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

**Identificação de polimorfismos associados às características de
desempenho e carcaça no cromossomo 4 da galinha (*Gallus gallus*)**

Fábio Pértile

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

**Piracicaba
2013**

Fábio Pértile
Médico Veterinário

**Identificação de polimorfismos associados às características de desempenho
e carcaça no cromossomo 4 da galinha (*Gallus gallus*)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Pértille, Fábio

Identificação de polimorfismos associados às características de desempenho e carcaça no cromossomo 4 da galinha (*Gallus gallus*) / Fábio Pértille.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
103 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Carcaça 2. Cromossomo 4 3. Frangos de corte - Desempenho 4. Galinhas
5. Genes candidatos 6. Mapeamento genético 7. Melhoramento genético animal
8. Polimorfismo I. Título

CDD 636.513
P469i

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

DEDICATÓRIA

Você sabe como é:

*Pegar uma dissertação, chegar à
dedicatória, e mais uma vez, ver que o
autor a dedicou para outra pessoa...*

Dedico essa dissertação a você leitor

*É sabido que, por você estar diante dela,
contribuiu ou irá contribuir para a
continuidade do desenvolvimento desta área
tão importante na pesquisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que ajudaram a construir este trabalho não é tarefa fácil. O maior problema no agradecimento seletivo não é decidir quem será incluso, mas sim quem não será mencionado. Por isso tenho que demonstrar minha imensa gratidão a todos os meus amigos que de uma forma ou de outra, contribuíram em cada uma das minhas descobertas realizando sugestões efetivamente importantes.

O maior agradecimento é dirigido aos meus pais, por terem sido o contínuo apoio no decorrer de todos esses anos, ensinando-me, principalmente a coerência entre os valores morais, sendo o alicerce da formação da minha personalidade carregada de empenho dedicação e determinação sendo assim, obrigado Nelita Augusta Pértile e Francisco Natal Pértile.

“Mestre não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo” (anônimo). Obrigado ao orientador de mestrado professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho e co-orientadora Mônica Corrêa Ledur, exemplos de profissionalismo.

Agradeço à Universidade de São Paulo pela oportunidade de ingresso e aparato necessário para o sucesso de todo procedimento envolvido no decorrer desses dois anos de mestrado.

À equipe do laboratório de Biotecnologia do departamento de Zootecnia da Universidade de São Paulo – ESALQ. Aqui tenho que ressaltar a figura ilustre da Felizéti (Andrezza Maria Felício) por todo o aparato científico e pessoal nestes dois anos. Ao Gustavo Gasparin, pelas rizadas e pelo apoio científico, ao Millor, Priscila, Sônia, aos técnicos Nirlei e Forjão (Jorge Andrade) e Ricardo “Amado” pelo apoio e amizade. Também tenho que lembrar as amigadas no departamento: Gustamoxstru (Gustavo Napoles), GreenBally (Carlos Eduardo), Birobiro (Renato Alves Prioli), Pé friu (Grégori Rovadoscki, que ainda deve uma frangada), famoso grupo SUCESSO S.A., que se estendeu nos últimos tempos com o nôno Adriano Anselmi e Vinícius Mourão e por fim acabou se desmembrando devido às ótimas oportunidades de emprego que foram surgindo. As dificuldades da pós-graduação se tornavam, por momentos, irrisórias quando essa turma se unia. Grandes amigas Bebezona (Milla Albuquerque) e Jacqline, “Top the line”, Gabriela Fuini Cravo e Canela, sempre

juntos resolvendo problemas profissionais e pessoais (parte feminina do Grupo SUCESSO S.A.).

Ao pessoal do laboratório de Quantitativa do professor Gerson sobre tudo: Aline, Joana, Mary Ana, Gregori e em especial a minha prima Simone Fernanda Nedel Pértile que contribuiu fortemente desde minha chegada em Piracicaba.

Ao pessoal do laboratório do meu prezado orientador de iniciação científica professor Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa (DNA-UDESC), sobre tudo à Ediane, Marcos, Mary Elen, Felipe e Filipe.

Um agradecimento mais do que especial a Alice Cassetari, o maior dos apoios pessoais nesses dois anos. Ao apoio nas referências até a descoberta do *Endnote*, pelos finais de semana que passou falando A1,B1,...H1,...H12 enquanto eu diluía placas 96PCR. Aos CX,CC,XX, XX? enquanto eu analisava meus genótipos, meu MUITO OBRIGADO.

A todos os meus amigos, os que estão perto e os que estão longe. Marcio Maniero (meu colega de graduação) e sua família, que me deram todo suporte necessário para minha estadia em Piracicaba. A Jéssica Nora Drum, nossa inquilina que ficou responsável pela animação da família nesse último ano. Xicão (Francisco Vendruscolo e Alemão (Felipe Schaabe), grandes amigos da graduação que nem tenho palavras para agradecer o apoio mesmo à distância. Minha turma da graduação dos PELEGOS (Hoffmann e Katy, Helena, as Brunis, Heitor, Jacks, Elisa, Karina, Leíse, Alencar, Diegão...).

Também agradeço ao pessoal do laboratório de sanidade animal e genética da Embrapa Suínos e Aves (Concórdia - SC) que de alguma forma contribuíram positivamente no desenvolvimento deste trabalho, pelas oportunidades, pelos ensinamentos, pela confiança e pela amizade. Agradeço especialmente ao técnico Alexandre Luiz Tesmman pela amizade e contribuição científica, à Luisa, Lívia, Marjo, Aline, Síndia, Gislaine, Edimara, Luciane, João, pela grande amizade que construímos dentro da Embrapa. Aos pesquisadores Jalusa Deon Kich, Jane Oliveira Peixoto, José Rodrigo Pandolfi, Mônica Correa Ledur e Ricardo Zanella, pelo grande apoio científico e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pelo apoio financeiro de 5 meses e principalmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP por ter assumido este financiamento.

BIOGRAFIA

Fábio Pértile – Nascido em Chapecó - SC, passou parte de sua vida deslocando-se de cidade em cidade catarinense. Estudou grande parte de sua vida em colégio particular. Foi na quinta série do ensino médio que teve que passar a estudar em escola pública devido a uma crise financeira de sua família. Graças à posterior estabilização financeira voltou no segundo grau à escola privada. Concluiu seu ensino médio no Colégio Energia em Florianópolis onde posteriormente fez curso pré-vestibular e passou no ano de 2006 em Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) no Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) em Lages.

Durante a graduação se dedicou à pesquisa começando como estagiário em laboratório de microbiologia e posteriormente em laboratório de Genética Animal onde ficou por um ano e depois assumiu uma bolsa de iniciação científica cedida pela PROBIC sob orientação do professor Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa desenvolvendo um trabalho na área de imunogenética em galinhas caipiras por dois anos até sua saída para estágio final obrigatório no segundo semestre de 2009.

Durante suas férias, na graduação, procurava fazer estágios em áreas distintas aos estágios da universidade, dentre as áreas de interesse podemos destacar inspeção animal, manejo reprodutivo de suínos e avicultura (todas as etapas de produção).

Seu estágio final iniciou-se em julho de 2009 na Embrapa Suínos e Aves do município de Concórdia onde realizou um trabalho com Genômica de Aves sob supervisão da pesquisadora Dra. Mônica Corrêa Ledür e finalizou o estágio em agosto do mesmo ano. De agosto ao final de outubro realizou a segunda parte de seu estágio na Universidade Estadual Paulista (UNESP) campus de Botucatu no laboratório de Virologia sob supervisão do professor Dr. João Pessoa Araújo Junior acompanhando a rotina de um laboratório de diagnóstico molecular em cães e gatos.

Em novembro de 2009, defendeu seu estágio final obrigatório a uma banca formada pelos professores: Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa, Dr. Jaqueline Battilana e Dr. Mere Erika Saito alcançando um conceito excelente no desenvolver das atividades, apresentação oral e relatório de estágio curricular obrigatório.

Foi neste ultimo período de estágio, na UNESP, que prestou a prova para mestrado na Universidade de São Paulo no Campus Escola de Ensino Superior “Luiz de Queiroz” no programa de “Ciência animal e Pastagens” na área de Biotecnologia sob orientação do professor Dr. Luiz Lehmann Coutinho e co-orientação da Pesquisadora Dr. Mônica Corrêa Ledür da Embrapa Suínos e Aves.

Formou-se no dia 4 de dezembro de 2011 obtendo o Grau de Médico Veterinário.

Recebeu através de seleção por mérito curricular, uma bolsa de mestrado financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) que foi assumida, em março de 2011, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) até a defesa do título de Mestre em Ciência Animal.

*"Não me sinto obrigado a acreditar
que o mesmo Deus que nos dotou de sentidos,
razão e intelecto, pretenda que não os utilizemos."*

Galileu Galilei

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 IMPORTÂNCIA DA AVICULTURA	19
2.1.1 Melhoramento genético de aves	20
2.1.2 Avanços alcançados e perspectivas	21
2.1.3 Biotecnologia aplicada ao melhoramento de aves	22
2.1.4 Populações Experimentais.....	32
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 POPULAÇÕES AVALIADAS.....	39
4.2 CARACTERÍSTICAS AVALIADAS.....	39
4.3 SELEÇÃO DE GENES CANDIDATOS.....	41
4.4 AMPLIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NOS GENES CANDIDATOS	41
4.5 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS.....	43
4.6 ANÁLISES DOS RESULTADOS.....	43
4.6.1 Efeito dos marcadores sobre as características estudadas	44
4.7 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD)	45
4.8 HAPLÓTIPOS.....	45
4.8.1 Efeito dos genes para diferentes combinações de alelos	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E DILUIÇÃO DE DNA.....	47
5.2 SELEÇÃO DAS REGIÕES A SEREM AMPLIFICADAS E IDENTIFICAÇÃO DOS POLIMORFISMOS	47
5.3 AMPLIFICAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO	48
5.4 SEQUENCIAMENTO E SELEÇÃO DAS FAMÍLIAS MAIS INFORMATIVAS GENOTIPICAMENTE	50
5.5 GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS	51
5.6 DESCRIÇÃO DOS POLIMORFISMOS DETECTADOS	56
5.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	56
5.7.1 Estudo de associação dos marcadores com as características fenotípicas	58
5.8 ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO (LD)	69
5.8.1 Efeito dos haplótipos sobre as características estudadas	73
5.9 EFEITO DOS GENES PARA DIFERENTES COMBINAÇÕES DE ALELOS	75
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	93
ANEXOS.....	99

RESUMO

Identificação de polimorfismos associados às características de desempenho e carcaça no cromossomo 4 da galinha (*Gallus gallus*)

Dentre o setor agropecuário, a avicultura é a que mais tem demonstrado índices de evolução nos últimos anos. Esses avanços são obtidos principalmente por meio da nutrição, manejo dos animais e seleção genética. A biotecnologia tem ganhado papel de destaque com o uso de marcadores moleculares como ferramenta para acrescentar informações genômicas aos processos de melhoramento convencional. Estudos anteriores em uma população F_2 originada do cruzamento de frangos de corte e postura permitiram a identificação de um SNP no gene *FGFBP1* (Proteína de ligação do fator de crescimento do fibroblasto 1) (g. 2014 G> A) no cromossomo 4 de *Gallus gallus* (GGA4). Este gene está em uma região de QTLs associado com rendimentos de coxa e sobrecoxa, peso vivo aos 35 e 41 dias de idade. O objetivo deste trabalho foi investigar um QTL previamente descrito para identificação de polimorfismos adicionais e suas associações com características de importância econômica utilizando testes de associação de um ou mais marcadores. Três genes candidatos posicionais foram identificados nesta região de QTL: *KLF3* (*Krüppel-like factor 3*), *SLIT2* (*Slit homolog 2*) e *PPARG* (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1alpha*). O sequenciamento destes genes em onze ($n=11$) animais F_1 permitiu a identificação de um polimorfismo em cada gene: g.6763 C> T (*KLF3*), g.187737 C> A (*SLIT2*) e g.76638826 -/TTTCT (*PPARGC1A*). Essas mutações foram genotipadas em uma população segregante F_2 ($n=276$) e em uma linhagem pura de corte TT ($n=840$) da Embrapa Suínos e Aves. A frequência dos alelos para o gene *KLF3* na população F_2 foi de C=50% T=50% e na pura TT de C=98% T=2%, para o gene *SLIT2* na população F_2 foi de A=25% C=75% e na pura TT de A=30% C=70%, para o gene *PPARGC1A* na população F_2 foi de Del=43% In=57% e na pura TT Del=33% C=67%, representando que estes polimorfismos estão segregando nas duas populações. Associações destes polimorfismos foram observadas ($P<0,05$) com várias características de desenvolvimento e carcaça na população F_2 e na linhagem pura TT, sendo que algumas foram confirmadas nesta população como: pesos de fígado, coxas, ganhos de peso dos 35 aos 41 dias com g.6763 C> T (*KLF3*) e pesos das asas, cabeça, carcaça, dorso, coxas, peito, fígado e gordura abdominal com g.76638826 -/TTTCT (*PPARGC1A*) indicando que esta região de QTL é importante para características de produção e desempenho em frangos de corte.

Palavras-chave: Frango; Genes Candidatos; Polimorfismo e QTL

ABSTRACT

Identification of Polymorphisms Associated with Performance and Carcass Traits in Chromosome 4 of Chicken (*Gallus gallus*)

Within the livestock sector, the broiler industry has showed fastest growing rates in past decades. Those advances were achieved mainly because a better understanding of the nutrition requirements, animal management and animal genetics. Biotechnology has gained a prominent role with the use of molecular markers as a tool for adding genomic information to conventional breeding processes. Previous studies using an F_2 population developed from a broiler x layer cross led to the identification of a SNP on the Fibroblast growth factor binding protein 1 (*FGFBP1*) (g. 2014G> A) on *Gallus gallus* chromosome 4 (GGA4). This gene is part of a QTL associated with thigh & drumstick yields, weight gain at 35 and 41 days. This paper investigates the previously identified QTL for the identification of additional polymorphisms and their associations with important economic traits using a single and multiple markers tests. Three positional candidate genes were identified on the QTL region: *KLF3* (Krüppel-like factor 3), *SLIT2* (Slit homolog 2) and *PPARG* (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1alpha). Sequencing of those genes was conducted in eleven ($n=11$) F_1 animals and one polymorphism was identified in each gene g.6763 C> T (*KLF3*), g.187737 C> A (*SLIT2*) and g.76638826 -/TTTCT (*PPARGC1A*). These mutations were genotyped in an F_2 ($n=276$) and a pure broiler line ($n=840$) from Embrapa. The frequency of the genes alleles were: *KLF3* gene in F_2 population C = 50% T = 50% and pure TT population C = 98% T = 2%; *SLIT2* gene in F_2 population A = 25% C = 75% and pure TT population A = 30% C = 70%; *PPARGC1A* gene in F_2 population Del = 43% and In = 57% and pure TT population Del = 33% C = 67% indicating that those polymorphisms are still segregating in both populations. Association was identified ($P < 0,05$) with several carcass and development traits in the F_2 and Pure TT population, some which were confirmed like liver, drumstick weights, weight gain from 35 to 41 days with g.6763 C> T (*KLF3*) and wings, had, carcass, back, drumstick, breast and liver and abdominal fat weights with g.76638826 -/TTTCT (*PPARGC1A*) indicating that this QTL region is important for production and performance traits of broiler.

Keywords: Broiler; Candidate Gene; Polymorphism and QTL

1 INTRODUÇÃO

A avicultura de corte é o agronegócio que mais tem demonstrado índices de evolução nos últimos anos e é de grande importância para o agronegócio nacional.

Em 2010, ano de consolidação da união da UBA (União Brasileira de Avicultura) e ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos) o Brasil bateu recorde de produção de frangos, aproximando-o do segundo posto mundial. Também se registrou recorde histórico em volume de exportação para mais de 150 países. As projeções indicam que em 2013 o Brasil responderá por crescimentos moderados em relação aos ocorridos em 2011 considerando o cenário de crise corrente, em especial, nos países desenvolvidos (UBABEF, 2010/2011).

O fato da galinha (*Gallus gallus*) apresentar um curto intervalo de gerações (CABALLERO, 1994) a coloca como importante modelo animal para ser utilizada em programas de melhoramento genético convencional que é baseado somente no fenótipo do animal (JORGE et al., 2007)

Porém, como ferramenta para o melhoramento genético clássico de *Gallus gallus*, os estudos no genoma desta espécie tem contribuído para o melhor entendimento da arquitetura genética e suas relações com fenótipos de interesse zootécnico. Como exemplos de estudos com esse objetivo temos a obtenção de marcadores moleculares (EMARA e KIM, 2003), construção de mapas de ligação (AMBO et al., 2008), estudos de expressão gênica (CASTELHANO-BARBOSA et al., 2005) e mapeamento de QTLs (*loci* para características quantitativas) (MACKAY, 2001).

O mapeamento de QTLs é importante, pois os QTLs encontrados podem auxiliar na localização de genes. O que tem tornado difícil e demorado para a identificação destes genes é o fato de que cada *locus* controla apenas uma pequena fração de variância fenotípica (WONG et al., 2004). Por isso, a descrição da arquitetura genética de uma característica quantitativa não está completa até que possamos especificar quais sítios polimórficos nos genes identificados como QTLs, assim como suas interações, causa de fato, a diferença no fenótipo da característica (MACKAY, 2001). Para tal, exige-se uma análise completa de QTLs, e isso envolve o mapeamento tradicional de QTLs e em seguida, o mapeamento de malha fina

(ARBILLY et al., 2006) que segundo Papachristou e Lin (2006) deve ser feito baseado em métodos de associação focado em regiões associadas com características de interesse.

Estudos anteriores do nosso grupo permitiram identificar vários QTLs no genoma da galinha (MOURA et al., 2006; NONES et al., 2006; RUY et al., 2007; AMBO et al., 2009; CAMPOS et al., 2009; ROSÁRIO et al., 2010; BARON et al., 2011; NONES et al., 2012). Entre os QTLs identificados, merece destaque o posicionado no GGA4 que foi mapeado para peso vivo aos 35 e 41 dias de idade (AMBO et al., 2009) e posteriormente para rendimentos de coxa e sobre coxa (BARON et al., 2009) e está entre os marcadores microssatélites *MCW0240* (198,7cM) e *LEIO063* (235,2 cM). Ensaios iniciais de mapeamento fino no gene candidato posicional *FGFBP1* (Proteína de Ligação do Fator de Crescimento do Fibroblasto 1), permitiram identificar polimorfismos neste gene. O estudo de um destes polimorfismos permitiu a identificação de associações do mesmo com: peso eviscerado, perdas de água por exsudação e teor de vermelho da carne em uma linhagem comercial de frangos de corte (FELÍCIO, 2012). No entanto, o estudo de apenas um SNP (polimorfismo de um único nucleotídeo) apresenta limitações, pois não é possível determinar com precisão se o SNP está próximo ou não da mutação causal. Para avançar na identificação da possível mutação causal responsável por este QTL no GGA4, o presente estudo teve como objetivo fazer um mapeamento fino da região que engloba os marcadores *MCW0240* e *LEIO063*. Desta forma, o trabalho teve como objetivos: 1) Identificar três genes candidatos posicionais nesta região; 2) Sequenciar parte destes genes a procura de polimorfismos presentes entre linhagens de frango de corte e postura; e 3) Testar a associação dos polimorfismos encontrados com características fenotípicas de interesse zootécnico nas populações referência F₂(TCTC) e pura TT da Embrapa Suínos e Aves.

Como muitos estudos na galinha doméstica têm sido realizados na tentativa de encontrar polimorfismos em genes candidatos associados com características de interesse, esse trabalho se justifica em virtude da possibilidade de identificação e seleção de indivíduos com características favoráveis de desempenho e carcaça, favorecendo a agroindústria avícola na produção e processamento desses animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da avicultura

A produção avícola é uma atividade de destaque no setor agropecuário devido a sua representatividade como fonte de proteína animal para consumo. Em 2010, foram consumidas 75 milhões de toneladas de carne de frango sendo que os maiores consumidores foram: EUA, China, União Europeia, Brasil e México (BALL e WANG, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais consumidores de carne de frango

País/ano	2006	2007	2008	2009	2010	2011
EUA	13.671	13.582	13.428	12.94	13.463	13.67
China	10.371	11.415	11.954	12.21	12.457	12.89
União Europeia	7.656	8.358	8.564	8.692	8.779	8.87
Brasil	6.853	7.384	7.792	8.032	9.132	8.301
México	3.01	3.061	3.281	3.264	3.344	3.388
Mundo	64.385	68.308	71.032	71.86	75.127	75.277

Fonte: USDA

Valores em milhões de toneladas

O Brasil tem um papel importante na produção de frango mundialmente, devido aos baixos custos de produção favorecendo a competitividade de mercado (MORAES e CAPANEMA, 2012). A produção avícola tem demonstrado altos índices de evolução nos últimos anos principalmente em relação à avicultura de corte. Em 2010, o Brasil bateu recorde histórico de produção de frangos exportando para mais de 150 países, superando 12 milhões de toneladas e o aproximando do segundo posto mundial. Em 2011 a produção de frangos atingiu 13,084 milhões de toneladas, quase 6,9% a mais do que o total produzido no ano anterior e a exportação passou a 3,9 milhões de toneladas, crescimento de 2,7% em relação ao volume total de 2011. As projeções indicavam que em 2012 mesmo em meio às dificuldades em relação ao câmbio monetário e a carga tributária o Brasil responderia por crescimentos semelhantes aos ocorridos em 2011 (UBABEF, 2010/2011).

Porém, depois de passar por crises em 2006 (Influenza Aviária) e em 2009 (economia mundial), a avicultura de corte do Brasil enfrenta a crise das matérias-primas em 2012 e pela primeira vez no século XXI, sofre redução na produção brasileira em relação ao ano anterior. Porém, o Departamento de Agricultura dos

Estados Unidos da América (USDA)(BALL e WANG, 2012) prevê que essa redução de produção em 2012 será em níveis conservadores, assim como a previsão para retomada em 2013, o qual a produção brasileira alcançará 13 milhões de toneladas (Gráfico1).

Gráfico 1 - Evolução da produção anual de carne de frango 2001 a 2013

Fonte: Dados da USDA (2012)

Eixo Y: milhões de toneladas, eixo X: anos (2001 a 2013)

O Brasil é o primeiro exportador mundial de carne de frango, o que totaliza 3,6 milhões de toneladas/ano, sendo o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, com cerca de 11 milhões de toneladas produzidas anualmente. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) revelam perspectivas de uma taxa de crescimento média em torno de 3,6% ao ano de 2008 a 2020 (MENDES, 2010).

As melhorias na nutrição, manejo (equipamento e instalações) e melhoramento genético de frangos tem contribuído para esses altos índices de produtividade alcançados (HUNTON, 1990). Porém, dois trabalhos que visaram o estudo do efeito da seleção genética em relação à nutrição, em uma linhagem comercial de 2001 (Ross 308) e uma linhagem controle de 1957, demonstraram uma contribuição de 85% dos ganhos na linhagem selecionada em relação à nutrição nas linhagens controle (10-15%) (HAVENSTEIN et al., 2003ab).

2.1.1 Melhoramento genético de aves

Há cerca de 7.000 anos a.C quando a galinha foi domesticada, nos tempos neolíticos, começavam-se os primeiros processos de melhoramento das aves. Mesmo antes dos conhecimentos da genética moderna, o homem já usava métodos de seleção com base no fenótipo dos animais. Porém, as estimativas e estudos das

relações que envolvem a natureza e magnitude das diferenças ambientais, genotípicas e fenotípicas, iniciaram na Europa em 1950 (SIEGEL et al., 2006) e no Brasil duas décadas mais tarde (MORAES e CAPANEMA, 2012).

A discussão da necessidade de implantar sistemas de melhoramento de aves no Brasil já existia desde a década de 1940. Foi em meados de 1950, por meio do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuária do Centro Sul, que estas ações tiveram seu início principalmente nas instituições: ESALQ/USP, UFV, Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, Universidade Federal de Santa Maria e Embrapa (ALMEIDA e SILVA, 2009).

Em 1985 por decisão do MAPA, o centro de pesquisas em melhoramento genético de aves, passou a administrar a Granja Guanabara, no Estado do Rio de Janeiro e alguns anos depois, as instalações foram transferidas para Concórdia, em Santa Catarina, onde, em 1990, começou a funcionar o Sistema de Produção de Aves. Neste ano, uma preparação prévia à implantação do programa de melhoramento genético no Brasil de 1985 a 1989 ocorreu com a implementação de um programa com linhagens puras em que todo o ciclo de seleção era realizado no Brasil, porém a análise dos dados genéticos era realizada no exterior (MORAES e CAPANEMA, 2012).

Porém, em 1960 a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) já iniciava suas pesquisas e a partir de meados da década de 1970, a seleção de linhagens deu lugar às pesquisas em genética de galinhas (MORAES e CAPANEMA, 2012).

Atualmente, as instituições públicas continuam desenvolvendo trabalhos em genética de aves e desenvolvendo linhagens. Porém, a maioria dos programas nacionais de melhoramento genético fracassou ou foi adquirido por empresas multinacionais. Diante disto, a Embrapa Suínos e Aves, em uma visão de desenvolvimento genético de aves nacionais, realiza parcerias no setor público e iniciativa privada para desenvolver recursos genéticos destinados a atender as necessidades internas do país (SOUZA, 2011).

2.1.2 Avanços alcançados e perspectivas

Influenciado pelo melhoramento genético, de 1930 a 1970, conseguiu-se uma redução na idade de abate de 105 para 49 dias e em 2005 a redução foi para 42

dias, o que se manteve até 2010. Em relação ao peso médio da ave no abate, de 1930 para 1970, cresceu de 1,5 para 1,7kg e em 2010 alcançou 2,1kg. Em 1930, eram necessários 3,5kg de ração para produzir 1,0kg de frango, em 1970 eram necessários 2,15 kg e em 2005, eram necessários 1,8kg. Os dados preliminares de 2010 apontaram 1,7kg, ou seja, redução de aproximadamente 50%. A meta é alcançar 1,5kg, o que só é obtido em condições controladas de criação (MENDES, 2010; MORAES e CAPANEMA, 2012) (Gráfico 2).

A redução do valor da conversão alimentar que despencou entre 1930 a 1960 (Gráfico 2), assim como as progressões no volume e eficiência de produção foi possível devido às melhorias no manejo, nutrição, ambiente, instalações, sanidade e, principalmente, devido aos progressos obtidos pelo melhoramento genético (ALBERS e GROOT, 1998).

Gráfico 2 - Conversão alimentar de frangos

Fonte: BNDS

2.1.3 Biotecnologia aplicada ao melhoramento de aves

2.1.3.1 Genômica avícola

A aplicação da teoria da genética quantitativa no melhoramento tradicional tem proporcionado ganhos genéticos contínuos de todas as características associadas à produção em aves. Esse ganho, tem se assegurado na seleção em busca de características fenotípicas do animal ou estimativas do valor genético aditivo derivado deste fenótipo. Ou seja, seleção sem o conhecimento prévio do número de efeito dos genes que atuam nas características de interesse (LEDUR et al., 2004). Contudo, o ganho genético obtido pelo melhoramento tradicional

demonstra o poder do uso da genética quantitativa na seleção (DEKKERS, 1999). Porém, para as características quantitativas de efeito poligênico, como as de produção, faz-se necessário o uso da biotecnologia para elucidar seus controles genéticos (LEDUR et al., 2001).

Nas últimas duas décadas, grandes avanços ocorreram nos métodos disponíveis para identificação de variação no DNA, e o custo benefício destas técnicas tem se tornado cada vez menor. Em paralelo, a compreensão de como essas variações no DNA podem influenciar características fenotípicas, levou à procura de novas metodologias de avaliação genética.

Os primeiros mapas baseados em marcadores foram desenvolvidos usando a identificação de variação genética através de clivagem por enzimas de restrição (RFLP) por meio de sondas a procura de variação em fragmentos específicos (BECKMANN e SOLLER, 1983). Foi possível identificar QTLs associados com características fenotípicas com o uso de marcadores microssatélites, técnica que se baseia na detecção de variações de repetições de sequências curtas (QUELLER et al., 1993).

Como a maior parte das características fenotípicas de interesse comercial são controladas por certo número de genes conhecidos e que sobre o efeito pleiotrópico de outros genes sobre o gene candidato (LEDUR, 2001), o controle genético dessas características distribuídas no genoma passou a ser mapeado através de loci para características quantitativas (QTLs). Em outubro de 2012, o banco de dados de QTL (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/index>) reportou 172 publicações identificando mais de 3442 QTLs para 286 características. Mesmo assim o número de estudos publicados de QTL é limitado. A maior parte das informações é guardada pelas grandes empresas de genética avícola. Isto limita o conhecimento de inúmeros marcadores informativos para os cruzamentos industriais e a distribuição destes marcadores no genoma (FULTON, 2012).

As regiões de QTLs são extensas, alojando vários genes, o que torna difícil a seleção de alelos favoráveis e a utilização de marcadores (microssatélites) que flanqueiam esses QTLs devido à probabilidade destes estarem distantes da mutação causal (LEDUR et al., 2004). O mapeamento de QTLs auxilia na identificação e seleção de possíveis genes candidatos associados com o fenótipo em questão (WONG et al., 2004).

As diversas técnicas de biotecnologia, que têm empregado a abordagem do genoma da galinha, tais como a obtenção de marcadores moleculares, construção de mapas de ligação, mapeamento de QTLs e estudos envolvendo expressão gênica e identificação de proteínas, têm contribuído para a compreensão da arquitetura genética de características quantitativas de interesse econômico para a avicultura (MACKAY, 2001). Devido a esse fato, é importante especificar os sítios polimórficos nos genes identificados como QTLs e suas interações, para entender de fato as causas dos diferentes fenótipos observados (MACKAY, 2001).

Para o melhor entendimento dessas regiões, exige-se uma análise completa de QTLs através do mapeamento tradicional e em seguida, o mapeamento fino (ARBILLY et al., 2006) baseado em métodos de associação do genótipo com fenótipo, focando para regiões que sinalizam associação com a característica de interesse.

A seleção assistida por marcadores moleculares (MAS) é um método de seleção para essas regiões do genoma que influenciam características de importância comercial. Uma vez que as regiões foram identificadas, os marcadores de DNA podem ser utilizados para identificar aqueles indivíduos com desempenho superior, sendo assim, a seleção pode ser realizada em idade precoce. Estes marcadores podem não ser causais, mas podem ser usados para prever o fenótipo devido a sua proximidade com a variação causal (FULTON, 2012).

No melhoramento animal conduzido com o uso de marcadores moleculares, algumas limitações podem aparecer. Se o marcador genético não estiver correlacionado com a mutação causal na região a ser selecionada, depois de algumas gerações, devido à recombinação meiótica, poderia ocorrer a quebra de ligação, de tal modo que a relação do alelo com o marcador específico e o fenótipo favorável já não esteja presente. Além disso, a relação entre o alelo do marcador específico e o fenótipo, pode ocorrer dentro da mesma população e não necessariamente em outras. Outro grande problema é a correlação negativa que alguns fenótipos comerciais podem ter em relação a outros, o que dificulta a seleção (FULTON, 2012).

A partir disto, para aumentar o conhecimento da região, faz-se necessário a identificação de genes candidatos de sequência e ação biológica conhecida que estejam envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma determinada característica de interesse nessas regiões. A seleção assistida por marcadores, pela

identificação de regiões cromossômicas associadas à QTLs e mutações funcionais (causais), pode ser utilizada como complemento aos métodos tradicionais visando eliminar algumas limitações da seleção baseada somente no fenótipo (LEDUR et al., 2004).

2.1.3.2 Marcadores genéticos

Marcador genético é toda e qualquer variação oriunda de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA (correspondente a regiões expressas ou não do genoma). Ao se verificar que esses marcadores segregam de acordo com as leis mendelianas para características monogênicas ou apresentam distribuições compatíveis com as esperadas para características poligênicas, um marcador molecular é também definido como marcador genético (FERREIRA, 1996).

Do ponto de vista molecular ocorrem três tipos principais de variações ou polimorfismos na molécula de DNA: variação no número de sequências núcleo nas regiões repetitivas (CNVs); inserções e deleções (*InDels*) e as alterações de uma única base (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNPs).

2.1.3.3 Marcadores SNPs e *InDels*

Os SNPs são variações nucleotídicas resultantes de mutações de ponto que podem ser substituições, deleções e adições de nucleotídeos (REGITANO e COUTINHO, 2001). Classificadas em silenciosas ou sinônimas, quando há mudança de um códon por outro originando o mesmo aminoácido e não causando alteração na função da proteína produzida e *missense* ou não silenciosa, quando há mudança de um códon por outro alterando o aminoácido e ocasionando alterações estruturais e funcionais na proteína. Também podem ser classificadas em mutação sem sentido, quando a alteração de nucleotídeo resulta em um códon de parada (UAG, UAA UGA), que interrompe a proteína antes do seu término. Além disso, elas podem afetar a quantidade de proteínas produzidas quando ocorrerem em sequência de controle gênico (sequências de promotores) e podem promover *splicing* alternativo, alterações no padrão de expressão de genes (como no caso de alterações em sequências de promotores), geração ou supressão de códons de

terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro e alteração nos códons de iniciação de tradução (GUIMARÃES e COSTA, 2002).

Dentre as alterações do tipo SNP, as de maior frequência são as de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre purinas (A/G ou G/A) ou pirimidinas (C/T ou T/C), sendo denominadas de transições. Já as transversões são substituições de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa. Estas mutações têm origem principalmente em erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA, podendo também ser causadas por lesões no DNA ocasionadas por agentes ambientais. Caso essas mutações ocorram em células germinativas e sejam transmitidas às gerações seguintes, em uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismos (KWOK e GU, 1999).

Um nucleotídeo pode ser inserido ou excluído da sequência de bases do DNA. No processo de síntese proteica, cada trinca de bases corresponde a um determinado aminoácido, se uma ou duas bases forem adicionadas ou excluídas, ocorre deslocamento do módulo de leitura o que significa que toda a sequência de códons será alterada. Porém, inserções ou deleções de trincas de nucleotídeos podem apenas acrescentar ou excluir um aminoácido da cadeia polipeptídica, não alterando a sequência inteira de aminoácidos (GRIFFITHS e MOTTA, 2009).

Estudos tem relatado SNPs como agentes causais de certas patologias, ou mesmo tem definido um SNP como um marcador para pré-disposição para determinada doença. Porém, na busca pela compreensão de características genéticas complexas, pesquisas têm sido intensificadas no sentido de tentar associar ao fenótipo alterado, conjuntos de determinados SNPs, denominados haplótipos (BROOKES, 1999).

Em contraste com SNPs, que têm sido extensivamente estudados, outras formas de variação genética têm recebido atenção, tais como inserções e deleções (*InDel*) que alguns autores consideram também como SNP (VIGNAL et al., 2002). Esse tipo de variação é abundante em genomas de organismos modelo. Estudos em *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* têm mostrado que *InDels* representam entre 16 e 25% de todos os polimorfismos genéticos nestas espécies (BERGER et al., 2001; WICKS et al., 2001).

Os trabalhos do International Chicken Polymorphism Map Consortium (WONG e LIU et al., 2004) juntamente com o International Chicken Genome Sequencing Consortium (HILLIER et al., 2004), revelaram um total de 2,8 milhões de

polimorfismos no genoma da galinha. Este número é particularmente significativo quando se considera que o tamanho de genomas de aves é apenas 30-40% dos de mamíferos, que corresponde a uma densidade média de cerca de um polimorfismo a cada 350pb, sendo que cerca de 10% destes polimorfismos representam variantes de comprimento do tipo *InDel* (BRANDSTRÖM e ELLEGREN, 2007).

2.1.3.4 Mapeamento de QTL e Genes Candidatos

O mapeamento de *loci* que controlam características quantitativas (QTL) e estudos de expressão gênica são procedimentos utilizados para decifrar parte do controle genético de características fenotípicas de interesse econômico. A identificação de marcadores associados à QTLs pode ser feita através da varredura de todo o genoma, utilizando-se marcadores microssatélites (ANDERSSON et al., 1994) por meio de estudos de genes candidatos e SNPs (SHORT et al., 1997). Estudos de expressão gênica podem complementar esses achados, indicando genes que apresentam diferentes níveis de expressão e que possam conter a mutação causal que gera essa expressão diferenciada (LEDUR et al., 2004).

Genes candidatos funcionais para uma determinada característica são genes sequenciados e de ação biológica conhecida que estão envolvidos com características do desenvolvimento ou da fisiologia. Estes genes podem ser estruturais ou de uma via bioquímica regulatória que afeta a expressão da característica (BRYNE e MCMULLEN, 1996).

Com os avanços na área do conhecimento em genética molecular, a identificação de marcadores moleculares associados a características de interesse vem se tornando o principal objetivo de muitas pesquisas. De acordo com Peixoto et al. (2010), inúmeros marcadores tem sido desenvolvidos principalmente em populações segregantes F_2 com finalidade de complementar informação genômica aos métodos tradicionais de avaliação genética em programas de melhoramento por meio de seleção assistida. Contudo, para estes resultados obtidos em populações experimentais terem importância, eles devem ser validados em populações comerciais.

Em uma população experimental da Embrapa TCTC, oriunda de cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de postura (CC) e outra de corte (TT), mapas de ligação foram construídos e QTLs mapeados para características de desempenho e

carcaça nos cromossomos 1 (NONES, 2004; NONES et al., 2006), 2 e 4 (BARON et al., 2004), 3 e 5 (RUY et al., 2007), 11 e 13, 19, 23, 24, 26, 27 e 28 (AMBO, 2007), 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 (CAMPOS, 2007) e em todo o genoma (AMBO et al., 2009; CAMPOS et al., 2009; BARON et al., 2012; NONES et al., 2012). Na população CTCT da mesma instituição, trabalhos envolvendo cromossomo 1, 3 e 4 e a construção de mapas de ligação (ROSÁRIO et al., 2009; ROSÁRIO et al., 2010) foram realizados, além de estudos no cromossomo 2 e 5, que estão em andamento nesta população.

Em um estudo da identificação de polimorfismos em genes candidatos associados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em frangos, foram identificados seis genes como candidatos por estarem relacionados com características de interesse econômico na avicultura (FELÍCIO, 2012). Dentre eles, merece destaque o *FGFBP1* e *FGFBP2* localizados no cromossomo GGA4, posição g.76161317-76163848 e g.76145971-76147820 (NC_006091.3) respectivamente, entre os marcadores microssatélites flangeadores *MCW0240* e *LEIO063*. Os polimorfismos encontrados nestes genes contribuíram para um melhor entendimento das relações existentes entre esses genes e suas associações com características de interesse econômico na avicultura. Segundo Felício (2012) outros estudos podem ser realizados no mesmo intervalo de QTL em busca de outros genes candidatos posicionais que estejam associados com características de interesse zootécnico.

2.1.3.4.1 Genes Candidatos posicionais no GGA4

Gene *KLF3*

O *Krueppel-like factor 3* é uma proteína *zinc finger* traduzida pelo gene *KLF3* (Gene ID:51274) (SUE et al., 2008) que está localizado no GGA4 na posição entre 69144274 e 69158078 pb (NC_006091.3) em uma região de QTL entre os marcadores microssatélite *MCW240* e *LEIO063* (AMBO et al., 2009; BARON et al., 2010).

Este gene, pertence à família dos 17 fatores Krüppel de transcrição que é conhecida pela presença de um domínio de ligação de DNA *zinc-finger* triplo de Cys₂His₂ codificado perto do C-terminal, além de uma sequência de aminoácidos conservado (TGEKPY/FX) entre os *zinc fingers* (DANG et al., 2002; HALDAR et al.,

2007) e, é responsável pela repressão da transcrição por meio do correpressor transcricional CtBP (proteína de ligação carboxil-terminal) (PEARSON et al., 2011).

O gene *KLF3* desempenha diversos papéis biológicos como: regulação da proliferação, diferenciação e apoptose de muitos tecidos durante o crescimento embrionário (ANTIN et al., 2010), participa da regulação dos processos de adipogênese (SUE et al., 2008) assim como o metabolismo lipídico e utilização de ácido graxo no intestino e tecido reprodutivo (ZHANG et al., 2011). Também tem papel na eritropoiese (CROSSLEY et al., 1996), formação de tecidos linfáticos (GLYNNE et al., 2000; TURCHINOVICH et al., 2011) e desenvolvimento de células musculares (HALDAR et al., 2007).

Como regulador transcricional de genes musculares, o *KLF3* revela uma forte interação e sinergismo com o fator de resposta sérica (SRF), sendo identificado como candidato no reconhecimento do elemento de controle MPEX no promotor Creatina Músculo Quinase (MCK), além de aparecer em uma série de outros genes promotores musculares como Miosina de Cadeia Pesada IIa (MyHCIIa), Six4, Receptor de Canal de Cálcio 1-alfa (CaChR) e Alfa-actina esquelético (Sk α act) (HIMEDA et al., 2010).

Muitas proteínas KLF podem exercer efeitos opostos na regulação dos mesmos processos celulares (CHEN et al., 2010). Por exemplo, o KLF2 e *KLF3* regulam negativamente a adipogênese reprimindo a transcrição adipogênica de fatores como PPARG e CEBPA (Potencializador alpha de proteína de ligação), respectivamente (BANERJEE et al., 2003; SUE et al., 2008). Em contraste, o KLF4, KLF5 e KLF15 promovem a adipogênese via ativação do CEBPB e PPARG (MORI et al., 2005; OISHI et al., 2005; BIRSOY et al., 2008), respectivamente.

Gene *PPARGC1A*

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-Y), coactivator 1 alpha e beta (PGC-1) são transcritos do gene *PPARGC1A* (Gene ID: 422815 em *Gallus gallus*) (ESTERBAUER et al., 1999). Este gene está localizado no GGA4 na posição entre 73626292 e 73688018 pb (NC_006091.3) em uma região de QTL entre os marcadores microssatélite *MCW240* e *LEIO063* (AMBO et al., 2009; BARON et al., 2010).

PGC-1 alfa e beta regulam a ativação da ligação dependente e independente de um vasto número de receptores nucleares. Esta proteína é um coativador

transcricional que regula alguns genes envolvidos no metabolismo energético. Ela interage com o receptor nuclear *PPAR- γ* , permitindo a interação desta proteína com múltiplos fatores de transcrição. Pode estar envolvida também com a regulação da atividade da proteína de ligação de elemento resposta ao cAMP (CREB) e fatores de respiração nuclear (NRFs). Isso caracteriza uma ligação entre a estimulação da fisiologia externa e regulação da biogênese mitocondrial, sendo o principal fator de regulação da determinação de tipo de fibra muscular (CORTON e BROWN-BORG, 2005).

Durante exercícios tem sido observado que o gene ativa o PGC-1 α no músculo esquelético de humanos. Esta proteína pode também estar envolvida no controle da pressão sanguínea, regulação celular da homeostase do colesterol e desenvolvimento da obesidade (PILEGAARD et al., 2003).

Foi observado em estudos de expressão gênica em frangos, um papel importante desta proteína na biogênese mitocondrial, especialização de fibra muscular e termogênese adaptativa (UEDA et al., 2005). A maior expressão deste gene demonstrou efeito de aumento na deposição de gordura abdominal em frangos de corte (LARKINA et al., 2011). Em ratos, demonstra papel importante no transporte de glucose 4 (GLUT4) no músculo esquelético (SUWA et al., 2008). O GLUT4 é responsável pela translocação da insulina regulando a entrada de glicose na célula (JAMES et al., 1988).

Efeitos de aumento na deposição de gordura abdominal, densidade de gordura (LARKINA et al., 2011) e toucinho (ERKENS et al., 2006) foram observados em suínos que apresentaram maior expressão desse gene.

Um estudo indicou *PPARGC1A* como um potencial marcador para seleção contra gordura abdominal em frangos (WU et al., 2006). Em suínos houve associação de um SNP nesse gene com conversão alimentar (STACHOWIAK et al., 2007) e em bovinos com variação de gordura no leite (WEIKARD et al., 2005).

Gene *SLIT2*

A proteína *Slit homolog 2* é codificada pelo gene *SLIT2* (Gene ID:373967) que se encontra no GGA4 na posição entre 74558606 e 74803058 pb (NC_006091.3) em uma região de QTL mapeada entre os marcadores microssatélite *MCW240* e *LEIO063* (Ambo et al. 2009; BARON, et al., 2010). Na *Drosophila*, a proteína é produzida em uma série de tecidos incluindo as células da glia média (ROTHBERG

et al., 1988; ROTHBERG et al., 1990). A secreção de SLIT nas células da linha média da glia, também é necessária para a migração normal de células precursoras de músculo para longe da linha média (KIDD et al., 1999).

Proteínas SLIT são modulares, contém tipos de interação de domínio proteína-proteína e podem interagir com uma série de proteínas ainda não identificadas, assim como *Netrin*, *Laminin* (BROSE et al., 1999) e *Glipican 1* (LIANG et al., 1999), que são proteínas de ligação ao SLIT com determinação funcional ainda não conhecida.

Proteínas SLIT estão envolvidas na interação com outras proteínas afetando movimento e adesão de células, atividade de fatores de crescimento e ainda modulação de suas próprias atividades (HOLMES e NISWANDER, 2001).

2.1.3.5 Haplótipos e Desequilíbrio de ligação (LD): ferramentas para complementar a compreensão dos resultados das análises de associação gênética

Nos últimos anos têm sido identificados haplótipos associados com variações fenotípicas em várias espécies, estes trabalhos auxiliam na identificação de regiões cromossômicas associadas com fenótipos. Para identificar estes haplótipos, podemos utilizar como ferramenta informações do LD entre SNPs (BARRETT et al., 2005). O estudo de LD através do escaneamento genômico e estudos de associação com o uso da frequência dos alelos são duas ferramentas utilizadas na identificação de QTLs (IKEOBI et al., 2002; KIM et al., 2005).

O LD descreve como a variação na frequência de algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorre numa população em relação à frequência esperada de alelos pela formação aleatória de haplótipos na mesma população. Essas associações não aleatórias entre polimorfismos em *loci* diferentes são medidos pelo grau de LD (FALCONER, 1981).

Associação de haplótipos de SNPs nos genes da Apolipoproteína B1 e B2, relacionados com crescimento e obesidade corporal, permitiram identificar dois potenciais QTLs na região destes genes, um para deposição de gordura e outro para crescimento em frangos (ZHANG et al., 2006). No gene da prolactina foi identificado um haplótipo associado com produção de ovos em galinhas (CUI et al., 2006). Em relação às doenças, descobriu-se que alguns haplótipos englobando genes do MHC na galinha determinam diferenças notáveis na expressão de moléculas de superfície

celular de classe I, o que está relacionado à suscetibilidade para a doença de Marek (KAUFMAN et al., 1999).

O conhecimento de LD local e haplótipos nos estudos de associação tem se tornado cada vez mais importante, onde o uso destas informações tem o potencial de tornar uma pesquisa de associação genética mais abrangente e eficiente (BARRETT et al., 2005).

2.1.4 Populações Experimentais

Diferentes linhagens de galinha de corte ou postura foram desenvolvidas para serem utilizadas para diferentes finalidades, tais como em estudos genéticos (SIEGEL et al., 2006), porém a maior parte das linhagens é mantida por companhias privadas e não estão disponíveis para pesquisas.

2.1.4.1 População experimental F_2 da Embrapa Suínos e Aves

A população experimental F_2 da Embrapa Suínos e Aves, (Concórdia/SC) foi desenvolvida em colaboração com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP (Piracicaba/SP). Os trabalhos com genômica de galinha iniciaram em 1999 com o desenvolvimento de duas populações experimentais F_2 a partir do cruzamento de uma linhagem paternal de corte (designada TT) e uma de postura (designada CC). As duas populações F_2 foram designadas TCTC e CTCT devido aos cruzamentos recíprocos das linhagens parentais.

A linhagem TT se originou do cruzamento de linhagens comerciais provenientes das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*, enquanto que a CC originou da *White Leghorn* (ROSÁRIO et al., 2009). A linhagem TT é uma linha macho (Figura 1), cujo objetivo de seleção é melhorar o peso vivo, conversão alimentar, consumo de ração, rendimento de carcaça e partes, fertilidade, eclodibilidade e reduzir a gordura abdominal e as síndromes metabólicas (FIGUEIREDO et al., 2003).

Figura 1 - Reprodutor macho adulto da linhagem de corte TT
Fonte: Embrapa Suínos e Aves (2011)

A linhagem CC (Figura 2) é selecionada para características de produção de ovos, peso e qualidade do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade e redução do peso vivo (FIGUEIREDO et al., 2003).

Figura 2 - Ave de postura adulta da linhagem CC
Fonte: Embrapa Suínos e Aves (2011)

Para formar a geração F_2 , foram selecionados um macho e três fêmeas ao acaso de diferentes famílias da população F_1 . Cada macho F_1 fecundou três fêmeas F_1 , através de inseminação artificial, evitando-se parentes próximos. Um total de sete machos e 21 fêmeas F_1 de cada cruzamento (TC e CT) gerou cerca de 100 pintos F_2 por família de F_1 em 17 incubações, com intervalos de 15 dias durante oito meses, totalizando cerca de 4000 aves F_2 (metade de cada sexo e de cada cruzamento CT e TC) (NONES, 2004) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema simplificado da estrutura das duas populações Brasileiras F_2 de galinhas desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves, geradas a partir do cruzamento das linhagens de corte (TT) e postura (CC)

A população F_2 foi anelada, com controle de pedigree individual, e avaliada para características de desempenho e carcaça.

A Embrapa Suínos e Aves desenvolveu esta população F_2 a partir do cruzamento recíproco de linhagens divergentes de corte (CC) e postura (TT). Essas populações resultantes deste tipo de cruzamento são ideais para estudos de mapeamento de QTLs e identificação de genes candidatos, pois apresentam alta variabilidade genética (HALEY, 1999).

Essa população apresenta banco de DNA genômico, registro de pedigree de cada indivíduo e banco fenotípico com diversas características de interesse para a avicultura.

2.1.4.2 População Referência TT

A População Referência TT, desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves Concórdia/SC), foi originada a partir da expansão da linhagem paterna de frango de corte TT (Figura 1) pertencente ao Programa de Melhoramento Genético de Aves desta empresa.

A criação da população referência, pela expansão da linhagem de corte TT da Embrapa, teve como objetivo estudos genômicos de validação de marcadores associados na população F_2 e para descoberta de genes. Essa população é representativa da população F_2 estudada, tem um número considerável de

características avaliadas em grande número de animais e variabilidade fenotípica e alélica entre os indivíduos (PEIXOTO et al. 2010). Ela é composta por 1453 descendentes (Tabela 2) obtidos em 5 incubações.

Tabela 2 - Estrutura da população referência TT

Geração	Parentais	Filhos
Machos	20	699
Fêmeas	92	754
Total	112	1453

O processo de criação foi ao modo convencional para frangos de corte seguindo os padrões de vacinação, nutrição e manejo estabelecidos pela empresa.

Para as avaliações fenotípicas, as aves foram mantidas em boxes coletivos até 35 dias de idade e dos 35 aos 41 dias de idade foram alojadas em gaiolas individuais para a avaliação da conversão alimentar.

A identificação das aves foi feita por meio do uso de anéis metálicos com o número (identificação individual) para controle do *pedigree*.

A ração de crescimento foi fornecida do 1º ao 21º dia (20% de proteína bruta, 3200 Kcal de energia metabolizável), ração final do 22º ao 41º dia (18,5% de proteína bruta e 3200 Kcal de energia metabolizável) e abate aos 42º dias após jejum de seis horas. O peso e as medições de várias características de desempenho e carcaça, coleta de materiais biológicos e sangue para extração de DNA foram coletados durante o abate.

Aos 42 dias de idade, as aves foram abatidas após jejum pré-abate e foram coletados cinco mililitros de sangue para extração do DNA genômico, oitenta e cinco (n=85) características foram avaliadas.

Essa população desenvolvida apresenta banco fenotípico com diversas características de interesse para a avicultura, registro de pedigree e banco de DNA genômico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi identificar novos polimorfismos em genes candidatos e avaliá-los em uma população experimental de galinhas e uma população pura de corte, visando o entendimento de suas inter-relações e suas associações com características de interesse econômico na avicultura de corte.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Este estudo teve como objetivos:

- (i) Identificar 3 genes candidatos associados com características de interesse zootécnico em uma região de QTL do GGA4;
- (ii) Identificar polimorfismos em três genes candidatos posicionados em uma região de QTL do GGA4;
- (iii) Genotipar animais da população F_2 (TCTC) para cada polimorfismo identificado e testar associações entre os polimorfismos e as características fenotípicas avaliadas nesta população;
- (iv) Estudar as associações dos polimorfismos obtidas da população F_2 em animais da População Pura TT para cada polimorfismo identificado, testando associações entre os polimorfismos e as características fenotípicas nesta população de referência;
- (v) Determinar os possíveis haplótipos destas regiões testando associação dos mesmos com as características fenotípicas de interesse nas populações.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Populações avaliadas

Para o desenvolvimento deste projeto foi utilizado uma linhagem experimental da Embrapa Suínos e Aves, sendo que os estudos foram desenvolvidos na população TCTC com animais das gerações F_1 e F_2 e uma população de referência denominada População Referência Pura TT da mesma empresa.

As características fenotípicas da população experimental já haviam sido medidas e o DNA genômico dos animais F_1 ($n=11$), F_2 ($n=276$ animais) e Pura TT ($n=800$) já haviam sido extraídas através do protocolo do reagente DNAzol® (*Invitrogen Life Technologies*). As amostras já se encontravam diluídas e padronizadas a uma concentração final de $20\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$. As reextrações de amostras com baixa qualidade (razão $260/280 < 1,7$ ou $> 2,0$) foram realizadas a partir do método de extração e purificação de DNA adaptado de Sambrook e Russell (2001).

4.2 Características avaliadas

Várias características foram medidas previamente nas duas populações. Na população experimental F_2 da Embrapa foram avaliadas 36 características listadas na tabela 3 e na população pura TT da Embrapa foram avaliadas as 85 características listadas na tabela 4.

Tabela 3 - Lista de características coletadas da população TCTC (geração F_2)

Carcça	Rendimentos	Desempenho	Gordura	Órgãos
Peso das asas	Rend. Asa	Conversão alimentar dos 35	Gordura	Coração
Peso de cabeça	Rend. Cabeça	aos 42 dias		Fígado
Peso de carcaça	Rend. Carcaça	Comprimento do Intestino	Teor colesterol	Moela
Peso de dorso	Rend. Dorso	Consumo de Ração dos 35		Pulmões
		aos 42 dias		
Peso das coxas e sobrecoxas	Rend. Coxa e sobrecoxa	Eficiência alimentar dos 35	Teores colesterol	
Peso de peito	Rend. Gordura	aos 42 dias	e triglicerídeos	
Peso dos pés	Rend. Peito	Ganho de Peso dos 35 aos		
	Rend. Pés	42 dias		
	Rend. Coração	Peso ao nascimento		
	Rend. Fígado	Peso vivo aos 35 dias		
	Rend. Moela	Peso vivo aos 41 dias		
	Rend. Pulmao	Peso vivo aos 42 dias		

*Foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e os teores em mg/dL

A descrição detalhada das mensurações de características de gordura para a população F₂ é feita por Campos et al. (2009).

Tabela 4 - Lista de características (e siglas) avaliadas da População Referência pura TT

Característica	RENDIMENTO (porcentagem)	CARCAÇA (peso)
Asas	RASA	ASA
Carcaça	RC	PCR
Cabeça	RCAB	CAB
Carne das coxas	RCARCX	CARCX
Carne das coxas e sobrecoxas	RCARCXSCX	CARCXSCX
Carne do peito	RCARPT	CARPT
Carne das sobre coxas	RCARSCX	CARSCX
Coxa das asas	RCASA	CASA
Coração	RCOR	COR
Coxas	RCX	CX
Coxa e sobrecoxa	RCXSCX	CXSCX
Dorso	RDORS	DORS
Fígado	RFIG	FIG
Filé do peito	RFILPT	FILPT
Gordura abdominal	RGA	GA
Meio das asas	RMASA	MASA
Moela	RMO	MO
Osso do peito	ROSPT	OSPT
Pele da coxa	RPELCX	PELCX
Pele do peito	RPELPT	PELPT
Pele sobre coxas	RPELSCX	PELSCX
Pés	RPES	PES
Pescoço	RPESC	PESC
Ponta das asas	-----	PASA
Pós sangria de depena	-----	PPSD
Fêmures resfriados	RPFEM	PFEM
Peito	RPT	PT
Tíbias resfriadas	RPTIB	PTIB
Pulmões	RPUL	PUL
Sobre coxas	RSCX	SCX
Sangue e pena	RSP	SP
Característica	DESEMPENHO	
Conversão Alimentar dos 35 aos 41 dias	CA3541	
Consumo de ração dos 35 aos 41 dias	CR3541	
Ganho de peso dos 35 aos 41 dias	GP3541	
Peso aos 21 dias	P21	
Peso aos 35 dias	P35	
Peso aos 41 dias	P41	
Peso aos 42 dias	P42	
Peso ao nascer	PNAS	
Característica	QUALIDADES ÓSSEAS	
Comprimento do fêmur	Com_femur	
Comprimento da tíbia	Com_tibia	
Espessura do fêmur	Esp_femur	
Espessura da tíbia	Esp_Tibia	
Teor de cinzas do fêmur	FEM_CZ	
Força de quebra do fêmur	FEM_forca	
Teor de matéria seca do fêmur	FEM_MS	
Peso do fêmur	Peso_femur	
Peso da tíbia	Peso_tibia	
Teor de cinzas da tíbia	TIB_CZ	
Força de quebra da tíbia	TIB_Forca	
Teor de matéria seca da tíbia	TIB_MS	

Foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e as forças em quilograma-força (kgf).

A descrição da determinação da resistência à flexão dos ossos dos fêmures e tíbias foi descrita por Fornari (2012).

4.3 Seleção de genes candidatos

Para seleção dos genes candidatos a serem investigados neste projeto foram utilizadas duas estratégias: gene candidato posicional e gene candidato funcional.

Os genes candidatos posicionais foram escolhidos com o auxílio de informações de projetos de mapeamento de QTLs já desenvolvidos pela equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal e Embrapa Suínos e Aves (MOURA et al., 2006; NONES et al., 2006; RUY al., 2007; AMBO al., 2009; CAMPOS et al., 2009; ROSÁRIO et al., 2010; BARON et al., 2011; NONES et al., 2012). Com base nos resultados da literatura foram escolhidos os genes candidatos por função, ou seja, estes genes foram escolhidos com base nas suas evidências funcionais descritas na literatura. Além disso, foram utilizadas informações de sequenciamento do nosso grupo e do genoma da galinha para identificar genes candidatos localizados em regiões de QTLs associados com as características de interesse.

A região alvo para seleção destes genes teve como referência o gene *FGFBP1* localizado GGA4 da galinha, posição g.76161317-76163848 (NC_006091.3), onde foi mapeado um QTL para peso vivo aos 35 e aos 41 dias entre os marcadores microssatélites *MCW0240* e *LEIO063* (AMBO et al., 2009) e posteriormente para rendimentos de coxa e sobrecoxa (BARON et al. 2010). Depois de definida a região-alvo, três genes candidatos foram selecionados por posição e função.

4.4 Amplificação e identificação de polimorfismos nos genes candidatos

Na geração F₁, 11 animais (5 machos e 6 fêmeas) foram selecionados para identificação dos polimorfismos nos genes candidatos selecionados. Foram desenhados três pares de *primers*, um para cada gene de interesse, com o objetivo de amplificar um fragmento de aproximadamente 500 pb (pares de base) englobando regiões de *exon* e *intron*.

Os *primers* foram desenhados através do programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), com base nas sequências encontradas no *GenBank*

(www.ncbi.nlm.nih.gov) e a análise de qualidade dos *primers* foi realizada através do programa *NetPrimer* (www.premierbiosoft.com/netprimer). Os *primers* foram diluídos em uma concentração final de 2 pmol/μL, e as condições ideais de temperatura de anelamento foram estabelecidas para cada um dos pares de *primers* através de gradientes de temperatura.

Após a otimização das condições de PCR (reação da polimerase em cadeia) e amplificação dos fragmentos foram realizadas as purificações dos produtos de PCR pelo Protocolo de Purificação de PCR para Sequenciamento utilizando AGENCOURT®AMPURE®XP através de *Beads* magnéticas. Após a pré-purificação das amostras foram realizadas as reações de sequenciamento, e posteriormente purificadas e aplicadas no sequenciador automático *ABI PRISM 3130 Genetic Analyser*® (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento e posterior purificação foram realizadas de acordo com o protocolo “Sequenciamento de DNA e Purificação - Laboratório Multiusuários” (Anexo A).

Para edição, montagem, análise e alinhamento das sequências de nucleotídeos dos animais da geração F₁ da população experimental da Embrapa, foram utilizados os programas *Phred* (JACOBS, 1985), *Phrap* (GREEN, 1994) e *Consed* (GORDON et al., 1998) com as sequências genômicas disponíveis no *GenBank* (BENSON et al., 1997) e para confirmação das mutações e obtenção das figuras foi utilizado o programa *Geneious 5.6.5*® (DRUMMOND et al., 2011)

O fluxograma desta etapa pode ser exemplificado na Figura 5.

Figura 5 - Fluxograma da etapa de amplificação e identificação de polimorfismos nos genes candidatos

4.5 Genotipagem dos polimorfismos

Uma vez identificadas as mutações nos animais F_1 , as famílias mais informativas foram selecionadas e os polimorfismos dos genes estudados foram escolhidos para a genotipagem das aves F_2 e linhagem pura TT. A genotipagem das aves foi realizada através de PCR em tempo real com sonda *TaqMan*[®] (Applied Biosystems), utilizando o equipamento *LightCycler 480 System II*[®] (Roche) pelo método *Endpoint Genotyping*, com formato de detecção *Dual Color Hydrolysis Probe* com fluorescências *FAM* e *VIC*, conforme descrito por Boschiero (2009). Para o *InDel* foi realizada a genotipagem por tamanho de fragmento no sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyser*[®] (Applied Biosystems).

4.6 Análises dos resultados

As frequências genóticas e alélicas dos resultados obtidos por PCR em tempo real e genotipagem por tamanho de fragmento foram estimadas para cada

loco, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente, conforme descrito por Falconer et al. (1981).

4.6.1 Efeito dos marcadores sobre as características estudadas

Para realização dos testes de associação com características avaliadas na população F₂ e posterior validação na população Referência Pura TT foram feitas análises individuais com cada característica sendo considerada uma variável dependente. As análises de associação dos genes candidatos com as características de interesse foram realizadas pelo método de máxima verossimilhança utilizando do programa computacional QxPak v. 4.1 (PÉREZ-ENCISO e MISZTAL, 2004). Foram incluídos os efeitos fixos de incubação (I), sexo (S) e do SNP, assim como os efeitos aleatórios do animal (a), que equivale ao efeito dos poligenes, e do erro associado ao modelo (e) que segue abaixo:

$$Y_{ijkl} = \mu + a_{ijk} + I_i + S_K + SNP_l + e_{ijkl} \text{ em que:}$$

Y_{ijkl} = é o valor fenotípico observado para uma dada característica em aves;

μ = é uma constante inerente a todas as observações;

I_i = é o efeito fixo da $i^{\text{ésima}}$ incubação ($i=1,2,3,\dots$);

a_{ijk} = efeito aleatório do $j^{\text{ésimo}}$ animal do sexo k da incubação i;

S_K = efeito fixo do $k^{\text{ésimo}}$ sexo ($k= 1, 2$);

SNP_l = efeito fixo do $l^{\text{ésimo}}$ genótipo do SNP ($l = 11, 12, 22$);

e_{ijkl} = efeito aleatório residual

O peso vivo aos 35 dias foi utilizado como covariável para as características ganho de peso, consumo e conversão alimentar dos 35 aos 41 dias de idade e peso vivo aos 42 dias foi utilizado como covariável para as características de carcaça, população F₂ e Pura TT. Os efeitos aditivo (a), aditivo + dominante (a+d) e dominante (d) dos SNPs foram estimados como coeficientes de covariável, assumindo-se os valores genéticos (G) de -1, 0 e 1 para o efeito aditivo e de 0, 0 e 1 ou 1, 1, 0 para o efeito dos desvios de dominância (d), respectivamente para os genótipos 11, 12 e 22. Também foram ajustados modelos considerando o efeito de SNP dentro de sexo visando verificar se determinado SNP apresenta diferenças de

efeito em machos e fêmeas. Após avaliação dos modelos, os valores de probabilidade estimados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

O teste alélico para calcular a média estimada para cada genótipo foi calculada no programa QxPak pela média dos mínimos quadrados e foram plotados gráficos para análise do comportamento aditivo ou de dominância observado para as características no programa R. Foi também verificada a frequência do menor alelo de cada um dos três genes avaliados com o uso do programa estatístico R.

4.7 Desequilíbrio de Ligação (LD)

A frequência do menor alelo de cada um dos três genes avaliados foi obtida com o uso do programa estatístico R. Os níveis de LD entre os marcadores e as frequências haplotípicas entre outros parâmetros (heterozigotidade esperada e observada, Equilíbrio de Hardy Weinberg e frequência dos menores alelos) foram obtidas no programa *Haploview* 2.05 (BARRETT et al., 2005).

Para calcular o LD foram utilizadas as medidas de correlação r^2 e distância D' (valor pairwise) sendo que o critério de inclusão para considerar os marcadores em LD utilizado foi de $r^2 > 0,3$ (WRAGG et al., 2012).

4.8 Haplótipos

Para os alelos formados pelos três polimorfismos identificados nos genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2*, foram construídos blocos de haplótipos e foram analisadas as associações de haplótipos com os fenótipos avaliados nas populações F_2 ($n=36$) e Pura TT ($n=85$) pelo programa PLINK (PURCELL et al., 2007), no qual é avaliada a frequência dos haplótipos em comparação com o fenótipo observado.

4.8.1 Efeito dos genes para diferentes combinações de alelos

O efeito dos genes foi avaliado para a combinação de alelos possíveis entre os três marcadores somente para as características fenotípicas que apresentaram efeito dos três marcadores simultaneamente. Esse efeito foi calculado e as médias estimadas para cada genótipo foram classificadas em: alelo favorável (maior média fenotípica) e alelo não favorável (menor média fenotípica). O haplótipo favorável e

não favorável, para cada característica, foi comparado com os resultados de haplótipo obtidos a partir dos programas Haploview e Plink.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração, quantificação e diluição de DNA

Algumas amostras de DNA tiveram que ser reextraídas de volume de sangue congelado -20°C (22 amostras). Estas amostras tiveram uma relação entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} , usada para avaliar o grau de pureza de uma amostra, no intervalo confiável (1,7-1,9) e as concentrações de DNA extraído foram suficientemente altas para as atividades a serem desenvolvidas (500-600ng/ μL).

5.2 Seleção das regiões a serem amplificadas e identificação dos polimorfismos

Trabalhos anteriores estudaram a arquitetura genética de características quantitativas associadas ao desempenho e ao rendimento de carcaça de uma população experimental genotipadas para marcadores microssatélites que foram associados ao peso vivo aos 35 e 42 dias de idade na população TCTC no GGA4 (MCW0240-LEIO063) (AMBO et al., 2009)

Neste trabalho, foram selecionados por posição e função, no GGA4 nesta região de QTL mapeado para peso vivo aos 35 e 41 dias de idade, os genes *KLF3*, *PPPARGC1A* e *SLIT2*. Esse intervalo de QTL possui aproximadamente 15 Mb (mega pares de base) englobando 22 microssatélites (mapa WUR do NCBI) e 142 genes.

Foram amplificadas regiões englobando um *exon* entre dois *introns*, ou seja, amplificando sempre um *exon* inteiro e parte dos dois *introns*. O fragmento amplificado foi de aproximadamente 500pb para cada gene. A sequência dos *primers* utilizados e as regiões amplificadas são observadas na Tabela 5.

A vantagem em sequenciar uma região de *exon* é que por fazer parte da sequência que é traduzida, tem maior probabilidade de estar envolvida com alterações fenotípicas no animal, sendo que a desvantagem é que estas regiões são muito conservadas, o que dificulta a identificação de mutações. Por outro lado, a vantagem de sequenciar regiões de *intron* é a grande frequência de mutações ao longo do genoma e a desvantagem é que essas mutações não são tão informativas quanto as que ocorrem em regiões de *exon*. Porém, ocorrem muitas interações entre

os dois tipos de regiões que ainda não são bem elucidadas, o que é visto no trabalho de Patthy (1987) em que a montagem de genes reflete-se na fase de utilização não aleatória de regiões de *introns* e pela correlação entre a organização dos seus genes.

Tabela 5 - *Primers* utilizados para amplificação do fragmento dos 3 genes para sequenciamento e região do cromossomo 4 que foi amplificada

GENE	PRIMERS	REGIÃO AMPLIFICADA
<i>PPARGC1A</i>	F 5' TGTTTCTACATTGCTGTTTCCTG 3' R 3' GCAACTCCTCCTTGTTACGC 5'	entre o 1º e 2º intron
<i>KLF3</i>	F 5' TTGGGAAAGAAAAAGCCTAACA 3' R 3' CAGAGGTCATTTAGGGGCAA 5'	entre o 1º e 2º intron
<i>SLIT2</i>	F 5' TGCCACTCATTTGGAATATC 3' 3' TCTACATCTTTCAGCATTGATTGA 5'	entre o 10º e 11º intron

5.3 Amplificação e purificação dos fragmentos para reação de sequenciamento

A temperatura de anelamento é um fator importante na otimização de uma PCR. Temperaturas inadequadas tornam o pareamento *primer*-DNA menos seletivo e específico, aumentando o aparecimento de produtos indesejáveis.

A otimização da amplificação dos fragmentos de aproximadamente 500pb utilizada para o sequenciamento foi através da PCR e a visualização do gradiente utilizado na reação foi realizada pela observação das bandas formadas pelo GelRed® intercalado ao DNA que fluoresce quando submetido à luz ultravioleta, depois da eletroforese em gel de agarose 1% . A melhor temperatura de anelamento foi 58,5° C para os 3 fragmentos(Figura 6).

Figura 6 - Gradiente de temperatura (1:50,0 °C, 2:51,7 °C, 3:54,3 °C, 4:56,0 °C, 5:58,5 °C, 6:60,0 °C) e controles negativos(CN) para amplificação dos 3 fragmentos dos genes *PPARGC1A*, *KLF3* E *SLIT2*

Tamanho em pb: Marcador de peso molecular pGEN (plasmídio pGen – 25ng/uL é o marcador de tamanho molecular)

As condições programadas no termociclador são descritas a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 29 ciclos de 2 minutos, sendo 30 segundos para cada sub etapa de desnaturação e anelamento e 1 minuto para extensão a 94°C, 58,5°C e 72°C respectivamente, e extensão final foi a 72°C por 10 minutos. A reação de amplificação (Tabela 6) dos três fragmentos, para cada um dos genes estudados teve volume final de 20µL por amostra.

Tabela 6 - Volumes e concentrações dos componentes utilizados na PCR para o fragmento de 500pb dos genes *PPARGC1A*, *KLF3* e *SLIT2*, a ser utilizado no sequenciamento

Reagente	Volume (µL)	Concentração	Concentração final
Tampão	2,5	10x	1x
DNTPs	1,0	10,0Mm	0,4mM
MgCL₂	1,5	50,0mM	3,0mM
Primer R	2,0	2,0 pmol/ µL	0,16 pmol/µL
Primer F	2,0	2,0 pmol/ µL	0,16 pmol/µL
TaqDNA polimerase	0,2	5,0U/µL	0,04 U/µL
DNA	1,0	25,0ng/µL	1,0ng/µL
H₂O Ultra Pura	9,8		
Total	20,0		

Depois da amplificação do DNA, são gerados fragmentos de vários tamanhos diferentes e também há sobra de *primers*, *DNTPs*, alguns sais entre outros resíduos. A purificação do DNA amplificado visa eliminar esses resíduos aumentando a qualidade das sequências produzidas, além de ser indispensável para a preservação dos capilares do Sequenciador Automático de DNA (FIGUEIREDO et al., 2003). Apesar de não ter apresentado bandas inespecíficas visíveis, esse procedimento de purificação foi realizado utilizando *Beads* magnéticas, sendo que a visualização das amostras amplificadas para cada gene foi realizada em gel de agarose (Figuras 7).

Figura 7 - Purificação pelo kit AGENCOURT® AMPURE® (PCR purification) a partir da amplificação de 11 amostras para o gene *PPARGC1A*
pb – pares de base *ng – nanogramas por microlitro aplicado

5.4 Sequenciamento e seleção das famílias mais informativas genotipicamente

Onze animais da geração F_1 foram sequenciados para identificação de polimorfismos sendo seis fêmeas da linhagem de postura (CC) e cinco machos da linhagem de corte (TT). Foram efetuadas duas reações de sequenciamento para cada indivíduo, uma utilizando o *primer* direto e outra o reverso para confirmação dos polimorfismos encontrados.

Foram identificados, um *InDel* no gene *PPARGC1A* (Figura 8), 2 SNPs no gene *KLF3* (Figura 8 - somente o SNP utilizado no estudo) e um SNP no gene *SLIT2* (Figura 10).

Figura 8 - Imagem do *InDel* *PPARGC1A* g.73632140 -/TTTCT, obtida do software *Geneious*®

Figura 9 - Imagem do SNP *KLF3* g.69144312 C>T, obtidas do software *Geneious*®

Figura 10 - Imagem do SNP *SLIT2* g.74737073 C>A, obtidas do software *Geneious*®

Foram selecionadas para genotipagem as famílias F_2 mais informativas genotipicamente (7771, 7812 e 7816), sendo o critério de seleção, o maior número de genótipos possíveis para os três marcadores simultaneamente (Tabela 7).

Tabela 7 - Genótipos dos 11 animais (F1) sequenciados para as 3 mutações utilizadas neste estudo

Geração F1		<i>KLF3</i>		<i>SLIT2</i>		<i>PPARGC1A</i>	
♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂
7755	7975	TT	CT	AA	CC	<i>InDel</i>	<i>Del/Del</i>
7771	7977	CT	CT	CC	CA	<i>InDel</i>	<i>In/In</i>
7810	7716	CT	CC	CA	CC	<i>InDel</i>	<i>InDel</i>
7812	7797	CT	CT	CC	CA	<i>InDel</i>	<i>InDel</i>
7816	7769	CT	CT	CC	CA	<i>InDel</i>	<i>In/In</i>
7978	7716	CT	CC	CA	CC	<i>InDel</i>	<i>InDel</i>

Famílias mais informativas genotipicamente para as 3 mutações; *InDel* (*Del*:deleção, *In*: inserção)

5.5 Genotipagem dos polimorfismos

Foram genotipados para cada um dos três polimorfismos encontrados 276 animais das famílias F_2 e 455 aves da População Referência Pura TT. Após a genotipagem da População Referência Pura TT, os parentais utilizados para formação desta população também foram genotipados e utilizados para confirmação

e suposição dos genótipos dos filhos. Sendo assim, o número amostral foi aumentado de aproximadamente 500 para 840 animais genotipados (979, 736, 811 para os polimorfismos nos genes *KLF3*, *SLIT2* e *PPARGC1A* respectivamente).

Para a genotipagem do *InDel* no gene *PPARGC1A* (Tabela 8) foram otimizados os volumes e as concentrações dos reagentes utilizados na PCR (Tabela 9).

Tabela 8 - Dados do fragmento do gene *PPARGC1A* a ser amplificado para genotipagem

<i>PPARGC1A</i>	
Primers	F 5'CATCTCCAGCCAGTACAGCA 3' R 5'CCTGTAACGCACATCACCAC 3'
Fluorescência	<i>Fan</i> no reverso
Fragmento	CCAGTGAATCCATGCTTTTTCTTTTT[-/CTTTTT]TTTTCTTCAGCCTGGTGGGCAGTG
Amplicon	165 ou 171pb (<i>InDel</i> de 6pb)

Tabela 9 - Volumes e concentrações dos componentes utilizados na PCR para o fragmento de 166pb a ser utilizado na genotipagem (*PPARGC1A*)

Reagente	Volume (µL)	Concentração	Concentração final
Tampão	1,0	10x	1x
dNTPs	0,4	10,0mM	0,4mM
MgCL₂	0,6	50,0mM	3,0mM
Primer R	0,8	5,5 pmol/ µL	0,44 pmol/µL
Primer F	0,8	5,5 pmol/ µL	0,44 pmol/µL
TaqDNA polimerase	0,1	5,0U/µL	0,05 U/µL
DNA	1,0	25,0ng/µL	2,5ng/µL
H₂O Ultra Pura	5,3		
Total	10,0		

Foram estabelecidas as ideais condições de temperatura de anelamento do par de primer *PPARGC1A*, o qual amplificou em todas as temperaturas, porém foi utilizado a maior temperatura para tornar a amplificação mais específica, e desse modo, foi utilizada a temperatura de 62⁰C (Figura 11). Também foi realizada a otimização das condições de ciclagem para a genotipagem do *InDel* no gene *PPARGC1A* (Tabela 10).

Figura 11 - Gradiente para PCR do *InDel* no gene *PPARGC1A*

Tabela 10 - Programa utilizado para amplificar o fragmento para genotipagem do *InDel* no gene *PARGC1A*

Programa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	2 min	1x
Desnaturação	94°C	30 seg	29 x
Anelamento	62°C	30 seg	
Extensão	72°C	30 seg	
Extensão	72°C	10 min	1x

Depois da PCR, foram feitas as corridas em gel de agarose e padrões semelhantes de gel foram obtidos para cada placa (Figura 12).

Figura 12 - Gel de agarose resultante da amplificação de um fragmento para genotipagem do *InDel* no gene *PPARGC1A* das amostras da família F2 7812
O primeiro poço de cada fileira representa o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder®* Invitrogen e os outros poços representam as amostras amplificadas

Para a genotipagem do gene *PPARGC1A*, a discriminação dos genótipos foi realizada por diferença de tamanho de fragmento obtido. Foram aplicadas as amostras no sequenciador automático segundo protocolo de genotipagem (Anexo B). Os animais foram genotipados com *primers* fluorescentes, sendo que os tamanhos de fragmentos diferiram em 6pb. Três genótipos foram obtidos: *Del/Del* – dois fragmentos de 165pb, *Del/In* – fragmentos de 165pb e 171pb e *In/In* - dois fragmentos de 171pb (Figura 13).

Figura 13 - Genotipagem por tamanho de fragmento obtidas pelo programa *GeneMapper*®
Exemplo de genotipagem de três amostras da população F2 para as três variantes genotípicas (*In/Del*, *In/In*, *Del/Del* respectivamente)

Na identificação dos SNPs nos genes *KLF3* e *SLIT2* que foram utilizadas sondas *TaqMan* para genotipagem, os reagentes utilizados na reação são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Volumes dos componentes utilizados na PCR para genotipagem dos SNPs identificados nos genes *KLF3* e *SLIT2*

	Volume (μL)
DNA	1,00
Mix[®]	5,00
Sonda +Primer[®]	0,25
Água	3,75
Total	10,00

Para o *score* que representa a qualidade de leitura de fluorescência das sondas *TaqMan* consideramos bons valores próximos a 1,0. Os resultados foram satisfatórios para todas as amostras com *score* variando entre 0,98 e 1,0. Na Figura 14 está representado o *Scatter Plot* de fluorescência do tipo *Endpoint* (fluorescências *FAN* e *VIC*), de uma placa de 96 amostras para o SNP no gene *KLF3*. Padrões de fluorescência semelhantes foram observados para as outras amostras deste gene e do gene *SLIT2*.

Figura 14 - Padrões de fluorescência para os três genótipos (CC/TC/TT) obtidos da família 7771 (F2) para o SNP do gene *KLF3*

5.6 Descrição dos polimorfismos detectados

No banco de SNPs do NCBI (dbSNP) para o gene *KLF3*, estão descritas 34 mutações sendo que, neste estudo foram identificados dois SNPs que não constam no banco de dados de SNPs do NCBI. O SNP utilizado nas genotipagens corresponde a uma troca C/T (citosina por timina) no exon 2 do gene (g.69144312 C>T), porém ele se localiza uma base antes do início do primeiro aminoácido codificado pelo gene não fazendo parte da sequência codificante, mas podendo fazer parte de uma região de controle ou promotora da transcrição do mesmo. O segundo SNP detectado corresponde a uma troca de base C/T no início do intron 2 do gene e não foi utilizado neste estudo para avaliação de associações com fenótipos.

Para o gene *PPARGC1A*, estão descritas 106 mutações na dbSNP, dentre elas, um *InDel* na posição 73632140 do GGA4, correspondente às bases -/CTTTTT. O *InDel* identificado neste estudo é correspondente às bases TTTTCT, no início do intron 2, na posição 73632140 do GGA4 (g.73632140 -/TTTCT), o qual está a uma distância de 4 bases em relação ao descrito no NCBI, ou seja, existe a possibilidade de ser o mesmo polimorfismo.

Estão descritas no dbSNP do NCBI 259 mutações no gene *SLIT2*, sendo que a mutação encontrada não consta no banco de dados do NCBI e é uma troca de C/A (citosina/adenina) localizada no intron 10 na posição g.74737073 C>A.

5.7 Análise dos Resultados

Nas famílias avaliadas da população F₂, para o gene *KLF3* (g.69144312 C>T) e *PPARGC1A* (g.73632140 -/TTTCT), foram verificadas três variantes genotípicas e para o gene *SLIT2* (g.74737073 C>A) duas variantes genotípicas foram observadas. As frequências alélicas e genotípicas são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 - Frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos detectados nos genes *KLF3*, *SLIT2* e *PPARGC1A* na população TCTC da Embrapa Suínos e Aves (F₂)

Gene	Genot.	Nº de animais	Freq. Genotípica	Alelo	Freq. Alélica
<i>KLF3</i>	CC	68	0,25	C	0,50
	TC	140	0,50		
	TT	68	0,25		
	Total	276		T	0,50
<i>SLIT2</i>	AC	140	0,51	A	0,25
	CC	136	0,49	C	0,75
	Total	276			
<i>PPARGC1A</i>	Del/ Del	47	0,17	Del	0,43
	In/Del	140	0,51		
	In/ In	88	0,32		
	Total	275		In	0,57

Na população referência pura TT, três variantes genotípicas foram verificadas para o gene *SLIT2* (g.74737073 C>A) e *PPARGC1A* (g.73632140 -/TTTCT) e duas variantes genotípicas para o gene *KLF3* (g.69144312 C>T). As frequências alélicas e genotípicas podem ser observadas na Tabela 13.

Tabela 13 - Frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos detectados nos genes *KLF3*, *SLIT2* e *PPARGC1A* na população referência pura TT da Embrapa Suínos e Aves

	Genot.	Nº de animais	Freq Genotípica	Alelo	Freq. Alélica
<i>KLF3</i>	CC	942	0,96	C	0,98
	TC	37	0,04		
	Total	979		T	0,02
<i>SLIT2</i>	AA	62	0,08	A	0,30
	AC	322	0,44		
	CC	352	0,48	C	0,70
	Total	736			
<i>PPARGC1A</i>	Del/ Del	89	0,11	Del	0,33
	In/Del	356	0,44		
	In/ In	366	0,45		
	Total	811		In	0,67

Os marcadores estão segregando na População Referência Pura TT, porém para o gene *KLF3*, observa-se uma baixa frequência do alelo “T” nesta população.

A população F₂ foi formada a partir de cinco machos de famílias distintas da linhagem TT em 1999, que é uma amostragem da população TT da Embrapa e a população Referência Pura TT é representativa da população TT, pois foi originada a partir de 20 famílias de macho desta linhagem. Portanto, as diferenças nas frequências entre as duas populações ocorrem devido à geração de seleção na

Referência Pura TT e amostragem utilizada neste estudo, na população F₂ (três famílias da geração F₂).

5.7.1 Estudo de associação dos marcadores com as características fenotípicas

O modelo que melhor se ajustou aos dados para os polimorfismos encontrados foi o aditivo para os SNPs C>T (*KLF3*) e C>A (*SLIT2*) e aditivo mais dominante para o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) nas populações F₂ e pura TT.

Na População F₂ as análises partiram de um grupo de 35 características de desempenho e carcaça (incluindo órgãos e rendimentos) sendo que o SNP C>T (*KLF3*) teve associação significativa ($P < 0,05$) com as características fenotípicas listadas na Tabela 14.

Tabela 14 - Médias fenotípicas dos genótipos, erro padrão (EP), efeito aditivo e erro padrão (EP) das características associadas com o SNP C>T(*KLF3*) ($P < 0,05$) na População F₂

Característica	Genótipo do SNP (Frequência Genotípica)			Valor <i>P</i>	Efeito Aditivo	
	Média ± EP				Valor ± EP	
	CC (0,25)	TC (0,51)	TT (0,25)			
Asa	87,7 ±0,86	83,9 ±0,64	82,2 ±1,28	5,86E-04	2,78 ± 0,8	
Cabeça	35,6 ±0,35	34,5 ±0,28	3,2 ±0,49	1,18E-02	0,78 ± 0,31	
Carcaça	678,3 ±8,34	654,4 ±6,01	644,6 ±12,61	2,70E-02	16,93 ± 7,62	
Carcaça adj.42	650,5 ±0,36	657,0 ±0,71	665,9 ±0,34	2,00E-07	-7,70 ± 1,45	
Dorso adj.42	185,6 ±0,13	190,1 ±0,29	195,7 ±0,14	2,00E-12	-5,05 ± 0,69	
Coxas e sobrecoxas	226,3 ±2,71	219,4 ±2,07	214,5 ±4,17	2,58E-02	5,91 ± 2,64	
Peito adj.42	159,6 ±0,21	162,3 ±0,35	165,7 ±0,15	2,00E-04	-3,08 ± 0,82	
Pés	43,2 ±0,45	40,8 ±0,39	39,2 ±0,72	2,97E-07	1,97 ± 0,42	
Pés adj.42	41,8 ±0,06	41,1 ±0,11	40,2 ±0,05	7,80E-04	0,79 ± 0,23	
Rend. Pes	4,2 ±0,03	4,1 ±0,02	4,0 ±0,04	4,98E-04	0,09 ± 0,03	
Comp.intestino	157,4 ±1,28	155,0 ±0,93	153,2 ±1,45	2,81E-03	2,07 ± 1,00	
Cr_35-41d	633,7 ±11,26	584,2 ±6,77	588,2 ±11,07	6,08E-03	22,83 ± 8,30	
Cr35-41d adj 35	620,4 ±4,09	594,1 ±6,04	580,8 ±3,85	4,60E-02	19,82 ± 8,08	
Ef35_41d adj 35	0,39 ±0,003	0,37 ±0,00	0,36 ±0,003	1,50E-02	0,02 ± 0,01	
Gp35_41d	240,6 ±4,74	221,3 ±3,85	217,8 ±5,69	8,04E-03	11,48 ± 4,32	
Gp35_41d adj 35	243,4 ±2,32	224,4 ±3,33	209,0 ±1,82	5,00E-04	17,16 ± 4,63	
Pv41d	1067,7 ±11,30	1035,2 ±8,81	1016,2 ±18,15	1,83E-02	25,83 ± 10,89	
Pv42d	1035,8 ±11,13	999,5 ±8,57	982,3 ±17,76	1,21E-02	26,80 ± 10,64	
Fígado	27,4 ±0,36	25,9 ±0,26	25,3 ±0,47	5,54E-04	1,04 ± 0,30	
Fígado adj.42	27,2 ±0,03	26,1 ±0,08	25,0 ±0,04	4,90E-09	1,10 ± 0,18	
Moela	25,9 ±0,39	25,5 ±0,28	24,0 ±0,40	3,42E-04	0,96 ± 0,29	
Moela adj.42	26,2 ±0,08	25,2 ±0,11	24,3 ±0,07	3,00E-04	0,97 ± 0,26	
T. de Colest. Trig adj.42	123,2 ±0,37	131,2 ±0,97	139,4 ±0,42	9,70E-06	-8,09 ± 1,79	

Para as características foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e teores (T.) em mg/dL; sendo que: Rend (rendimento), d (dias), CA (conversão alimentar), Cr (consumo de ração), Ef (eficiência), GP(ganho de peso), Nas (peso ao nascimento), Pv (peso vivo), Colest (colesterol) e Trig.(triglicerídeos)

Na População Referência pura TT, as análises partiram de um grupo de 85 características. Apesar de terem sido selecionadas características de desempenho e

carcaça (incluindo órgãos e rendimentos), também vale ressaltar outras associações importantes que apareceram nas constituições ósseas.

Na População Referência Pura TT, para a mutação do gene *KLF3*, o modelo utilizado foi o aditivo, pois a população apresentava somente duas variantes genóticas e o marcador teve associação significativa ($P < 0,05$) com as características fenotípicas que estão listadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Médias fenotípicas dos genótipos, erro padrão (EP), efeito aditivo e erro padrão (EP) das características associadas com o SNP C>T(*KLF3*) ($P < 0,05$), na População Referência pura TT

Característica	Genótipo do SNP (Frequência Genotípica)		Valor P	Efeito Aditivo Valor ± EP
	Média ± EP			
	CC (0,96)	TC (0,04)		
CARCX adj.42	137,6 ± 0,01	133,0 ± 0,09	2,81E-02	4,59 ± 2,09
CARCXSC adj.42	381,3 ± 0,61	370,9 ± 2,43	2,40E-02	9,85 ± 4,17
CX adj.42	215,1 ± 0,02	206,6 ± 0,12	2,29E-03	8,56 ± 2,79
CXSCX adj.42	529,4 ± 0,40	518,4 ± 3,32	2,15E-02	11,01 ± 4,59
PELCX adj.42	19,1 ± 0,04	17,4 ± 0,36	4,88E-02	1,73 ± 0,87
PELSCX adj.42	42,4 ± 0,01	46,7 ± 0,08	1,70E-02	-4,34 ± 1,81
COR adj.42	11,6 ± 0,01	12,5 ± 0,12	4,73E-03	-0,88 ± 0,31
FIG adj.42	56,6 ± 0,03	52,4 ± 0,13	1,16E-02	4,13 ± 1,55
GP3541 adj.35	529,4 ± 1,94	494,1 ± 10,85	2,01E-02	35,33 ± 15,16
Esp_tib (mm)	8,1 ± 0,003	8,8 ± 0,03	1,28E-03	-0,73 ± 0,23
Fem(forca) adj.42	40,0 ± 0,03	29,1 ± 0,31	8,93E-07	10,82 ± 2,19
Tib_forca adj.42	38,0 ± 0,05	31,9 ± 1,00	1,47E-02	6,06 ± 2,51
Fem_C_Z adj.42	25,1 ± 0,002	21,3 ± 0,01	8,05E-11	3,74 ± 0,56
Tib_C_Z adj.42	23,6 ± 0,004	22,1 ± 0,03	1,36E-02	1,54 ± 0,62
Peso_fem	8,0 ± 0,01	8,6 ± 0,05	4,22E-02	-0,60 ± 0,30
Peso_fem adj.42	10,9 ± 0,002	11,8 ± 0,01	6,94E-07	-1,24 ± 0,24
Peso_tib	7,3 ± 0,02	8,6 ± 0,11	4,51E-02	-0,88 ± 0,43
PTIB_adj.42	58,3 ± 0,05	56,0 ± 0,42	2,61E-02	2,32 ± 1,03

Pesos da carne da coxa (CARCX), carne das coxas e sobrecoxas (CARCXSC), coxas (CX), coxas e sobrecoxas (CXSCX), pele da coxa (PELCX) e sobre coxa (PELSCX), coração (COR), fígado (FIG) e ganho de peso dos 35 aos 41 dias (GP3541), espessura da tíbia (Esp_tib), força de quebra do fêmur (fem_forca) e da tíbia, teor de cinzas do fêmur (fem_CZ), tíbia (tib_CZ), peso do fêmur (Peso_fem), da tíbia (Peso_tib) e peso das tíbias resfriadas (PTIB) *foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e as de força em quilograma-força (kgf)

Com exceção aos animais obesos, o músculo esquelético constitui a maior parte (35 a 65%) do peso da carcaça (BRISKEY et al., 1966). O SNP do gene *KLF3* foi associado com peso de várias partes da carcaça o qual está relacionado com este gene que desempenha função na modulação das atividades de muitos promotores musculares como o Creatina Musculo Quinase, Miosina de Cadeia Pesada IIa (MyHCIIa), Six4, Receptor de Canal de Cálcio 1-alfa (CaChR) e Alfa-actina esquelético (*Skact*) (HIMEDA et al., 2010).

Comparando os resultados de associação entre o SNP e as características das duas populações estudadas, foram encontradas associações do SNP C>T

(*KLF3*) com pesos do fígado e peso das coxas, sendo que para a população pura TT, além desta, outras características de coxa foram avaliadas e também sofreram efeito do SNP como: peso das coxas e sobrecoxas, carne das coxas e carne das coxas e sobrecoxas. O peso das asas e de carcaça na F_2 , e o rendimento da asa na população referência pura TT, foram associados com o SNP. Para o grupo de características de desempenho, o ganho de peso dos 35 aos 41 dias sofreram efeito do SNP nas duas populações.

O efeito aditivo que predomina no modelo foi favorável para o alelo “C” do SNP g.69144312 C>T (*KLF3*) nas duas populações. Porém, na população F_2 , o alelo T foi favorável para pesos de carcaça (Gráfico 3a), dorso, peito (Gráfico 3b) e teores de colesterol e triglicerídeos (Gráfico 3c). O marcador no gene *KLF3* não foi associado com teor de colesterol indicando que provavelmente ele esteja envolvido somente com os teores de triglicerídeos.

Na população TT o alelo “T” em heterozigose foi favorável para pesos do coração e da pele da sobrecoxa. O alelo T, também foi favorável para algumas características de composição óssea como: espessura da tíbia (Esp_tib), pesos da tíbia (Peso_tib) e do fêmur (Peso_fem).

O alelo “C” na população F_2 tem a mesma frequência que o alelo “T”, porém foi observado que o alelo “C” na população pura TT, a qual passou por um processo de seleção, está em maior frequência (92%), o que demonstra a seleção a favor deste alelo nessa população.

O alelo “C” foi favorável para peso da coxa, sendo que para a troca de um alelo T por C, em média, o peso da coxa aumenta 5,912g (Tabela 14). Para características de desempenho como ganho de peso e consumo alimentar dos 35 aos 41 dias com ajuste para peso aos 35 dias, a troca de um alelo C para T, em média, diminui 17,6 e 19,8g respectivamente (Gráfico 4a e b).

Gráfico 3 - Médias estimadas para características avaliadas na população F_2 , em relação aos genótipos CC, TC e TT; a - Peso da Carcaç; b - Peso do peito; c - Teores de colesterol e triglicerídeos

Gráfico 4 - Médias estimadas para características avaliadas na população F_2 , em relação aos genótipos CC, TC e TT; a - Ganho de peso dos 35 aos 41 dias; b - Consumo de ração dos 35 aos 41 dias

Foram encontradas associações importantes do SNP C>T (KLF3) com características de interesse zootécnico em cada uma das duas populações estudadas sendo que na população F₂ a característica peso vivo aos 42 dias, característica pela qual o QTL em estudo foi mapeado (AMBO et. al., 2009), também teve efeito do SNP nesta população. Alguns fenótipos foram confirmados na população Pura TT como: pesos de fígado, coxas e ganho de peso dos 35 aos 41 dias.

Na população F₂, o SNP C>A (*SLIT2*) teve associação significativa ($P<0,05$) com as características fenotípicas listadas na Tabela 16. O modelo utilizado foi o aditivo devido à presença de apenas duas variantes genótípicas nas populações avaliadas.

Tabela 16 - Médias fenotípicas dos genótipos, erro padrão (EP), efeito aditivo e erro padrão (EP) das características associadas com o SNP C>A (*SLIT2*) ($P<0,05$) na População F₂

Característica	Genótipo do SNP (Frequência Genotípica)		Valor P	Efeito Aditivo Valor ± EP
	Média ± EP			
	AC (0,51)	CC (0,49)		
Cabeça	34,7 ± 0,28	33,8 ± 0,30	4,48E-02	0,88 ± 0,44
Pés	41,0 ± 0,40	38,7 ± 0,44	2,20E-05	2,35 ± 0,61
Pés adj.42	41,0 ± 0,11	38,5 ± 0,04	6,10E-14	2,48 ± 0,31
Moela	25,2 ± 0,28	24,3 ± 0,29	5,80E-03	0,93 ± 0,41
Rend. Dorso	18,9 ± 0,06	19,2 ± 0,06	3,18E-02	-0,25 ± 0,12
Rend. Coxa e sobrecoxa	21,8 ± 0,09	21,5 ± 0,06	2,78E-02	0,30 ± 0,13
Rend. Pes	4,1 ± 0,02	3,9 ± 0,02	3,26E-08	0,18 ± 0,03
Colest adj.42	102,5 ± 1,06	110,3 ± 0,37	1,03E-03	-7,79 ± 1,98
Colest trig adj.42	131,3 ± 1,07	140,6 ± 0,28	8,40E-05	-9,34 ± 2,81

Para as características foram avaliados os pesos em gramas e teores em mg/dL; sendo que: Rend (rendimento), Colest (colesterol) e Trig (triglicerídeos)

Na população Pura TT, o SNP C>A (*SLIT2*) apresentou associação significativa ($P<0,05$) com as características fenotípicas listadas na Tabela 17.

O gene *SLIT2* apresenta interação com proteínas que afetam o movimento e adesão de células, atividade de fatores de crescimento e ainda modulação de suas próprias atividades (HOLMES e NISWANDER, 2001). Portanto, as associações do SNP C>A (*SLIT2*) presentes nestas populações podem apresentar relação com estas funções desempenhadas pelo gene por ele estar envolvido com o desenvolvimento do animal.

Enquanto rendimento de coxas e sobrecoxas sofreram efeito do SNP C>A (*SLIT2*) na população F₂, na população pura TT, este foi associado com pesos das coxas, coxas e sobrecoxas, carnes das coxas e carne de coxas e carne de coxas com sobrecoxas. Outras características semelhantes entre as duas populações

foram associadas com esse polimorfismo como: rendimento de dorso com peso de dorso; peso de moela com rendimento de moela, teores de colesterol e triglicerídeos com porcentagem de gordura abdominal, nas populações F₂ e pura TT respectivamente.

Tabela 17 - Médias fenotípicas dos genótipos, erro padrão (EP), efeito aditivo e erro padrão (EP) das características associadas com o SNP C>A (*SLIT2*) ($P<0,05$) na População Referência Pura TT

Característica	Genótipo do SNP (Frequência Genotípica)			Valor <i>P</i>	Efeito Aditivo Valor ± EP
	Média ± EP				
	AA (0,08)	AC (0,44)	CC (0,48)		
ASA adj.42	171,5 ± 0,03	169,1 ± 0,02	166,7 ± 0,01	3,46E-05	2,38 ± 0,57
CARSCX adj.42	238,5 ± 1,19	233,0 ± 0,91	230,5 ± 0,44	1,69E-03	3,53 ± 1,08
CARCXSCX adj.42	374,3 ± 1,30	366,7 ± 1,07	364,6 ± 0,51	2,25E-03	3,99 ± 1,25
CASA adj.42	87,7 ± 0,18	86,7 ± 0,21	85,9 ± 0,10	2,39E-02	0,87 ± 0,39
CXSCX adj.42	527,9 ± 1,58	519,3 ± 1,24	516,1 ± 0,58	4,94E-04	5,04 ± 1,41
DORS adj.42	265,2 ± 1,13	263,9 ± 0,82	260,7 ± 0,37	1,15E-02	2,54 ± 0,99
MASA adj.42	63,5 ± 0,10	62,4 ± 0,08	61,3 ± 0,04	7,72E-06	1,11 ± 0,24
OSPT adj.42	95,9 ± 0,03	97,4 ± 0,03	98,9 ± 0,01	2,73E-02	-1,52 ± 0,69
PCR adj.42	1658,9 ± 2,34	1649,1 ± 1,71	1642,4 ± 0,79	7,01E-05	7,79 ± 1,93
SCX adj.42	317,8 ± 1,28	312,3 ± 1,05	309,1 ± 0,50	1,23E-03	4,01 ± 1,21
GA	43,9 ± 1,37	45,3 ± 0,61	47,7 ± 0,60	1,56E-02	-2,11 ± 0,85
PT adj.42	502,6 ± 1,54	507,1 ± 1,23	509,8 ± 0,56	1,77E-02	-3,36 ± 1,39
RGA	1,9 ± 0,06	2,0 ± 0,03	2,1 ± 0,03	1,39E-02	-0,09 ± 0,03
RCASA	3,94 ± 0,04	3,89 ± 0,02	3,82 ± 0,01	1,54E-03	0,07 ± 0,02
RMASA	2,78 ± 0,02	2,8 ± 0,01	2,76 ± 0,01	4,53E-02	0,02 ± 0,01
RASA	7,63 ± 0,02	7,57 ± 0,01	7,49 ± 0,01	7,84E-04	0,08 ± 0,03
RDORS	11,8 ± 0,09	11,8 ± 0,04	11,6 ± 0,04	3,19E-03	0,15 ± 0,05
MO adj.42	32,3 ± 0,01	32,4 ± 0,01	32,5 ± 0,01	1,49E-07	-0,14 ± 0,37
CA adj.35	2,32 ± 0,03	2,25 ± 0,02	2,20 ± 0,01	3,40E-03	0,05 ± 0,02
GP3541	501,9 ± 10,83	519,2 ± 4,64	523,4 ± 4,36	4,24E-02	-11,53 ± 5,68
ESP_FEM adj.42	8,7 ± 0,003	8,9 ± 0,003	9,1 ± 0,001	2,74E-03	-0,16 ± 0,05
ESP_TIBIA adj.42	9,0 ± 0,005	8,9 ± 0,01	8,7 ± 0,001	1,14E-03	0,17 ± 0,05
FEM_MS	51,9 ± 0,30	50,8 ± 0,15	50,2 ± 0,16	2,15E-02	0,77 ± 0,33
FEM_forca adj.42	30,8 ± 0,10	29,7 ± 0,11	28,4 ± 0,05	2,68E-02	1,23 ± 0,55
TIB_MS	51,0 ± 0,39	49,9 ± 0,15	49,1 ± 0,15	4,73E-03	0,88 ± 0,32
TIB_MS adj.42	51,0 ± 0,01	49,9 ± 0,01	48,9 ± 0,003	9,36E-05	1,06 ± 0,27
PESO_FEM adj.42	8,8 ± 0,003	8,6 ± 0,004	8,4 ± 0,001	1,79E-04	0,20 ± 0,05
TIB_CZ adj.42	22,7 ± 0,01	22,1 ± 0,01	21,5 ± 0,005	1,19E-04	0,60 ± 0,15

Pesos da asa (ASA), carne das coxas e sobrecoxas (CARCXSCX), carne da sobrecoxa (CARSCX), coxas da asa (CASA), coxas e sobrecoxas (CXSCX), dorso (DORS), meio da asa (MASA), osso do peito (OSPT), carcaça resfriada (PCR), peito (PT), sobrecoxas (SCX), moela (MO), rendimentos de asa (RASA), coxa da asa (RCASA), dorso (RDORS), gordura abdominal (RGA), meio da asa (RMASA), moela (RMO), conversão alimentar dos 35 aos 41 dias (CA), ganho de peso dos 35 aos 41 dias (GP3541) e teor de gordura abdominal (GA), espessura do fêmur (ESP_FEM) e da tíbia (ESP_TIBIA), força de quebra do fêmur (FEM_forca) e da tíbia (TIB_Forca), teor de matéria seca do fêmur (FEM_MS) e da tíbia (TIB_MS), peso do fêmur (PESO_FEM), curvatura do fêmur (SCORE) e teor de cinzas da tíbia (TIB_CZ) *foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e as de força em quilograma-força (kgf)

Na população F₂, o efeito aditivo que predomina no modelo foi favorável para o alelo “A” em heterozigose no SNP C>A (*SLIT2*) exceto para rendimento de dorso e teores de colesterol e triglicerídeos (Gráfico 5) que são favoráveis ao alelo “C”. A

população pura TT apresenta as três variantes genóticas, e o alelo “A” também foi favorável para a maioria das características, exceto algumas características de composição óssea como espessura do fêmur (ESP_FEM) e peso do osso do peito (OSPT); de carcaça como peso do peito e da gordura abdominal e seu rendimento (RGA); de vísceras como moela (MO) e de desempenho como ganho de peso dos 35 aos 41 dias (GP35-41).

Gráfico 5 - Médias estimadas para características avaliadas na população F_2 , em relação aos genótipos AC e CC; Teores de colesterol e triglicerídeos

O alelo “A” na população F_2 foi menos freqüente que o alelo “C”, porém na População Pura TT que foi selecionada para características de interesse zootécnico, as frequências alélicas praticamente se mantiveram nas duas populações estudadas.

Foram encontradas associações importantes do SNP C>A (SLIT2) com características de interesse zootécnico em cada uma das duas populações estudadas, sendo que na população F_2 a característica rendimento de coxas e sobrecoxas, característica pela qual o QTL em estudo foi mapeado (BARON et. al., 2010), também sofreram efeito do SNP nesta população, enquanto peso das coxas, peso das coxas e sobrecoxas e peso da carne dessas características, sofreram efeito do SNP na População Pura TT. O SNP C>A foi associado com rendimento de dorso na População F_2 e confirmado na População pura TT.

Na população F_2 , o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) apresentou associação significativa ($P<0,05$) com as características fenotípicas listadas na Tabela 18 e na população Referência Pura TT, apresentou associação significativa ($P<0,05$) com as características fenotípicas listadas na Tabela 19.

Tabela 18 - Médias fenotípicas dos genótipos, erro padrão (EP), efeito aditivo, efeito de dominância e erro padrão (EP) das características associadas com o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) ($P < 0,05$) na População F_2

Característica	Genótipo do InDel (Frequência Genotípica)			Valor <i>P</i>	Efeito Aditivo Valor ± EP	Efeito de Dominância Valor ± EP
	Del/Del (0,17)	Média ± EP In/Del (0,51)	In/In (0,32)			
Asa	84,4 ± 1,05	79,2 ± 0,69	84,5 ± 0,78	2,22E-05	0,13 ± 1,13	-5,18 ± 1,16
Asa adj.42	84,9 ± 0,03	83,3 ± 0,01	84,0 ± 0,02	2,00E-03	-0,43 ± 0,34	-1,09 ± 0,47
Cabeça	34,6 ± 0,45	32,9 ± 0,30	34,7 ± 0,32	2,25E-04	-0,18 ± 0,36	-1,80 ± 0,44
Cab. adj.42	33,2 ± 0,05	35,3 ± 0,04	36,1 ± 0,03	3,70E-08	1,44 ± 0,24	0,65 ± 0,33
Carcaça	660,9 ± 11,27	622,2 ± 7,09	656,2 ± 7,44	3,37E-03	-4,84 ± 10,55	-37,07 ± 10,99
Carc. adj.42	656,6 ± 0,43	671,8 ± 0,26	659,1 ± 0,34	3,30E-08	1,26 ± 1,73	13,99 ± 2,43
Dorso	193,1 ± 3,48	181,2 ± 2,03	189,0 ± 2,10	5,94E-03	-4,52 ± 3,24	-10,61 ± 3,33
Dorso adj.42	196,1 ± 0,16	194,0 ± 0,11	184,8 ± 0,14	0,00E+00	-5,65 ± 0,78	3,50 ± 1,10
Coxas e sobrecoxas	219,7 ± 3,88	207,1 ± 2,43	220,0 ± 2,27	2,52E-03	0,36 ± 3,70	-12,66 ± 3,81
Coxas e sobrecoxas adj.42	214,7 ± 0,20	226,0 ± 0,14	225,0 ± 0,16	2,20E-07	5,16 ± 0,99	6,10 ± 1,40
Peito	163,4 ± 2,97	154,9 ± 1,84	162,0 ± 2,07	3,26E-02	-1,56 ± 3,00	-8,07 ± 3,08
Peito adj.42	160,6 ± 0,25	167,8 ± 0,14	164,5 ± 0,17	1,10E-03	1,95 ± 0,99	5,24 ± 1,40
Pés	40,8 ± 0,65	37,2 ± 0,39	41,1 ± 0,43	3,18E-11	0,37 ± 0,56	-3,70 ± 0,59
Pés adj.42	40,6 ± 0,07	39,6 ± 0,04	41,5 ± 0,05	4,90E-06	0,44 ± 0,27	-1,39 ± 0,38
Rend. Pés	4,0 ± 0,03	3,9 ± 0,02	4,1 ± 0,03	9,95E-07	0,07 ± 0,03	-0,14 ± 0,04
Comp. intestino	154,4 ± 1,67	150,5 ± 0,92	155,6 ± 1,15	2,82E-04	1,02 ± 1,27	-4,34 ± 1,43
Cr_35-41d	594,3 ± 13,82	560,8 ± 6,98	598,7 ± 9,38	6,87E-03	4,44 ± 11,53	-35,04 ± 12,06
Gp_35-41d	226,2 ± 6,06	204,7 ± 3,89	224,5 ± 4,53	2,96E-03	-1,77 ± 5,97	-20,93 ± 6,21
Pv35d	822,5 ± 13,39	786,3 ± 7,44	814,3 ± 8,64	2,38E-02	-8,49 ± 11,60	-33,40 ± 12,13
Pv41d	1042,2 ± 16,35	983,7 ± 10,32	1036,4 ± 10,13	1,45E-03	-5,96 ± 15,03	-56,49 ± 15,69
Pv42d	1009,4 ± 15,75	951,9 ± 10,07	1001,3 ± 10,17	1,78E-03	-8,34 ± 14,70	-54,76 ± 15,35
Coração	6,6 ± 0,14	6,2 ± 0,08	6,5 ± 0,11	2,51E-02	-0,10 ± 0,14	-0,40 ± 0,15
Cor. adj.42	6,9 ± 0,02	6,4 ± 0,01	6,2 ± 0,02	2,10E-05	-0,36 ± 0,07	-0,11 ± 0,11
Fígado	26,1 ± 0,39	24,1 ± 0,27	26,1 ± 0,36	6,38E-06	-0,01 ± 0,39	-2,04 ± 0,43
Fígado adj.42	26,2 ± 0,05	25,1 ± 0,03	26,0 ± 0,03	5,30E-03	-0,08 ± 0,23	-1,00 ± 0,32
Moela	24,1 ± 0,50	22,0 ± 0,29	23,4 ± 0,31	2,98E-05	0,14 ± 0,38	-1,59 ± 0,41
Moela adj.42	24,3 ± 0,09	24,5 ± 0,04	26,1 ± 0,06	1,70E-04	0,91 ± 0,32	-0,71 ± 0,44
Pulmão adj.42	9,0 ± 0,01	8,0 ± 0,01	7,5 ± 0,01	6,22E-06	-0,74 ± 0,16	-0,17 ± 0,22
Colest. adj.42	109,3 ± 0,42	90,9 ± 0,23	95,8 ± 0,30	3,20E-07	-6,70 ± 1,59	-11,61 ± 2,20
Coles trig. adj.42	136,7 ± 0,50	124,4 ± 0,34	125,8 ± 0,37	1,00E-02	-5,46 ± 1,99	-6,86 ± 2,90

Para as características foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e teores em mg/dL; sendo que: Rend. (rendimento), d (dias), CA, Cr (consumo de ração), GP(ganho de peso), Pv (peso vivo), Colest. (colesterol) e trig. (triglicerídeos)

Tabela 19 - Médias fenotípicas dos genótipos, erro padrão (EP), efeito aditivo, efeito de dominância e erro padrão (EP) das características associadas com o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) ($P < 0,05$) na população pura TT

Característica	Genótipo do SNP (Frequência Genotípica)			Valor P	Efeito Aditivo Valor ± EP	Efeito de Dom. Valor ± EP
	Média ± EP					
	Del/Del (0,11)	In/Del (0,44)	In/In (0,45)			
ASA adj.42	165,4 ± 0,03	169,8 ± 0,01	171,0 ± 0,02	2,21E-02	0,19 ± 0,29	-0,79 ± 0,36
CAB adj.42	52,6 ± 0,09	52,0 ± 0,06	53,0 ± 0,06	5,13E-05	-0,80 ± 0,29	0,72 ± 0,36
CARCX adj.42	132,8 ± 0,02	130,9 ± 0,01	133,6 ± 0,01	5,24E-04	1,82 ± 0,46	0,94 ± 0,58
CARPT adj.42	297,9 ± 1,15	296,0 ± 0,50	290,2 ± 0,56	3,84E-02	0,01 ± 0,28	0,81 ± 0,34
CASA adj.42	84,3 ± 0,23	87,0 ± 0,13	87,9 ± 0,16	1,44E-03	1,22 ± 0,34	0,88 ± 0,41
CX adj.42	204,1 ± 0,03	205,1 ± 0,01	208,5 ± 0,02	1,44E-04	0,73 ± 0,24	1,14 ± 0,29
CXSCX adj.42	515,1 ± 1,19	511,1 ± 0,63	516,7 ± 0,62	7,50E-04	0,38 ± 0,60	-2,25 ± 0,71
DORS adj.42	259,5 ± 0,88	263,7 ± 0,42	266,9 ± 0,44	3,35E-03	1,97 ± 0,65	2,23 ± 0,83
MASA adj.42	61,4 ± 0,09	63,3 ± 0,04	62,9 ± 0,03	3,67E-02	0,01 ± 0,26	0,81 ± 0,36
OSPT adj.42	95,8 ± 0,47	100,0 ± 0,25	99,7 ± 0,24	1,54E-03	-0,09 ± 0,05	-0,25 ± 0,07
PCR adj.42	1630,7 ± 1,66	1640,4 ± 0,86	1642,8 ± 0,83	1,90E-02	1,25 ± 0,48	1,26 ± 0,58
PES adj.42	76,1 ± 0,08	76,0 ± 0,05	74,4 ± 0,05	8,97E-03	0,30 ± 0,12	-0,11 ± 0,16
FIG adj.42	50,6 ± 0,03	53,2 ± 0,01	53,1 ± 0,01	4,79E-08	0,45 ± 0,10	-0,15 ± 0,13
GA adj.42	42,6 ± 0,03	46,1 ± 0,02	48,3 ± 0,02	4,39E-08	-0,59 ± 0,08	-0,37 ± 0,11
RFIG	2,3 ± 0,03	2,4 ± 0,02	2,4 ± 0,01	2,43E-04	-0,11 ± 0,13	0,59 ± 0,18
RCASA	3,8 ± 0,02	3,9 ± 0,01	3,9 ± 0,02	3,07E-04	-0,39 ± 0,13	0,17 ± 0,18
RMASA	2,78 ± 0,02	2,83 ± 0,01	2,81 ± 0,01	8,41E-03	0,10 ± 0,03	0,01 ± 0,04
RASA	7,50 ± 0,03	7,61 ± 0,02	7,64 ± 0,02	3,21E-03	3,41 ± 1,72	8,55 ± 2,51
RCARCX	5,969 ± 0,01	5,970 ± 0,003	5,974 ± 0,003	2,34E-02	0,36 ± 0,22	-0,33 ± 0,30
RGA adj.42	2,0 ± 0,01	2,1 ± 0,004	2,2 ± 0,004	2,74E-02	-1,97 ± 1,51	3,09 ± 1,97
P21	661,0 ± 6,40	636,2 ± 3,93	639,5 ± 3,53	6,28E-03	6,08 ± 1,90	3,76 ± 2,47
P21 adj.	653,58 ± 3,34	633,98 ± 1,56	645,13 ± 1,70	1,31E-03	2,87 ± 0,8	0,62 ± 0,95
COMP_TIBIA	95,4 ± 0,22	94,1 ± 0,16	94,9 ± 0,14	3,10E-02	-0,26 ± 0,33	-1,05 ± 0,40
COMP_TIBIA adj.42	95,03 ± 0,01	95,8 ± 0,01	95,04 ± 0,01	4,26E-02	-0,07 ± 0,27	-0,80 ± 0,33
ESP_FEM adj.42	9,1 ± 0,001	8,7 ± 0,001	8,9 ± 0,001	1,41E-02	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,01
FEM_CZ adj.42	21,6 ± 0,001	21,4 ± 0,001	20,9 ± 0,001	4,33E-05	2,81 ± 0,62	1,59 ± 0,74
TIB_CZ adj.42	22,3 ± 0,004	22,8 ± 0,01	22,1 ± 0,001	6,09E-04	2,21 ± 0,79	-1,20 ± 0,94
TIB_Dist adj.42	3,8 ± 0,01	4,0 ± 0,005	3,7 ± 0,004	1,69E-02	0,06 ± 0,02	0,00 ± 0,03
FEM_forca adj.42	29,8 ± 0,15	30,2 ± 0,06	27,3 ± 0,06	4,28E-02	0,07 ± 0,03	0,04 ± 0,03
FEM_MS adj.42	29,8 ± 0,15	30,2 ± 0,06	27,3 ± 0,06	1,29E-02	0,76 ± 1,48	-4,74 ± 1,91
PESO_TIBIA adj.42	11,4 ± 0,01	11,7 ± 0,004	12,3 ± 0,004	3,45E-04	-3,85 ± 1,29	1,94 ± 1,68
PFEM adj.42	32,95 ± 0,10	33,77 ± 0,05	32,98 ± 0,06	1,32E-03	3,66 ± 1,05	0,56 ± 1,34
PTIB adj.42	32,95 ± 0,10	33,77 ± 0,05	32,98 ± 0,06	2,78E-02	-0,06 ± 0,08	0,22 ± 0,11
TIB_Area adj.42	65,0 ± 1,08	77,0 ± 0,60	71,9 ± 0,68	4,92E-02	-10,73 ± 5,13	-14,01 ± 6,34

Pesos da asa (ASA), cabeça (CAB), carne da coxa (CARCX), carne do peito (CARPT), coxas da asa (CASA), coxas (CX), coxas e sobrecoxas (CXSCX), peso do dorso (DORS), meio da asa (MASA), peito (PT) e osso do peito (OSPT), carcaça resfriada (PCR), pés (PES), fígado (FIG) e gordura abdominal (GA), rendimentos de asa (RASA), carne da coxa (RCARCX), coxa da asa (RCASA), fígado (RFIG), gordura abdominal (RGA), meio da asa (RMASA) e osso do peito (ROSPT), peso aos 21 dias (P21), comprimento do fêmur (COMP_FEM) e tíbia (COMP_TIBIA), espessura do fêmur (ESP_FEM), teor de cinzas do fêmur (FEM_CZ) e tíbia (TIB_CZ), área de quebra da tíbia (TIB_Area), distância de quebra da tíbia (TIB_Dist), força de quebra do fêmur (FEM_forca), teor de matéria seca do fêmur (FEM_MS), peso da tíbia (PESO_TIBIA), peso das tíbias (PTIB) e fêmures resfriados (PFEM) *foram avaliados os pesos em gramas, as medidas de comprimento em centímetros e as de força em quilograma-força (kgf)

PPARGC1A está envolvido com metabolismo energético sendo o principal fator de regulação da determinação de tipo de fibra muscular (CORTON e BROWN-BORG, 2005). É importante ressaltar que foi observada uma maior expressão do gene *PPARGC1A* em tecido abdominal com maiores teores de gordura em frangos de corte (LARKINA et al., 2011) e toucinho em suínos (ERKENS et al., 2006). Um estudo indicou *PPARGC1A* como um potencial marcador para seleção contra gordura abdominal em frangos (WU et al., 2006). Em suínos houve associação de um SNP nesse gene com conversão alimentar (STACHOWIAK et al., 2007) e em bovinos com variação de gordura no leite (WEIKARD et al., 2005). Esses estudos estão relacionados com os resultados do presente trabalho no que diz respeito à gordura.

Ocorreram associações do *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) com peso das asas nas duas populações (F_2 e TT), sendo que para a população TT, além das asas, os rendimentos da asa e coxas das asas também foram associados. O *InDel* também foi associado, nas duas populações, com peso da carcaça, dorso e coxas sendo que na População referência TT também foram associados com: pesos das sobrecoxas, carnes das coxas e sobrecoxas, rendimentos da carne das coxas.

O *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) foi associado com gordura avaliada pelos teores de triglicerídeos e colesterol na população F_2 , enquanto que na população pura TT, foi associado com peso de gordura abdominal e rendimento de gordura abdominal. Em relação ao desempenho, na F_2 o *InDel* foi associado com ganhos de peso dos 35 aos 41 dias, peso vivo aos 35, 41 e 42 dias, porém na população pura TT, o *InDel* foi associado somente com peso aos 21 dias.

Para o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*), o efeito de dominância prevalece em relação ao aditivo na maioria das características avaliadas nas duas populações, sendo que em grande parte das características que sofreram efeito do *InDel*, houve um efeito de sobredominância negativa na população F_2 e positiva na população pura TT.

Na população F_2 , o alelo “In” (inserção) foi favorável para pesos de moela, cabeça, coxas e sobrecoxas, peito, pés e seu rendimento, comprimento do intestino e consumo de ração dos 35 aos 41 dias. O alelo “Del” foi favorável para pesos das asas, carcaça, dorso, coração, fígado, pulmão, teores de colesterol e triglicerídeos e ganho de peso dos 35 aos 41 dias, peso vivo aos 35, 41 e 42 dias. Porém, teve um

efeito de sobredominância positivo para pesos da carcaça, peito e coxa (Gráfico 6a, b e c respectivamente).

Na população pura TT, o alelo “Del” (deleção) foi favorável para algumas características de carcaça como: pesos dos pés (PES), carne do peito (CARPT); desempenho como peso vivo aos 21 dias (P21); e de composições ósseas como comprimento da tibia (Com_tib), espessura do fêmur (ESP_FEM), cinzas do fêmur (FEM_C_Z) e tibia (TIB_C_Z), distância de quebra da tibia (TIB_Dist), força de quebra do fêmur (FEM_forca) e matéria seca do fêmur (Fem_M_S). A heterozigose não foi favorável para pesos da cabeça, carne da coxa e seu rendimento, carne do peito, peso vivo aos 21 dias, comprimento da tibia e espessura do fêmur.

Gráfico 6 - Médias estimadas para características avaliadas na população F₂, em relação aos genótipos AA (In/In), AT (In/Del) e TT (Del/Del); a - Peso da carcaça; b - Peso do peito; c - Peso das coxas

O alelo contendo a inserção na população F₂ foi mais frequente. Na população pura TT que foi selecionada para características de interesse zotecnico,

as frequências alélicas praticamente mantiveram-se constantes o que demonstra segregação deste polimorfismo na população Pura TT.

O *InDel* -/TTCT foi associado com características importantes nas duas populações estudadas e algumas foram confirmadas na População Pura TT como: pesos das asas, carcaça, dorso, coxas e fígado. Na população F_2 , este *InDel* foi associado às características de peso vivo aos 35 e 42 dias pelas quais o QTL em estudo foi mapeado (AMBO et. al., 2009). Este QTL também foi mapeado para rendimento de coxa e sobrecoxa na população F_2 (BARON, et. al., 2010), porém na População Pura TT encontramos associação do *InDel* com rendimento somente da carne da coxa.

A seleção no melhoramento genético animal com base em características de desempenho e carcaça podem acabar afetando a fisiológica do animal devido à seleção contra características importantes para a homeostase do organismo como: tamanho de coração, pulmão ou resistência óssea. Essas observações foram bem elucidadas nos trabalhos de Havenstein et al. (2003ab) e devem ser consideradas na hora da seleção.

5.8 Análise de haplótipos e desequilíbrio de Ligação (LD)

Haploview é um *software* interativo que permite a observação de padrões populacionais através de informações obtidas pela correlação entre os genótipos e desequilíbrio de ligação dos genes (BARRETT et al., 2005).

Para calcular o desequilíbrio de ligação (LD) duas medidas são recomendadas. Ambas medem a frequência de aparecimento dos haplótipos por correlação, porém o r^2 leva em consideração somente a correlação entre os alelos e a D' (valor pairwise), além da correlação entre os alelos, considera a distância dos marcadores.

População F_2

Com o programa *Haploview* foi possível avaliar alguns parâmetros das três mutações identificadas na população F_2 como: Observação (ObsHET) e predições (PredHet) de heterozigotos, equilíbrio de Hardy Weinberg (HWpval) e frequências dos menores alelos (MAF) (Tabela 23).

Tabela 23 - Observação (ObsHET) e predições (PredHet) de heterozigotos, equilíbrio de Hardy Weinberg (HWpval) e frequências dos menores alelos (MAF) para as três mutações analisadas na população F_2

Nome	Posição	ObsHET	PredHET	HWpval	MAF	Alelos
KLF3	69158062	0,507	0,5	0,9281	0,5	C:T
PPARGC1A	73632140	0,509	0,489	0,5951	0,425	T: A (In:Del)
SLIT2	74624581	0,507	0,379	7,12E-11	0,254	C:A

Valor P de corte para HW=0,001

A MAF (frequência do menor alelo para cada marcador) está próxima dos 50%, sendo assim, as famílias que foram selecionadas para genotipagem apresentam-se homogêneas em relação às frequências alélicas dos marcadores.

Também foram feitas análises de LD dos genes o que nos permite observar a probabilidade de formação de haplótipos nos três genes (Figura 15).

Figura 15 - Distâncias (D') e probabilidades de formação de haplótipos entre os marcadores
Entre 1 e 3: $D'=0,296$ e $r\text{-squared}= 0,03$; entre 1 e 2: $D'=0,186$ e $r\text{-squared}= 0,026$; entre 2 e 3: $D'=0,015$ e $r\text{-squared}= 0,00$

Os genes não estão em LD ($r^2 > 0,03$) na população F_2 . Considerando que os blocos de haplótipos em gerações F_2 costumam ser muito grandes comparando com populações selecionadas, a menor distância observada entre os marcadores é 992kb o que é muito distante.

Foi analisada, na população F_2 , a frequência das combinações alélicas para os três marcadores nos genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2* (Tabela 24).

Tabela 24 – Frequência dos haplótipos para os três marcadores analisados na população F₂

KLF3 X PPARG X SLIT		PPARG X SLIT	
CTC	22,5%	TC	43,1%
TAC	21,6%	AC	31,5%
TTC	19,3%	TA	14,4%
CAC	11,2%	AA	11,0%
CTA	10,0%		
CAA	6,2%		
TTA	5,6%		
KLF2 X SLIT2		KLF3 X PPARG	
TC	41,1%	CT	32,7%
CC	33,6%	TA	25,3%
CA	16,4%	TT	24,7%
TA	8,9%	CA	17,3%

Apesar de não estarem em LD, observando as frequências dos haplótipos, foi observado que para os genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2*, as combinações CTC, TAC e TTC, CAC, CTA, foram frequentes, e se analisarmos de dois em dois as frequências permanecem altas, ou seja, cada um dos três genes apresenta forte relação alélica com pelo menos um dos outros dois genes nesta população.

População Referência TT

Com o programa *Haploview* foi possível avaliar para as três mutações encontradas na população Referência Pura TT os parâmetros: Observação (ObsHET) e predições (PredHet) de heterozigotos, equilíbrio de Hardy Weinberg (HWpval) e frequências dos menores alelos (MAF) (Tabela 25).

Tabela 25 - Observação (ObsHET) e predições (PredHet) de heterozigotos, equilíbrio de Hardy Weinberg (HWpval) e frequências dos menores alelos (MAF) para três mutações analisadas na população pura TT

Nome	Posição	ObsHET	PredHET	HWpval	MAF	Alelos
KLF3	69158062	0,049	0,048	1,0000	0,025	C:T
PPARGC1A	73632140	0,460	0,461	0,9817	0,361	T:A (In:Del)
SLIT2	74624581	0,447	0,425	0,1994	0,306	C:A

Valor *P* de corte para HW=0,001

O valor do MAF (0,025) indicou que o alelo “T” para o gene *KLF3* está pouco frequente nesta população.

Para uma população estar em HWE precisa atender alguns pressupostos como: não sofrer seleção natural, mutações ou migração, em outras palavras, a população precisa ser infinitamente grande, reproduzir-se aleatoriamente, e não estar sujeita a evolução (STERN, 1943), o que não é o caso da população utilizada neste estudo. Sendo assim, o teste do HWE, nesta população, nos permite concluir

que não ocorreram erros de genotipagem e que os marcadores estão segregando nesta população.

Foi realizado o teste de LD o que nos permite observar a probabilidade de possíveis haplótipos entre os três genes (Figura 16).

Figura 16 - Distâncias (D') e probabilidades de formação de haplótipos entre os marcadores
Entre 1 e 2: $D' = 0,747$ e $r^2 = 0,009$; entre 1 e 3: $D' = 0,822$ e $r^2 = 0,044$;
entre 2 e 3: $D' = 0,931$ e $r^2 = 0,272$

Em uma análise da estrutura, diversidade e mapeamento fino de características Mendelianas em uma população de galinhas caipiras, foi considerado para as análises, LD com $r^2 > 0,3$ e blocos de haplótipos com tamanhos de aproximadamente 10Kb (WRAGG et al., 2012). Os polimorfismos nos genes *PPARGC1A* e *SLIT2* são os mais próximos entre os três avaliados (992Kb) e não estão em LD ($r^2 = 0,272$) na População Referência Pura TT, sendo assim, essas combinações alélicas se tornam aleatórias. Mesmo sabendo que não pertencem a um mesmo bloco verificamos a relação entre as combinações de alelos formadas pelos três genes nesta população.

Foi analisada através dos alelos dos três marcadores para a População Referência Pura TT a porcentagem de aparecimento de diferentes combinações alélicas entre os genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2* (Tabela 26).

Tabela 26 - Frequência de combinações entre os alelos dos marcadores nos genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2* analisados na população pura TT

<i>KLF3</i> X <i>PPARG</i> X <i>SLIT</i>	<i>PPARG</i> X <i>SLIT</i>
CAC 36,5%	AC 36,8%
CTC 32,0%	TC 31,7%
CTA 28,3%	TA 30,7%
TTA 0,2%	
<i>KLF3</i> X <i>SLIT2</i>	<i>KLF3</i> X <i>PPARG</i>
CC 69,30%	CT 61,6%
CA 28,30%	CA 35,9%
TA 0,22%	TT 0,2%

Os genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2* não estão em LD nas duas populações, F_2 e TT indicando quebra de ligação entre os genes por recombinação. Porém, muitas combinações entre os alelos dos três genes são frequentes e estão relacionadas com uma série de características fenotípicas em comum. Isso pode indicar que cada gene pode ser responsável por mais de uma característica fenotípica (pleiotropia) ou que exista interação entre os três genes para controlar característica em comum (epistasia).

5.8.1 Efeito dos haplótipos sobre as características estudadas

População F_2

Para a população F_2 foram analisados quatro blocos de haplótipos totalizando 18 haplótipos (Tabela 27)

Tabela 27 - Blocos de haplótipos utilizados na análise através do Plink para a população F_2

Blocos	Haplótipos					
BLOCO 1: KLF3 PPARG SLIT	TAC	CAC	TTA	CTA	TTC	CTC
BLOCO 2: KLF3 PPARG	TA	CA	TT	CT		
BLOCO3: PPARG SLIT	AA	AC	TA	TC		
BLOCO4: KLF3 SLIT	TA	CA	TC	CC		

Os alelos dos haplótipos são: T e C; C e A; A (In) e T(Del) para os genes *KLF3*, *SLIT2* e *PPARGC1A* respectivamente

Das 24 características que apresentaram associação com alguma das variações haplotípicas, as mais frequentes foram do bloco 1 (três genes - 12 características) e bloco 4 (*KLF3* e *PPARGC1A* - 7 características), indicando que haja efeito poligênico sobre essas características. Quatro características tiveram mais associações com haplótipos do bloco 3 do que do bloco1 (rendimentos das asas, pés, coxa e peso da coxa), sendo assim, essas características podem estar sendo controladas pelos genes *SLIT2* e *PPARGC1A*. Porém, rendimento do dorso e coração tiveram haplótipos do bloco 2 com valores de significância menores do que dos haplótipos do bloco 1, indicando que o controle dessas características pode estar sendo influenciado pelos genes *KLF3* e *PPARGC1A* (Tabela 28).

População pura TT

Para a população pura TT foram analisados 4 blocos de haplótipos totalizando 13 haplótipos (Tabela 29)

Tabela 28 - Análise de associação de haplótipos com características fenotípicas da população F₂

NºH	Característica	B	H	1º Valor P	B	H	2º Valor P
11	Peso de asa	1	CTC	7,00E-05	2	CT	1,10E-04
7	Peso ao nascimento	1	TTA	5,00E-05	4	CA	1,30E-04
6	Consumo de ração dos 35 aos 41 dias	1	CTC	9,00E-03	2	CT	1,00E-02
5	Ganho de peso dos 35 aos 41 dias	1	CTC	4,00E-03	3	TA	1,32E-02
6	Comprimento do Intestino	1	TTC	5,00E-03	4	TC	3,26E-02
6	Rendimento de peito	1	TTA	1,00E-03	2	TT	6,00E-03
4	Rendimento de gordura	1	TTA	3,00E-04	4	TA	1,00E-03
4	Peso de carcaça	1	CTC	1,60E-02	4	TA	2,10E-02
3	Rendimento de carcaça	1	TTA	6,00E-03	3	AC	2,70E-02
2	Gordura	1	CTA	9,60E-03	1	TAC	4,06E-02
1	Peso do peito	1	TTA	3,95E-02			
1	Ef. Alimentar dos 35 aos 41 dias	1	CTC	4,76E-02			
12	Rendimento de dorso	2	CA	1,00E-05	3	AC	1,10E-05
4	Rendimento de coração	2	CT	7,00E-03	3	AC	2,15E-02
15	Rendimento de asa	3	AC	3,00E-11	1	CAC	9,00E-08
11	Rendimento de pés	3	TA	2,00E-07	1	CTA	5,00E-05
11	Peso dos pés	3	TA	8,00E-04	1	TAC	1,00E-03
8	Rendimento da coxa	3	TA	2,00E-04	1	TTA	1,40E-03
7	Peso da coxa	4	TC	1,30E-02	2	CT	1,80E-02
10	Moela	4	CA	1,00E-03	4	TC	3,00E-03
7	Rend. Moela	4	CA	1,00E-03	1	CTA	1,93E-02
8	Fígado	4	TC	4,00E-03	1	TAC	9,00E-03
3	Peso vivo aos 42d	4	TC	1,70E-02	1	CTC	2,80E-02
3	Peso vivo aos 41d	4	TC	2,20E-02	1	CTC	2,30E-02
3	Colesterol	4	TC	1,60E-02	1	TAC	2,70E-02

NºH - número de haplótipos que apresentaram associação com a características; B – bloco de haplótipos, H – haplótipos. 1º e 2º valor *P*: os dois haplótipos com maior significância entre todos que apresentaram associação

Tabela 29 - Blocos de haplótipos utilizados na análise através do Plink para a população pura TT

Blocos	Haplótipos			
BLOCO 1: KFL3 PPARG SLIT	CAC	TTA	CTA	CTC
BLOCO 2: KFL3 PPARG	CT	TT	CA	
BLOCO3: PPARG SLIT	CA	AT	TC	
BLOCO4: KFL3 SLIT	TC	CA	CC	

Os alelos dos haplótipos são: T e C; C e A; A(In) e T(Del) para os genes *KLF3*, *SLIT2* e *PPARGC1A* respectivamente

Das 12 características que apresentaram associação com alguma das variações haplotípicas, as mais frequentes foram do bloco 1 (três genes - 7 características) indicando que existe efeito poligênico sobre essas características. Duas características tiveram maiores associações com haplótipos do bloco 2 do que do bloco 1 (Peso aos 42 dias e peso pós sangria e depena), sugerindo que os genes *KLF3* e *PPARGC1A* exerçam efeito poligênico no controle dessas características. . Porém, peso aos 21 dias, teve haplótipos do bloco 3 com associação de menores valores de significância em relação aos haplótipos do bloco 1, indicando que essas características podem estar sendo afetadas pelos genes *PPARGC1A* e *SLIT2* (Tabela 30).

Tabela 30 - Análise de associação de haplótipos com características fenotípicas da População Pura TT

Nº H	Característica	B	H	1º Valor P	B	H	2º Valor P
2	Peso ao nascer	1	CAC	4,00E-02	1	CTC	6,00E-02
5	Peso aos 35 dias	1	CTC	4,00E-03	3	TC	8,00E-03
3	Peso do fígado	1	CTC	1,90E-02	2	CT	2,10E-02
1	Peso da tíbia	1	TTA	3,90E-02			
1	Comprimento da Tíbia	1	CTC	1,70E-02			
4	Rendimento da Moela	1	TTA	8,00E-03	2	TT	2,39E-02
2	Rend. da pele da sobrecoxa	1	CTA	3,40E-02	4	CA	4,40E-02
4	Peso aos 42 dias	2	CT	9,00E-03	1	CAC	1,30E-02
5	Peso pós-sangria e depena	2	CT	1,70E-02	1	CAC	2,30E-02
4	Peso aos 21 dias	3	AC	2,00E-03	1	CAC	3,00E-03
5	Gordura abdominal	4	CC	1,00E-03	4	CA	6,00E-03

NºH - número de haplótipos que apresentaram associação com a características; B – bloco de haplótipos, H – haplótipos. 1º e 2º valor P: os dois haplótipos com maior significância entre todos que apresentaram associação

5.9 Efeito dos genes para diferentes combinações de alelos

Foram selecionadas as características que foram associadas com os três polimorfismos simultaneamente para serem comparadas com os valores das associações de haplótipos do software *Plink* e *Haploview*. Os valores de fenótipo em relação à combinação de alelos para cada gene estão na tabela 31.

Tabela 31 – Associação (Valor P) de três polimorfismos (MUTAÇÃO) com diferentes características (Caract.) nas duas populações estudadas (Pop.), alelos favoráveis (AF) e não favoráveis (ANF) para cada característica e valores em gramas atribuídos as médias de cada genótipo favorável (GF), não favorável (GNF) e heterozigoto (Heteroz.) somadas ao efeito aditivo para os SNPs e aditivo mais dominante para o *InDel*.

MUTAÇÃO	Pop.	Caract.	Valor P	AF	ANF	GF	Heteroz.	GNF
C>T (KLF3)	F ₂	Peso da cabeça	1,18E-02	C	T	35,6	34,5	32,1
-/TTTCT (PPARGC1A)	F ₂		2,25E-04	T	A	36,1	35,3	33,2
C>A (SLIT2)	F ₂		4,48E-02	A	C	*	34,7	33,8
C>T (KLF3)	F ₂	Peso dos pés	2,97E-07	C	T	41,8	41,1	40,2
-/TTTCT (PPARGC1A)	F ₂		4,90E-06	T	A	41,5	39,6	40,6
C>A (SLIT2)	F ₂		2,20E-05	A	C	*	41,0	38,7
C>T (KLF3)	F ₂	Rendimento dos pés	4,98E-04	C	T	4,2	4,1	4,0
-/TTTCT (PPARGC1A)	F ₂		9,95E-07	T	A	4,1	3,9	4,0
C>A (SLIT2)	F ₂		6,10E-14	A	C	*	4,1	3,9
C>T (KLF3)	F ₂	Peso da Moela	3,00E-04	C	T	26,2	25,2	24,3
-/TTTCT (PPARGC1A)	F ₂		1,70E-04	T	A	26,1	24,5	24,3
C>A (SLIT2)	F ₂		5,80E-03	A	C	*	25,2	24,3
C>T (KLF3)	F ₂	Colesterol e Triglicerídeos adj42	9,70E-06	T	C	139,4	131,2	123,2
-/TTTCT (PPARGC1A)	F ₂		1,00E-02	A	T	136,7	124,4	125,8
C>A (SLIT2)	F ₂		1,03E-03	C	A	140,6	131,3	*
C>T (KLF3)	TT	Peso das coxas e sobrecoxas (CXSCX adj42)	2,15E-02	C	T	529,4	518,4	*n/t
-/TTTCT (PPARGC1A)	TT		7,50E-04	T	A	516,7	511,1	515,1
C>A (SLIT2)	TT		4,94E-04	A	C	527,9	519,3	516,1
C>T (KLF3)	TT	Cinzas da Tíbia (Tib_C_Zadj42)	1,36E-02	C	T	23,6	22,1	*
-/TTTCT (PPARGC1A)	TT		6,09E-04	A	T	22,3	22,8	22,1
C>A (SLIT2)	TT		1,19E-04	A	C	22,7	22,1	21,5

No gene *PPARGC1A*, A corresponde ao alelo "Del" e T ao alelo "In"; não tem essa variante genotípica na população

Na população F_2 os alelos C (*KLF3*), T (*PPARGC1A*) e A (*SLIT2*) apresentam os maiores valores de fenótipo para todas as características, exceto para Colesterol e Triglicerídeos. O gene *PPARGC1A* já foi indicado como um potencial marcador para seleção contra gordura abdominal em frangos (WU et al., 2006).

Foram verificadas as relações dos haplótipos (*Haploview*) com as melhores médias. Pela análise de haplótipos para a população F_2 , o haplótipo não favorável TAC aparece em 21,6% das observações sendo muito comum, o alelo favorável CTA aparece em 10% das observações e o haplótipo CTC (22,5%) é o mais frequente.

Para a população pura TT, Cinzas da Tíbia (Tib_C_Z), entre o gene *KLF3* e *PPARGC1A*, apresenta o haplótipo favorável “CA” que está presente em 35,9% das observações nesta população. Na característica peso das coxas e sobrecoxas (CXSCX), aparecem os alelos favoráveis “CTA” que está presente em 28,3% das observações e entre *KLF3* e *PPARGC1A* o alelo “CT” que está presente em 61,6% das observações nesta população.

Relacionando estas combinações de alelos com os resultados obtidos pelo programa *Plink*, observamos que: Peso de pés foi associado com o haplótipo TA (*PPARG* e *SLIT2*) e TAC (3 genes) nesta ordem de significância, sendo que para a análise de combinação de alelos, o haplótipo TA é favorável e TAC é não favorável para peso dos pés (Tabela 29). Quando observamos o rendimento dos pés, o mesmo haplótipo TA é observado e o segundo haplótipo CTA (nesta ordem de significância), na análise de comparação de alelos, apareceu como favorável. Sendo assim, os genes *PPARGC1A* e *SLIT2* exercem influência sobre o controle dessas características com haplótipo de alelo favorável “TA” na população F_2 .

Em relação à gordura, avaliamos os haplótipos para colesterol e gordura abdominal e comparamos com a análise individual de teores de colesterol e triglicerídeo. Colesterol foi associado com o alelo “TC” (*KLF3* e *SLIT2*) e “TAC” (3 genes) que são haplótipos com alelos favoráveis (maiores valores fenotípicos) para teores de colesterol e triglicerídeos na análise de comparação de alelos. Gordura abdominal foi associada com os haplótipos “CTA” e “TAC”, haplótipos com alelos favoráveis e não favoráveis para teores de colesterol e triglicerídeos, respectivamente. A população F_2 apresenta alelo favorável para teores de colesterol e triglicerídeos em maior frequência na população.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genes *KLF3*, *SLIT2* e *PPARGC1A* foram identificados como potenciais genes candidatos para estudos de associação genética com características de interesse zootécnico. Neles, foram identificados três polimorfismos ainda não descritos nos bancos de dados disponíveis: g.69144312 C>T (*KLF3*), g.73632140 -/TTTCT (*PPARGC1A*) e g.74737073 C>A (*SLIT2*).

Os polimorfismos encontrados nos genes *KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2* foram avaliados em uma população experimental e em uma referência pura de corte “TT” da Embrapa Suínos e Aves. Os dois SNPs e um *InDel* foram associados com características de desempenho, carcaça, órgãos e composições ósseas.

As associações confirmadas na população TT foram pesos de fígado, coxas, ganhos de peso dos 35 aos 41 dias com o SNP C> T (*KLF3*); pesos das asas, cabeça, carcaça, dorso, coxas, peito, fígado e gordura abdominal com o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) e peso da gordura abdominal com SNP C>A (*SLIT2*) indicando estes polimorfismos como potenciais marcadores moleculares para uso nos programas de melhoramento baseado em seleção conduzida através de métodos de associação genética para características de interesse zootécnico.

Associações do SNP C>T (*KLF3*) com peso vivo aos 42 dias e do SNP C>A (*SLIT2*) com rendimento de coxa e sobrecoxa na População F₂ confirmam os achados de Ambo et al. (2009) e Baron et al. (2010), respectivamente para o mapeamento do QTL utilizado neste estudo e o *InDel* -/TTTCT (*PPARGC1A*) foi associado com rendimento de carne de coxa na População Pura TT sendo que Baron et al. (2010) mapearam o QTL para rendimento de coxa e sobrecoxa.

Os três genes estudados não estão em LD, porém as combinações alélicas para os três genes (*KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2*) aparecem frequentemente nestas duas populações estudadas (F₂ e pura TT) e muitas associações das características avaliadas ocorrem com as mesmas combinações alélicas nas duas populações, sendo assim, mais do que um gene pode estar afetando a mesma característica avaliada, ou seja, existe efeito poligênico dos genes sobre algumas das características avaliadas.

Testes de associação com múltiplos marcadores (*KLF3*, *PPARGC1A* e *SLIT2*) e de efeito epistático são recomendados para complementar este estudo.

7 CONCLUSÃO

Foram encontrados três genes candidatos dos quais identificamos três polimorfismos, ainda não descritos na literatura, que estão associados, nas populações estudadas, com características de interesse para o melhoramento avícola.

REFERÊNCIAS

- ALBERS, G.; GROOT, I. Future trends in poultry breeding. **World Poultry**, Cambridge, v. 14, n. 8, p. 42-43, 1998.
- ALMEIDA E.; SILVA, M. Genetic improvement of poultry in Brazil. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 4, p. 437-445, 2009.
- AMBO, M. **Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 de Gallus gallus**. 2007. p. 83 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, SP.
- AMBO, M.; CAMPOS, R.D.L.R.; MOURA, A.S.M.T.; BOSCHIERO, C.; DO ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; NONES, K.; COUTINHO, L.L. Genetic linkage maps of chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13 from a Brazilian resource population. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 447-452, 2008.
- AMBO, M.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.B.; BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIERO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L. L. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Malden, v. 40, n. 2, p. 200-208, 2009.
- ANDERSSON, L.; HALEY, C.; ELLEGREN, H.; KNOTT, S.; JOHANSSON, M.; ANDERSSON, K.; ANDERSSON-EKLUND, L.; EDFORS-LILJA, I.; FREDHOLM, M.; HANSSON, I.; ET, A. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Science**, New York, v. 263, n. 5154, p. 1771-1774, 1994.
- ANTIN, P.B.; PIER, M.; SESEPASARA, T.; YATSKIEVYCH, T.A.; DARNELL, D.K. Embryonic expression of the chicken krüppel-like (KLF) transcription factor gene family. **Developmental Dynamics**, Chichester, v. 239, n. 6, p. 1879-1887, 2010.
- ARBILLY, M.; PISANTÉ, A.; DEVOR, M.; DARVASI, A. An integrative approach for the identification of quantitative trait loci. **Animal Genetics**, Malden, v. 37, p. 7-9, 2006.
- BALL, E.; WANG, S.L. Productivity Growth in US Agriculture. **Agricultural Resources and Environmental Indicators**, 2012 Edition. p. 10, 2012.
- BANERJEE, S.S.; FEINBERG, M.W.; WATANABE, M.; GRAY, S.; HASPEL, R.L.; DENKINGER, D.J.; KAWAHARA, R.; HAUNER, H.; JAIN, M.K. The Krüppel-like Factor KLF2 Inhibits Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ Expression and Adipogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 4, p. 2581-2584, 2003.
- BARON, E.E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (Gallus gallus)**. 2004. p. 96 Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, SP.

BARON, E.E.; LOPES, M.S.; MENDONÇA, D.; DA CÂMARA MACHADO, A. SNP identification and polymorphism analysis in exon 2 of the horse myostatin gene. **Animal Genetics**, Malden, v. 43, n. 2, p. 229-232, 2012.

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.; ROSÁRIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Malden, v. 42, n. 2, p. 117-124, 2011.

BARRETT, J.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, Harvard, v. 21, n. 2, p. 263-265, 2005.

BECKMANN, J.; SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 67, n. 1, p. 35-43, 1983.

BENSON, D.A.; BOGUSKI, M.S.; LIPMAN, D.J.; OSTELL, J. GenBank. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 1-6, 1997.

BERGER, J.; SUZUKI, T.; SENTI, K.-A.; STUBBS, J.; SCHAFFNER, G.; DICKSON, B.J. Genetic mapping with SNP markers in *Drosophila*. **Natural Genetics**. New York, v. 29, n. 4, p. 475-481, 2001.

BIRSOY, K.V.; CHEN, Z.; FRIEDMAN, J. Transcriptional Regulation of Adipogenesis by KLF4. **Cell metabolism**, Cambridge, v. 7, n. 4, p. 339-347, 2008.

BRANDSTRÖM, M.; ELLEGREN, H. The genomic landscape of short insertion and deletion polymorphisms in the chicken (*Gallus gallus*) genome: A high frequency of deletions in tandem duplicates. **Genetics**, Bethesda, v. 176, n. 3, p. 1691-1701, 2007.

BRISKEY, E.J.; CASSENS, R.G.; TEAUTMAN, J. The physiology and biochemistry of muscle as a food. **The physiology and biochemistry of muscle as a food**. San Diego: Academic Press, 1966. p. 257

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

BROSE, K.; BLAND, K.S.; WANG, K.H.; ARNOTT, D.; HENZEL, W.; GOODMAN, C. S.; TESSIER-LAVIGNE, M.; KIDD, T. Slit Proteins Bind Robo Receptors and Have an Evolutionarily Conserved Role in Repulsive Axon Guidance. **Cell**, Cambridge, v. 96, n. 6, p. 795-806, 1999.

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

CABALLERO, A. Developments in the prediction of effective population size. **Heredity**, London, v. 73, n. 6, p. 657-679, 1994.

CAMPOS, R.L.R. **Mapeamento de QTL nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 da galinha doméstica (*Gallus gallus*) que influenciam características de desempenho**. 2007.p 81. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

CAMPOS, R.L.R.; NONES, K.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; PINTO, L.F.B.; AMBO, M.; BOSCHIERO, C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; NINOV, K.; ALTENHOFEN, C.A.B.; SILVA, R.A.M.S.; ROSÁRIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with fatness in a broiler-layer cross. **Animal Genetics**, Malden, v. 40, n. 5, p. 729-736, 2009.

CASTELHANO-BARBOSA, E.C.; GABRIEL, J.E.; ALVARES, L.E.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; COUTINHO, L.L. Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development. **Growth, development, and aging**, Hulls Cove, v. 69, n. 1, p. 3-12, 2005.

CHEN, Z.; LEI, T.; CHEN, X.; ZHANG, J.; YU, A.; LONG, Q.; LONG, H.; JIN, D.; GAN, L.; YANG, Z. Porcine KLF gene family: Structure, mapping, and phylogenetic analysis. **Genomics**, Maryland Heights, v. 95, n. 2, p. 111-119, 2010.

CORTON, J.C.; BROWN-BORG, H.M. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1 in Caloric Restriction and Other Models of Longevity. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, Cary, v. 60, n. 12, p. 1494-1509, 2005.

CROSSLEY, M.; WHITELAW, E.; PERKINS, A.; WILLIAMS, G.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S. H. Isolation and characterization of the cDNA encoding BKLF/TEF-2, a major CACCC-box-binding protein in erythroid cells and selected other cells. **Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 16, n. 4, p. 1695-705, 1996.

CUI, J.; DU, H.; LIANG, Y.; DENG, X.; LI, N.; ZHANG, X. Association of polymorphisms in the promoter region of chicken prolactin with egg production. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n. 1, p. 26-31, 2006.

DANG, D.T.; ZHAO, W.; MAHATAN, C.S.; GEIMAN, D.E.; YANG, V.W. Opposing effects of Krüppel-like factor 4 (gut-enriched Krüppel-like factor) and Krüppel-like factor 5 (intestinal-enriched Krüppel-like factor) on the promoter of the Krüppel-like factor 4 gene. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 30, n. 13, p. 2736-2741, 2002.

DEKKERS, J. Breeding in the 21st century: application of molecular technology. **Animal Breeding Genetics**, Ames, v. 13, p 1-16, 1999.

DRUMMOND, A.; ASHTON, B.; BUXTON, S.; CHEUNG, M.; COOPER, A.; DURAN, C.; FIELD, M.; HELED, J.; KEARSE, M.; MARKOWITZ, S. **Geneious**, Auckland, v.5, p.4, 2011.

EMARA, M.G.; KIM, H. Genetic markers and their application in poultry breeding. **Poultry Science**, Savoy, v. 82, n. 6, p. 952-957, 2003.

ERKENS, T.; VAN POUCKE, M.; VANDESOMPELE, J.; GOOSSENS, K.; VAN ZEVEEREN, A.; PEELMAN, L. Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with PPARGC1A. **BMC Biotechnology**, London, v. 6, n. 1, p. 41, 2006.

ESTERBAUER, H.; OBERKOFER, H.; KREMPLER, F.; PATSCH, W. Human Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Coactivator 1 (PPARGC1) Gene: cDNA Sequence, Genomic Organization, Chromosomal Localization, and Tissue Expression. **Genomics**, Maryland Heights, v. 62, n. 1, p. 98-102, 1999.

FALCONER, D.S. **Introduction to quantitative genetics**. London: Longman, 1981.p 365

FELÍCIO, A.M. **Identificação de polimorfismos em genes candidatos associados com características de desempenho, carcaça, desenvolvimento muscular e qualidade de carne em Gallus gallus**. 2012.p 96 Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP.

FERREIRA, E. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Ministerio da Agricultura e do Abastecimento [etc.], 1996. 220 Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=MKIUtwAACAAJ> >. Acesso em:11 de setembro de 2012.

FIGUEIREDO, E.; ROSA, P.; SCHEUERMANN, G.; JAENISCH, F.; SCHMIDT, G.; LEDUR, M.; BRENTANO, L.; COSTA, C. Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., 2003. Porto Alegre, RS.**Proceedings of IX World Conference on Animal Production**. Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS.

FIGUEIREDO, E.; SCHMIDT, G.; LEDUR, M.; AVILA, V.; BRUM, P.; FIORENTIN, L.; JAENISCH, F. Genetic gain in egg production and egg weight in White Leghorn Embrapa 011.In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., 2003. Porto Alegre. **Proceedings of IX World Conference on Animal Production**. Porto Alegre, RS.:WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS.

FIGUEIREDO, G. S.; REIS, A. C. M.; CASTRO, A. S. Reação de Sequenciamento de DNA e Purificação - Protocolos Otimizados. **Circular Técnica**. v. 22, n. 1, 2003.

FORNARI, M. B. Investigação de polimorfismos em genes associados ao desenvolvimento ósseo como marcadores moleculares para características de integridade óssea em uma linhagem paterna de frangos de corte. 2012.

FULTON, J. E. Genomic selection for poultry breeding. **Animal Frontiers**, Champaign, v. 2, n. 1, p. 30-36, 2012.

GLYNNE, R.; GHANDOUR, G.; RAYNER, J.; MACK, D.; GOODNOW, C. B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. **Immunological reviews**. Malden: v. 176, p. 216, 2000.

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

GREEN, P. **Documentation for phrap**. Genome Center: University of Washington 1994.

GRIFFITHS, A. J. F.; MOTTA, P. A. **Introdução à genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. ISBN 9788527714976 8527714973.

GUIMARÃES, P.; COSTA, M. SNPs: sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciencia & Desenvolvimento** Uberlandia: v. 26, p. 24-27, 2002.

HALDAR, S. M.; IBRAHIM, O. A.; JAIN, M. K. Kruppel-like Factors (KLFs) in muscle biology. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. Camden: v. 43, n. 1, p. 1-10, 2007.

HALEY, C. Advances in quantitative trait locus mapping. **From Jay Lush to Genomics: Visions for animal breeding and genetics**. p. 47-59, 1999.

HAVENSTEIN, G.; FERKET, P.; QURESHI, M. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**. Savoy: v. 82, n. 10, p. 1509-1518, 2003a.

_____. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, Savoy: v. 82, n. 10, p. 1500-1508, 2003b.

HILLIER, L.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R.; PONTING, C.; BORK, P.; BURT, D.; GROENEN, M.; DELANY, M. International Chicken Genome Sequencing Consortium: Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**. London: v. 432, n. 7018, p. 69-716, 2004.

HIMEDA, C. L.; RANISH, J.A.; PEARSON, R.C.M.; CROSSLEY, M.; HAUSCHKA, S. D. KLF3 Regulates Muscle-Specific Gene Expression and Synergizes with Serum Response Factor on KLF Binding Sites. **Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 30, n. 14, p. 3430-3443, 2010.

HOLMES, G.; NISWANDER, L. Expression of slit-2 and slit-3 during chick development. **Developmental Dynamics**, Hoboken, v. 222, n. 2, p. 301-307, 2001.

HUNTON, P. Industrial breeding and selection [in poultry]. **Developments in Animal And Veterinary Sciences**, Amsterdam, v. 22, p. 985-1028, 1990.

IKEOBI, C.; WOOLLIAMS, J.; MORRICE, D.; LAW, A.; WINDSOR, D.; BURT, D.; HOCKING, P. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. **Animal Genetics**, Malden, v. 33, n. 6, p. 428-435, 2002.

JACOBS, P.S. PHRED: A generator for natural language interfaces. **Computational Linguistics**, Cambridge, v. 11, n. 4, p. 219-242, 1985.

JAMES, D.E.; BROWN, R.; NAVARRO, J.; PILCH, P. F. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. **Nature**, London, v. 133, p 183-185, 1988.

JORGE, E.C.; FIGUEIRA, A.; LEDUR, M.C.; MOURA, A S.A.M.T.; COUTINHO, L.L. Contributions and perspectives of chicken genomics in Brazil: from biological model to export commodity. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 63, n. 4, p. 597-610, 2007.

KAUFMAN, J.; MILNE, S.; GÖBEL, T.W.F.; WALKER, B.A.; JACOB, J.P.; AUFRAY, C.; ZOOROB, R.; BECK, S. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex. **Nature**, London, v. 401, n. 6756, p. 923-925, 1999.

KIDD, T.; BLAND, K.S.; GOODMAN, C.S. Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in Drosophila. **Cell**, Cambridge, v. 96, n. 6, p. 785-794, 1999.

KIM, T.; CHOI, B.; LEE, H.; PARK, H.; LEE, H.; YOON, D.; LEE, J.; JEON, G.; CHEONG, I.; OH, S. Identification of quantitative traits loci (QTL) affecting growth traits in pigs. **Asian Australasian Journal Of Animal Sciences**, Seoul, v. 18, n. 11, p. 1524, 2005.

KWOK, P.Y.; GU, Z. Single nucleotide polymorphism libraries: Why and how are we building them? **Molecular Medicine Today**, London, v. 5, n. 12, p. 538-543, 1999.

LARKINA, T.; SAZANOVA, A.; FOMICHEV, K.; BARKOVA, O.; SAZANOV, A.; MALEWSKI, T.; JASZCZAK, K. Expression profiling of candidate genes for abdominal fat mass in domestic chicken *Gallus gallus*. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v. 47, n. 8, p. 1012-1015, 2011.

LARKINA, T.A.; SAZANOVA, A.L.; FOMICHEV, K.A.; BARKOVA, O.Y.; MALEWSKI, T.; JASZCZAK, K.; SAZANOV, A A. HMG1A and PPARG are differently expressed in the liver of fat and lean broilers. **Journal of Applied Genetics**, Heidelberg, v. 52, n. 2, p. 225-228, 2011.

LEDUR, M.C. Genoma do frango–Mapeamento de QTL. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2001. Piracicaba, SP **Proceedings Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Piracicaba, SP. 2001.p 1-9

LEDUR, M.C.; NONES, K.; ALVES, HJ.; BERTANI, G. R. A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004 Campo Grande, MS. **Proceedings Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. 2004. Campo Grande, MS. p. 379-389

LIANG, Y.; ANNAN, R.S.; CARR, S.A.; POPP, S.; MEVISSEN, M.; MARGOLIS, R. K.; MARGOLIS, R.U. Mammalian Homologues of the Drosophila Slit Protein Are Ligands of the Heparan Sulfate Proteoglycan Glypican-1 in Brain. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 274, n. 25, p. 17885-17892, 1999.

MACKAY, T.F.C. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Review Of Genetics**, Palo Alto, v. 35, n. 1, p. 303-339, 2001.

MENDES, A.A. Avicultura Brasileira: avanços, gargalos e desafios. In: CONFERENCIA FACTA 2010 DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2010.Santos,SP. **Proceedings Anais da Conferência FACTA de Ciência e Tecnologia Avícolas** Santos, SP, 2010.p.123-138.

MORAES, V.G.; CAPANEMA, L. A genética de frangos e suínos—a importância estratégica de seu desenvolvimento para o Brasil. **Agroindústria BNDS**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 119-154, 2012

MORI, T.; SAKAUE, H.; IGUCHI, H.; GOMI, H.; OKADA, Y.; TAKASHIMA, Y.; NAKAMURA, K.; NAKAMURA, T.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; KADOWAKI, T.; MATSUKI, Y.; OGAWA, W.; HIRAMATSU, R.; KASUGA, M. Role of Krüppel-like Factor 15 (KLF15) in Transcriptional Regulation of Adipogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 280, n. 13, p. 12867-12875, 2005.

MOURA, A.; BOSCHIERO, C.; CAMPOS, R.; AMBO, M.; NONES, K.; LEDUR, M.; ROSARIO, M.; MELO, C.; BURT, D.; COUTINHO, L. Mapping QTL for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13.In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 2006. Belo Horizonte, MG. **Proceedings 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production** Belo Horizonte, MG, 2006. p. 1-4

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

NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MELO, C.M.R.; MOURA, A.S. A.M.T.; ZANELLA, E.L.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Malden, 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.; BOSCHIERO, C.; BURT, D. W.; COUTINHO, L. L. Quantitative trait loci associated with chemical composition of the chicken carcass. **Animal Genetics**,Malden, v. 43, n. 5, p. 570-576, 2012.

OISHI, Y.; MANABE, I.; TOBE, K.; TSUSHIMA, K.; SHINDO, T.; FUJII, K.; NISHIMURA, G.; MAEMURA, K.; YAMAUCHI, T.; KUBOTA, N.; SUZUKI, R.; KITAMURA, T.; AKIRA, S.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R. Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 1, n. 1, p. 27-39, 2005.

PAPACHRISTOU, C.; LIN, S. A comparison of methods for intermediate fine mapping. **Genetic Epidemiology**, Hoboken, v. 30, n. 8, p. 677-689, 2006.

PATTHY, L. Intron-dependent evolution: preferred types of exons and introns. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 214, n. 1, p. 1, 1987.

PEARSON, R.C.M.; FUNNELL, A.P.W.; CROSSLEY, M. The mammalian zinc finger transcription factor Krüppel-like factor 3 (KLF3/BKLF). **IUBMB Life**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 86-93, 2011.

PEIXOTO, J.O.; SAATKAMP, M.G.; TESSMANN, A.L.; PEREIRA, E.A.; FIGUEIREDO, D.P.M.; LEDUR, M.C. Avaliação genética de características de desempenho em população referência para validação de estudos genômicos em frango de corte. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL, 8., 2010. Maringá, PR **Proceedings Anais do Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal** Maringá, PR , 2010.p 1-3

PEIXOTO, J.O.; TESSMANN, A.L.; SAATKAMP, M.G.; PRADO, D.; MUNARI, M.C. L. **População referência para validação de estudos genômicos e descoberta de genes em frango de corte.** In: 48ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010. Maringá, PR **Proceedings Anais da Sociedade Brasileira de Zootecnia** Maringá, PR , 2010.p 1-3

PÉREZ-ENCISO, M.; MISZTAL, I. Qxpak: a versatile mixed model application for genetical genomics and QTL analyses. **Bioinformatics**, Harvard, v. 20, n. 16, p. 2792-2798, 2004.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P.D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, Chichester, v. 546, n. 3, p. 851-858, 2003.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M.A.R.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; DE BAKKER, P.I.W.; DALY, M.J. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **The American Journal of Human Genetics**, Cambridge, v. 81, n. 3, p. 559-575, 2007.

QUELLER, D.C.; STRASSMANN, J.E.; HUGHES, C.R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v. 8, n. 8, p. 285-288, 1993.

REGITANO, L.C.D.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos, SP: EMBRAPA, 2001. p. 215

ROSÁRIO, M.F.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; 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, 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.; 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 and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1357-1376, 2010.

ROSÁRIO, M.F.D.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; 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, v. 66, p. 150-158, 2009.

ROTHBERG, J.M.; HARTLEY, D.A.; WALTHER, Z.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. slit: An EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. **Cell**, Cambridge, v. 55, n. 6, p. 1047-1059, 1988.

ROTHBERG, J.M.; JACOBS, J.R.; GOODMAN, C.S.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. slit: an extracellular protein necessary for development of midline glia and commissural axon pathways contains both EGF and LRR domains. **Genes & Development**, Woodbury, v. 4, n. 12a, p. 2169-2187, 1990.

RUY, D.; ASAMT, M.; NONES, K.; BARON, E.; LEDUR, M.; CAMPOS, R.; AMBO, M.; MELO, C.; COUTINHO, L. Detection of QTL for performance, fatness and carcass traits on chicken chromosomes 3 and 5. XI QTLMAS, 2007. Toulouse,

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: CSHL press, 2001.p 64380

SHORT, T.H.; ROTHCHILD, M.F.; SOUTHWOOD, O.I.; MCLAREN, D.G.; DE VRIES, A.; VAN DER STEEN, H.; ECKARDT, G.R.; TUGGLE, C.K.; HELM, J.; VASKE, D.A.; MILEHAM, A.J.; PLASTOW, G.S. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, n. 12, p. 3138-3142, 1997.

SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from Chicken Genetics to the Chicken Genome. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n. 12, p. 2050-2060, 2006.

SOUZA, J. **Sonho, desafio e tecnologia**: Concórdia (SC): Embrapa Suínos e Aves 2011.p 36

STACHOWIAK, M.; SZYDLOWSKI, M.; CIESLAK, J.; SWITONSKI, M. SNPs in the porcine PPARGC1a gene: Interbreed differences and their phenotypic effects. **Cellular & Molecular Biology Letters**, Wroclaw, v. 12, n. 2, p. 231-239, 2007.

STERN, C. The Hardy-Weinberg law. **Science**, New York, v. 97, p. 137-138, 1943.

SUE, N.; JACK, B.H.A.; EATON, S.A.; PEARSON, R.C.M.; FUNNELL, A.P.W.; TURNER, J.; CZOLIJ, R.; DENYER, G.; BAO, S.; MOLERO-NAVAJAS, J.C. Targeted disruption of the basic Krüppel-like factor gene (Klf3) reveals a role in adipogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 28, n. 12, p. 3967-3978, 2008.

SUWA, M.; NAKANO, H.; RADAK, Z.; KUMAGAI, S. Endurance exercise increases the SIRT1 and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α protein expressions in rat skeletal muscle. **Metabolism: clinical and experimental**, Maryland Heights, v. 57, n. 7, p. 986-998, 2008.

TURCHINOVICH, G.; VU, T.T.; FROMMER, F.; KRANICH, J.; SCHMID, S.; ALLES, M.; LOUBERT, J.-B.; GOULET, J.-P.; ZIMMER-STROBL, U.; SCHNEIDER, P.; BACHL, J.; PEARSON, R.; CROSSLEY, M.; AGENÈS, F.; KIRBERG, J. Programming of marginal zone B-cell fate by basic Krüppel-like factor (BKLF/KLF3). **Blood**, Washington, v. 117, n. 14, p. 3780-3792, 2011.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura e Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de frangos. 2010/2011, p 72(Relatório anual)

UEDA, M.; WATANABE, K.; SATO, K.; AKIBA, Y.; TOYOMIZU, M. Possible role for avPGC-1 α in the control of expression of fiber type, along with avUCP and avANT mRNAs in the skeletal muscles of cold-exposed chickens. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 1, p. 11-17, 2005.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275 - 305, 2002.

WEIKARD, R.; KÜHN, C.; GOLDAMMER, T.; FREYER, G.; SCHWERIN, M. The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 21, n. 1, p. 1-13, 2005.

WICKS, S.R.; YEH, R.T.; GISH, W.R.; WATERSTON, R.H.; PLASTERK, R.H.A. Rapid gene mapping in *Caenorhabditis elegans* using a high density polymorphism map. **Nature Genetics**, New York, v. 28, n. 2, p. 160-164, 2001.

WONG, G.K.S.; LIU, B.; WANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Z.; MENG, Q.; ZHOU, J.; LI, D.; ZHANG, J. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. **Nature**, London, v. 432, n. 7018, p. 717-722, 2004.

WRAGG, D.; MWACHARO, J.M.; ALCALDE, J.A.; HOCKING, P.M.; HANOTTE, O. Analysis of genome-wide structure, diversity and fine mapping of Mendelian traits in traditional and village chickens. **Heredity**, London, v. 109, p. 6-18, 2012.

WU, G.Q.; DENG, X.M.; LI, J. Y.; LI, N.; YANG, N. A potential molecular marker for selection against abdominal fatness in chickens. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n. 11, p. 1896-1899, 2006.

ZHANG, J.; BAKHEET, R.; PARHAR, R.S.; HUANG, C.-H.; HUSSAIN, M.M.; PAN, X.; SIDDIQUI, S.S.; HASHMI, S. Regulation of Fat Storage and Reproduction by Krüppel-Like Transcription Factor KLF3 and Fat-Associated Genes in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 411, n. 3, p. 537-553, 2011.

ZHANG, S.; LI, H.; SHI, H. Single marker and haplotype analysis of the chicken apolipoprotein B gene T123G and D9500D9-polymorphism reveals association with body growth and obesity. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, n. 2, p. 178-184, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - MÉTODO RÁPIDO DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA EXTRAÇÃO COM SAL

Protocolo modificado para extração de DNA de sangue de galinha

1. Misturar 50µL de sangue total colhido em EDTA com 1mL de tampão de lise de células vermelhas;
2. Centrifugar por 1 minuto a 13000rpm. Descartar o sobrenadante. Repetir o passo 1 e 2 (repetimos por 4 vezes).
3. Lavar o pellet uma vez com 0,5mL de água destilada (13000 rpm, 1min);
4. Ressuspender o pellet em 80 µL do tampão de proteinase K (5x), 7 µL de proteinase K (20mg/ml), 10 µL de SDS 20% e 282 µL de água destilada.
5. Incubar a 55°C por 1 hora;
6. Adicionar 120 µL de NaCl 5M e agitar no vortex por 15 segundos. Centrifugar a 13000 rpm por 5min.
7. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e adicionar 1 mL de etanol absoluto. Homogeneizar e centrifugar por 5 minutos a 13000 rpm.
8. Descartar o sobrenadante, secar o pellet, ressuspender em 100 µL H₂O UP e dissolver passando no vortex por 30 segundos.

Tampão de Lise

0,32M sucrose

12mM Tris-HCl pH7,5

5mM MgCl₂

1% Triton X

Tampão de Proteinase K (5x)

0,375M NaCl

0,12M EDTA (pH 8.0)

APÊNDICE B - PROTOCOLO PURIFICACAO PCR PARA SEQUENCIAMENTO AGENCOURT® AMPURE® XP

1. Colocar 10µl de PCR no uma placa
2. Agite suavemente o frasco de Agencourt AMPure XP para ressuspender as partículas magnéticas que possam ter precipitado. (Geladeira Lab Central)
3. Adicionar 18 ul de Agencourt AMPure XP acordo com a tabela abaixo.

PCR Reaction Volume (µL)	AMPure XP Volume (µL)
10	18
20	36
50	90
100	180

O volume de Agencourt AMPure XP para uma determinada reação pode ser derivado da seguinte equação: (Volume de Agencourt AMPure XP por reação)
 $= 1,8 \times (\text{Volume Reaction})$

4. Misturar a reação 10X usando uma micropipeta. Deixe as amostras misturadas 5 minutos em temperatura ambiente para a recuperação máxima. Esta etapa liga os produtos PCR 100bp e maiores às esferas magnéticas. Misturar com a micropipeta é preferível pois tende a ser mais eficaz. A cor da mistura deverá aparecer marrom depois da mistura homogênea.
5. A partir deste passo até o passo 7 fazer na placa magnética. Coloque a placa de reação em uma Super Placa Magnética (Agencourt SPRIPlate 96) por 2 minutos para separar esferas da solução. Nesse momento as esferas se ligam a placa magnética formando uma bolinha, deixando a solução límpida.
6. Descarte o sobrenadante cuidadosamente sem tocar nas esferas, elas não devem ser descartadas. Se for difícil a separação, deixe alguns microlitros para o próximo passo.
7. Pipetar 200 mL de etanol 70% em cada poço da placa de reação e incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Descartar o etanol cuidadosamente sem tocar nas esferas.
8. Repita o passo 7 para um total de duas lavagens. Nesse é importante retirar todo o sobrenadante.

9. Retirar da placa de reação da placa magnética secando à temperatura ambiente por aproximadamente (15' – 30') até secar completamente.
10. Ressuspender as amostras em 12 ul água mili Q, misturando com a pipeta 10X até que a solução fique de cor marrom.
11. Coloque a placa de reação na placa magnética por 2 minutos para separar esferas da solução.
12. Transferir somente 10 ul do sobrenadante límpido para uma nova placa, com cuidado para não pegar as esferas junto.
13. Aplicar 1 ul das amostras no gel de agarose a 1%, usando 2 ul do marcador de peso molecular (Low mass ladder-Invitrogen), para visualização e quantificação do produto de PCR purificado.
14. Armazenar a -20°C.

Materiais:

1. Produto PCR.
2. Agencourt AMPure XP.(PN A63881- marca Beckman Coulter- Representante Esalab)
3. Placa Agencourt SPRIPlate 96 Super Placa Magnet. (PN AM10027- Ambion – Life tech)
4. Ethanol 70% Merck
5. Micropipeta multicanal P10/P50/P300.
6. Ponteira P10 e P200
7. Placa PCR
8. Gel de agarose
9. Marcador de peso molecular Low Mass Ladder(Invitrogen N. cat. 10068-013)

ANEXOS

ANEXO A - PROTOCOLO SEQUENCIAMENTO DE DNA – LABORATÓRIO MULTIUSUÁRIO – ALUNOS LBA

- 1- Quantificar DNA em (ng), aplicando 1ul do produto de PCR no gel e aplicando 2ul de Low Mass Ladder como padrão, comparando a intensidade de banda.

2-

A) REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Data___/___/___

Usuário_____

Reagentes Mix		1X	___X
Tampão 5x ABI (Sala Genoma)		1 µL	
BigDye v3 (Sala Genoma)		0,5 µL	
Primer (5 pmol/ul) (aluno)		1 µL	
2.1.3.4.2 Sub total		2,5µ l	
Água MQ (aluno)	Y	___ µL	
2.1.3.4.3 DNA (aluno) - consultar gráfico	X	___µL	
	Total	10 uL	

* Sempre sequenciar 1 amostra do PGEM como controle positivo do seu sequenciamento.

- 1) Faça o cálculo do seu mix. Identifique sua placa na borda (ex: Debora Placa 1)
***Identificação da placa somente na borda. Nunca risque a placa com caneta para marcar as posições, isso pode comprometer o capilar.
- 2) Retire os reagentes para descongelar e mantenha-os no gelo. Deixar o Big Dye no freezer só retire na hora de usar.
- 3) Preparar o mix usando as micropipetas para mix de PCR (Armário Lab. Central) com ponteira com barreiras para evitar a contaminação dos reagentes. Agite bem no vortex e de um Spin.
- 4) Distribuir o mix na placa. Pode usar uma micropipeta comum. Nesse momento se for o mesmo primer pode usar a mesma ponteira. A distribuição na placa é por coluna e não por linha.
- 5) Distribuir o DNA não esquecendo de trocar as ponteiras para não contaminar as amostras (Gráfico 1).
- 6) Cubra a placa com o tapete para placa 96PCR e a leve ao termociclador.

Programa no Termociclador : Seq- Appli – (duração 2h e 23 min)

1	Step 1	95°C	1 minuto		Denaturacao
1	Step 2	95°C	15 segundos		Denaturacao
2*	Step 3	50°C	15 segundos	P/todos os primers	Anelamento
3	Step 4	60 °C	2 minutos		Extensão
4	Step 5	Go to Step 2	35 more times		
5	Step 6	4°C	Forever		
End	Step7	End			

Gráfico1 - Concentração de Produtos de PCR ou Plasmídio

É obrigatório anexar foto do gel identificando as amostras. Salvar com fundo branco e bandas pretas.

Nirlei Aparecida Silva
Bióloga _ MSc

ANEXO B - GENOTIPAGEM ABI 3130

Preparo das amostras:

	1X	_____X
Rox 500	0,4 µl	
Hi Di Formamida	8,6 µl	
****PCR	1,0 µl	
	10,0µl	

*Se for usar mais marcadores juntos, usar 0,5 µl de produto de PCR para cada um e tirar na formamida. Conversar com quem estiver genotipando no momento

*Correr 16 amostras para testar a diluição, muitas vezes é necessário diluir até 20X o produto de PCR

- 1- Preparar as amostras de acordo com a tabela acima.
- 2- Desnaturar as amostras em termociclador por 5 minutos a 95 °C. Deixar no gelo 5 minutos.
- 3- Verificar se não tem bolhas. Havendo bolhas dar um spin. Cobrir com alumínio e deixar na geladeira.(Pode ficar até 4 dias na geladeira)
- 4- Preencher o formulário de requisição de serviço de Genotipagem, anexar a foto do gel, colocar na mesa da Nirlei.
- 5- Importante: o resultado será enviado em até 5 dias úteis .Favor aguardar.

Nirlei Aparecida Silva
Bióloga _ MSc