 2008). Foi utilizado para calcular o CAR as seguintes equações: peso médio metabólico estimado por $PMM = \{[Peso\ inicial(g) + (GPD(g) \times Dias\ em\ confinamento)] / 2\}$ 0,75, $CAR = CT - (a1 + b1 \times PMM + b2 \times GPD)$, sendo a1 o intercepto da equação e b1 e b2

respectivamente os coeficientes de PMM e GPD obtidos previamente por regressão (Kennedy, van der Werf, Meuwissen, Properties, & Intake, 1993; Koch, Swiger, Chambers, & Gregory, 1963). Assim os animais foram ranqueados com base nos valores de CAR e selecionados para esse estudo. Na linhagem Caipirão foram selecionados os 10 animais com maior valor de CAR e os 10 com menor valor. Na linhagem Caipirinha, foram selecionados 13 com maior e 13 com menor var de CAR.

2.3. Abate, coleta das amostras e extração de DNA

Cada frango foi abatido de forma humanizada com dessensibilização por deslocamento cervical; a linhagem Caipirão passou por quatro lotes de abate realizados nos dias 64, 71, 78 e 85, enquanto a Caipirinha por três lotes, 78, 85 e 92 dias. Todo o trato gastrointestinal foi coletado e armazenado em freezer -20°C. Para a extração de DNA os conteúdos dos dois cecos foram coletados e homogeneizados em tubos falcon e retirado aproximada 0,250g, para extração de DNA. O kit QIAamp Fast DNA Stool – QIAGEN foi utilizado seguindo as modificações sugeridas por (Yu & Morrison, 2004).

2.4. Preparo de biblioteca, sequenciamento e análise de dados

Para amplificação do gene 16S ribossômico foi utilizado os primers 515FB:GTGYCAGCMGCCGCGGTAA e 806RB:GGACTACNVGGGTWTCTAAT tendo como alvo a região hipervariada V4 (Apprill, McNally, Parsons, & Weber, 2015), gerando um fragmento de aproximadamente 245 pares de base (pb). Após a purificação o produto da reação de polimerase em cadeia (PCR) foi submetido a uma segunda PCR, afim de ligar os adaptadores e index Illumina. Para tornar a concentração de DNA equimolares utilizamos o kit Sequalprep Normalization – Applied Biosystems™, obtendo uma concentração de 50ng de produto de PCR. Todas as amostras foram sequenciadas pelo equipamento MiniSeq – Illumina. Para análise inicial foi utilizado o pacote DADA2 do ambiente R, com objetivo de verificar a qualidade do sequenciamento, montagem de novo das reads e identificação de ASV – variação de sequências de amplicon bimericas (Callahan et al., 2016), As analise de diversidade alfa e beta foram realizadas pelo pacote phyloseq (Lozupone & Knight, 2005; McMurdie & Holmes, 2013), quanto as analise de abundancia diferencialmente expressa foram realizada pelo pacote edgeR e Limma+Voom (Law, Chen, Shi, & Smyth, 2014; Smyth, 2004). O banco de dados utilizado para identificar os microrganismos foi Genome Taxonomy Data Base (GTDB) (Parks et al., 2018)

2.5. PCR – Quantitativa

A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada nas amostras de DNA, utilizando o aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems®). Nas reações de amplificação foram utilizadas o marcador fluorescente Syber® Green PCR Master Mix 2x (AppliedBiosystems®). Para a avaliação de grupos de bactéria totais por meio do gene 16S foram utilizados os primers P1 e P2 (P1 – CCTACGGGAGGCAGCAG; P2 – ATTACCGCGGCTGCTGG) (Muyzer, De Waal, & Uitterlinden, 1993), gerando um fragmento de 193 pares de bases (pb). A eficiência (E) da curva obtida foi de 92,60% com diluições de 101 a 108. O valor de regressão logarítmica (R²) obtido na curva foi de 0,99. A reação de PCR foi realizada com 1 µL de DNA total, 10,0 µL de PCR tampão 2X (SYBR Green PCR Kit), 0,5µL de cada iniciador(100 mM) e 0,3µL de albumina de soro bovino (BSA) (10 mg/ml). O volume final foi ajustado com água deionizada esterilizada para 20µL. As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguidos de 35 ciclos a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos e uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o cálculo do CAR os animais foram ranqueados formando grupos de alta e baixa eficiência. A linhagem Caipirão apresentou CAR para o grupo de alta eficiência com média -4,1897 e baixa eficiência com 6,8735, quanto a linhagem Caipirinha os valores para alta eficiência foram de -5,0542 e baixa eficiência 5,9730. Os grupos para cada linhagem foram submetido ao teste F, apresentando para ambas as linhagens diferença significativa (p-valor 0,001). Quanto a eficiência alimentar a linhagem Caipirão apresentou um resultado de 0,3520, já para Caipirinha, 0,3063.

Com o sequenciamento da região v4 obtivemos mais de 1 milhão de reads para a linhagem Caipirão com média de 65 mil reads por amostra e 1,1 milhão para a linhagem caipirinha e 83 mil reads por amostra, após as análises de qualidade pelo DADA2 as linhagens passaram a ter 48mil e 69mil reads respectivamente para as linhagens Caipirão e Caipirinha. Quanto a formação de das ASV a linhagem Caipirão apresentou 3229 e após os filtros de retiradas ASV não identificadas a nível de família e aglomeradas a nível de espécies resultou em 226 espécies, a linhagem Caipirinha apresentou 3119 ASV e quando submetidas as filtragens anteriores resultou em 258 espécies.

As análises de diversidade alpha foram realizadas tendo como foco identificar possíveis variação microbiana tendo como parâmetro a idade e os grupos de eficiências para cada linhagem como encontram-se nos gráficos a baixo.

Figura 1: Diversidade Alpha para a linhagem caipirinha, as cores representam os grupos com base no CAR, vermelho para alto e azul para baixa eficiência.

Figura 2: Diversidade Alpha para a linhagem caipirinha, as cores representam os grupos com base no CAR, vermelho para alta e azul para baixa eficiência. A idade está representada em dias.

Figure 3: Diversidade Alpha para a linhagem caipirinha, as cores representam as idades ao abate para casa animal.

Figure 4: Diversidade Alpha para a linhagem Caipirão, as cores representam os grupos com base no CAR, vermelho para alto e azul para baixo.

Figure 5: Diversidade Alpha para a linhagem Caipirão, as cores representam os grupos com base no CAR, vermelho para alta e azul para baixa eficiência, no eixo "x" temos a idade para cada animal.

Figure 6: Diversidade Alpha para a linhagem Caipirão, as cores representam as idades ao abate para casa animal.

As análises de diversidade beta também foram realizadas afim de encontrar possíveis diferenças entre a composição e abundância da microbiota em relação com a idade e os grupos de consumo alimentar residual. A métrica utilizada para esta análise foi unifrac ponderado pela técnica da estatística multivariada de análise de coordenadas principais demonstrada nos gráficos abaixo (Choi, Kim, & Cha, 2014; Lozupone & Knight, 2005).

Figura 7: Unifrac ponderado para Caipirão, as formas pontos ordinais indicam os grupos com base no CAR, sendo círculos para alta eficiência e triângulos para baixa; as cores indicam as idades ao abate de cada animal.

Figura 8: Unifrac ponderado para Caipirão, as cores indicam os grupos com base no CAR.

Figura 9: Unifrac ponderado para Caipirinha, as formas pontos ordinais indicam os grupos com base no CAR, sendo círculos para alta eficiência e triângulos para baixa; as cores indicam as idades ao abate de cada animal.

Figura 10: Unifrac ponderado para Caipirinha, as cores indicam os grupos com base no CAR.

A análise de microrganismo diferentemente abundante foi realizada para cada linhagem. Foi observado que para a linhagem Caipirinha o microrganismo *Ruminococcus_B_lactaris* (RS_GCF_000507785.1) com de 0,04 (p-valor corrigido por Benjamini e Hochberg) e log de

Fold change -1,33 sendo assim mais abundante no grupo de alta eficiência com base no CAR, quando a linhagem Caipirão não apresentou microrganismo diferencialmente abundante. Podendo ser visualizado no gráfico a baixo.

Figura 11: Gráfico de Fold change contendo os microrganismos com maior expressão com p-valor 0,01 não corrigido.

4. CONCLUSÕES

As análises de diversidade alpha com os índices de Shannon e Ssimpson não demonstraram diferença entre os grupos de alta e baixa eficiência com base no consumo alimentar residual, assim como a diversidade beta com unifrac ponderado também não identificou semelhança entre os grupos com base no CAR ou idade ao abate. Quanto a análise de microrganismo diferencialmente abundantes apenas a linhagem Caipirinha apresentou um microrganismo diferencialmente significativo, o *Ruminococcus_B_lactaris*, estando presente em maior abundância no grupo de alto consumo alimentar residual, podendo assim ser microrganismo candidato ao bem-estar e produção animal, contudo mais estudo são necessário quanto a fisiologia deste microrganismo para poder compreender sua possível atuação simbiótica ao animal, informações como possíveis substrato e produtos metabólicos que possam ser utilizado pelo animal ou comunidade microbiológica favorecendo assim o animal e equilíbrio deste microbioma.

REFERÊNCIAS

- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Chen, S., Xiang, H., Zhu, X., Zhang, H., Wang, D., Liu, H., ... Zhao, X. (2018). Free dietary choice and free-range rearing improve the product quality, gait score, and microbial richness of chickens. *Animals*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/ani8060084>
- Choi, J. H., Kim, G. B., & Cha, C. J. (2014). Spatial heterogeneity and stability of bacterial community in the gastrointestinal tracts of broiler chickens. *Poultry Science*, 93(8), 1942–1950. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-03974>
- De Cesare, A., Do Valle, I. F., Sala, C., Sirri, F., Astolfi, A., Castellani, G., & Manfreda, G. (2019). Effect of a low protein diet on chicken ceca microbiome and productive performances. *Poultry Science*, 98(9), 3963–3976. <https://doi.org/10.3382/ps/pez132>
- José, V., Savino, M., Augusto, A., Coelho, D., Fernandes, M., & Aurélio, M. (2007). Revista Brasileira de Zootecnia Avaliação de materiais genéticos visando à produção de frango caipira em diferentes sistemas de alimentação Evaluation of genetic populations of chicken to different diets in free-range broiler production systems.
- Kennedy, B. W., van der Werf, J. H., Meuwissen, T. H., Properties, S., & Intake, R. F. (1993). Genetic and Statistical Properties. *Journal of Animal Science*, 71(1991), 3239–3250. <https://doi.org/10.2527/jas1993.71123239x>
- Koch, R. M., Swiger, L. A., Chambers, D., & Gregory, K. E. (1963). Efficiency of Feed Use in Beef Cattle. *Journal of Animal Science*, 22(2), 486–494. <https://doi.org/10.2527/jas1963.222486x>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, 15(2). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Li, F., Li, C., Chen, Y., Liu, J., Zhang, C., Irving, B., ... Guan, L. L. (2019). Host genetics influence the rumen microbiota and heritable rumen microbial features associate with feed efficiency in cattle. *Microbiome*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0699-1>
- Lozupone, C., & Knight, R. (2005). UniFrac: a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities, 71(12), 8228–8235. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8228>
- Marchesi, J. R., & Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, 3(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>

- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700.
- Pan, D., & Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5(1), 108–119. <https://doi.org/10.4161/gmic.26945>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P. A., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36(10), 996. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- R Core Development Team. (2008). R: a language and environment for statistical computing, 3.6.0. Document Freely Available on the Internet at: <Http://Www.r-Project.Org>. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Rawls, J. F., Mahowald, M. A., Ley, R. E., & Gordon, J. I. (2006). Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell*, 127(2), 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.043>
- Salanitro, J. P., Fairchilds, I. G., & Zgornicki, Y. D. (1974). Isolation, culture characteristics, and identification of anaerobic bacteria from the chicken cecum. *Applied Microbiology*, 27(4), 678–687. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4596749> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC380117>
- Siegerstetter, S. C., Schmitz-Esser, S., Magowan, E., Wetzels, S. U., Zebeli, Q., Lawlor, P. G., ... Metzler-Zebeli, B. U. (2017). Intestinal microbiota profiles associated with low and high residual feed intake in chickens across two geographical locations. *PLoS ONE*, 12(11), 1–23. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187766>
- Singh, K. M., Shah, T. M., Reddy, B., Deshpande, S., Rank, D. N., & Joshi, C. G. (2014). Taxonomic and gene-centric metagenomics of the fecal microbiome of low and high feed conversion ratio (FCR) broilers. *Journal of Applied Genetics*, 55(1), 145–154. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0179-4>
- Smyth, G. K. (2004). Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1). <https://doi.org/10.2202/1544-6115.1027>
- Stanley, D., Hughes, R. J., & Moore, R. J. (2014). Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: Influence on health, productivity and disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(10), 4301–4310. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5646-2>

- Takahashi, S. E., Mendes, A. A., Saldanha, E. S. P. B., Pizzolante, C. C., Pelícia, K., Garcia, R. G., ... Quinterio, R. R. (2006). Efeito do sistema de criação sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte tipo colonial. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 58, 624–632.
- Waite, D. W., & Taylor, M. W. (2014). Characterizing the avian gut microbiota: membership , driving influences , and potential function, 5(May), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00223>
- Xiao, Y., Xiang, Y., Zhou, W., Chen, J., Li, K., & Yang, H. (2017). Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poultry Science*, 96(5), 1387–1393. <https://doi.org/10.3382/ps/pew372>
- Yu, Z., & Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, 36(5), 808–812. <https://doi.org/10.2144/3605A0808>

APÊNDICE

Tabela e informações composicionais da dieta.

Composição: Milho integral moído, farelo de soja, cloreto de sódio, farelo de arroz, farelo de glúten de milho 21, fosfato bicálcico, calcário calcítico, caulim, DL-metionina, L-lisina, vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, nicotinamida, ácido fólico, ácido pantotêmico, sulfato de ferro, sulfato de cobre, óxido de zinco, sulfato de manganês, iodato de potássio, selênio de sódio, cloreto de colina, biotina, aditivo de fúngico (propionato de cálcio) antioxidante (B.H.T).

Eventuais substitutos: Farelo de trigo, sorgo integral moído, carbonato de cálcio, farelo de glúten de milho 60, farelo de girassol, soja integral extrusada, farelo de algodão e milho pregel.

Tabela 1. Informações de níveis de garantia de composição da ração.

Ingredientes	Ração para pintinhos 1 a 30 dias	Ração para pintos de 30 a 60 dias
Umidade (Max)	130,00 g/kg	130,00 g/kg
Proteína bruta (Min)	190,00 g/kg	170,00 g/kg
Extrato Etéreo (Min)	30,00 g/kg	30,00 g/kg
Fibra Bruta (Max)	40,00 g/kg	40,00 g/kg
Matéria Mineral (Max)	70,00 g/kg	70,00 g/kg
Calcio (Min)	7500,00 mg/kg	7500,00 mg/kg
Calcio (Max)	9990,00 mg/kg	9990,00 mg/kg
Fosforo (Min)	6000,00 mg/kg	6000,00 mg/kg
Metionina (Min)	4000,00 mg/Kg	4000,00 mg/Kg
Lisina (Min)	10,00 g/kg	10,50 g/kg
Vitamina A	8800,00 UI/Kg	8800,00 UI/Kg
Vitamina D	1600,00 UI/Kg	1600,00 UI/Kg
Vitamina E	28,00 UI/Kg	28,00 UI/Kg
Vitamina K	1,6 mg/kg	1,6 mg/kg
Vitamina B1	1,20 mg/Kg	1,20 mg/Kg
Vitamina B2	4,00 mg/Kg	4,00 mg/Kg
Vitamina B6	2,00 mg/Kg	2,00 mg/Kg
Vitamina B12	10,00 mcg/Kg	10,00 mcg/Kg
Niacina	30,00 mg/Kg	30,00 mg/Kg
Ácido Fólico	0,640 mg/Kg	0,640 mg/Kg
Ácido Pantotênico	12,00 mg/Kg	12,00 mg/Kg
Ferro	44,00 mg/Kg	44,00 mg/Kg
Cobre	12,00 mg/Kg	12,00 mg/Kg
Zinco	60,00 mg/Kg	60,00 mg/Kg
Manganês	60,00 mg/Kg	60,00 mg/Kg
Iodo	0,80 mg/Kg	0,80 mg/Kg
Selênio	0,20 mg/Kg	0,20 mg/Kg
Biotina	0,06 mg/Kg	0,06 mg/Kg
Colina	240 mg/Kg	240 mg/Kg