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

**Testes de associação em região de QTL ligados do cromossomo 1
da galinha doméstica**

Dênia Borges Attílio

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

**Piracicaba
2014**

Dênia Borges Attílio
Médica Veterinária

**Testes de associação em região de QTL ligados do cromossomo 1 da
galinha doméstica**

Orientador:
Prof. Dr. **MILLOR FERNANDES DO ROSÁRIO**

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

Piracicaba
2014

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

Attílio, Dênia Borges

Testes de associação em região de QTL ligados do cromossomo 1 da galinha doméstica /
Dênia Borges Attílio. - Piracicaba, 2014.
124 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Avicultura 2. Carcaça 3. Chip 4. Desempenho 5. Genômica 6. SNP I. Título

CDD 636.5082
A885t

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

Aos meus queridos e amados pais **Paulina e João**,
Agradeço por terem me dado a oportunidade da vida, por todo o amor,
paciência, incentivo, conselhos, exemplos e por estarem sempre ao meu lado,
apoando o meu crescimento moral-espiritual. Aos meus queridos e irmãos
Allan e Lísia, pela compreensão, amizade, auxílio e sempre serem meus
queridos!

DEDICO

Ao meu querido namorado **Gustavo Mostaço**,
pela incansável paciência, compreensão e ajuda,
pelo seu carinho, amor e dedicação.
Obrigada por me fazer feliz!

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Primeiramente a **Deus**, que me confiou esta encarnação para que eu pudesse resgatar meus erros, aprender a perdoar e a praticar a caridade. Ele que me proporcionou dificuldades e também auxílio ao longo deste mestrado, permitindo que este trabalho ocorresse na mais perfeita paz e harmonia. Todas as etapas serviram de aprendizado.

Não poderia esquecer jamais, de incluir aqui meus sinceros agradecimentos aos **Amigos e Mentores Espirituais** que tanto me auxiliaram, aconselharam e intuíram em momentos difíceis. Fazendo-me compreender que tudo na vida tem uma razão, nada é por acaso, que tudo é passageiro. Agradeço a paciência, persistência, conselhos. Agradeço pela vibração de paz e por não desistirem de mim.

Agradeço aos meus avós **José Attílio** (*in memoriam*) e **Oteniza Cândida Borges** (*in memoriam*), que sempre nos ofereceu o seu sublime amor, carinho, compreensão, conselhos e exemplos. Agradeço pela convivência, ensinamentos e por serem tão especiais. Até breve!

AGRADECIMENTOS

À **Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"** (ESALQ/USP) pela oportunidade de realizar este trabalho e por proporcionar tantas alegrias.

Ao amigo e orientador professor Dr. **Millor Fernandes do Rosário**, que me aceitou de braços abertos, auxiliando-me do início ao fim, sem cessar, com toda a paciência e dedicação. Agradeço por todos os prestimosos conselhos e ensinamentos, pelo incentivo, pela confiança em mim depositada e por sempre estar presente. Muito obrigada pela incansável ajuda!

Ao professor Dr. **Luiz Lehmann Coutinho** (ESALQ/USP) por toda sua contribuição, auxílio, apoio e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho. E também pelos valiosos ensinamentos durante o meu período de Práticas Profissionalizantes e monitoria junto ao programa PAE.

À professora Dra. **Maria Rita dos Santos e Passos-Bueno** (IB/USP) pela grande e inestimável ajuda com o equipamento *BeadXpress* para a genotipagem com o chip customizado bem como seu orientado, o amigo **Luciano Abreu Brito**, que com toda a paciência e dedicação auxiliou-me nesta etapa, pela discussão dos resultados e conselhos.

À pesquisadora Dra. **Mônica Côrrea Ledur**, da Embrapa Suínos e Aves, pela disponibilidade do material genético e fenotípico.

Ao professor Dr. **Antonio Augusto Franco Garcia** (ESALQ/USP) juntamente com o Dr. **Rodrigo Gazaffi** por todos os conselhos, auxílios, contribuições e direcionamentos para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão das bolsas de estudo.

Agradeço as amigas que fiz no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ: **Fabiane Silva, Andreza Felício, Clarissa Boschiero, Lilian Rezende, Minos Carvalho, Gabriel Costa, Priscilla Marqui, Gabriela Fuini, Aline César, Milla Albuquerque, Thaís Godoy, Vinícius Henrique, Luíza Longo, Fábio Pértile, Sonia Andrade e Tássia Mangetti** por todos os momentos de descontrações, instruções, risadas e distrações.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ: **Nirlei Silva, Jorge Andrade** pelo convívio, e ao **Ricardo Brassaloti** por toda ajuda e colaboração na etapa de genotipagem com o *Beadchip*.

Ao "paciente" amigo **Gustavo Gasparin**, que nunca deixou de me orientar, aconselhar-me e por que não, zoar bastante de mim... (rsrsrs)

Aos amigos **Giovani Ducatti, Andressa Ducatti, Marcela Páduan, Juliana Petrini, Letícia Trevizan, Rafaela Naves, Thaline Pachelli**, as colombianas **Juliana Cuetia e Susan Castro** pela ajuda, colaboração, momentos de alegria, decisões e pela valiosa amizade!

Aos meus queridos e amados:

Meus pais **João Attílio** e **Paulina Attílio** pela motivação, conselhos, amor e exemplos. Sempre apoiando e incentivando a seguir meu coração para realização de meus sonhos. Vocês são meu bem maior, minha vida!

Meus queridos irmãos **Allan Attílio** e **Lísia Attílio** pelo carinho, amizade, dedicação e paciência, o que me permitiu chegar até aqui.

Meus queridos cunhados **Castellane Ferreira**, **Carla Cristina** e **Gabriel Mostaço** por todo apoio e incentivo.

Minha amiga **Elisângela Dupas** pelos conselhos e ajuda em momentos de dúvida de pós-graduação, carreiras, etc. Por todos os anos vividos em Ilha Solteira e Piracicaba.

Minha sorridente sobrinha **Anita** que com sua alegria contagiante deu-me forças e motivos para continuar minha caminhada nesta vida.

Meus sogros **Nelson Mostaço** e **Nilza Mostaço** pelos valiosos conselhos, dedicação, orientação e carinho. Agradeço pela paciência e compreensão em meus momentos de silêncio e preocupação com meu experimento. Vocês são especiais!

Meu namorado **Gustavo Mostaço**, que incansavelmente, ajudou-me em praticamente todas as etapas do meu mestrado. Todas as noites que passamos no laboratório extraindo DNA, diluindo, quantificando, fazendo géis que não acabavam mais. Em meus momentos de desespero e lágrimas, quantas vezes passamos noites em claro tentando entender determinados artigos. Meu Gustavinho, meu porto seguro, quem nunca deixou de segurar minha mão e dizer: "Juntos vamos vencer mais esta etapa". Seu apoio foi de grande importância nesta fase de minha vida. Muito obrigada por todo seu amor, carinho, compreensão. Obrigada pela felicidade proporcionada e, por simplesmente existir!

Meu querido cachorro **Scobby** pela companhia, carinho, amizade e compreensão. Mesmo tendo destruído vários botões de minhas blusas, sua presença foi essencial para alegrar-me com suas travessuras.

A todos, muito obrigada! :)

"Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem.
Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo."
(Walter S. Landor)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Avicultura e sua importância.....	21
2.2 Genômica avícola e suas contribuições.....	22
2.3 Mapeamento de QTL.....	25
2.4 SNPs e desequilíbrio de ligação	27
2.5 Mapeamento associativo	28
2.6 Contribuição brasileira à genômica avícola	32
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 População experimental	37
3.1.1 Seleção dos animais F_2	38
3.2 Características fenotípicas.....	40
3.2.1 Modelagem fenotípica.....	41
3.3 Organização das amostras de DNA.....	43
3.3.1 Extração de DNA.....	44
3.4 Seleção da região alvo	46
3.5 Genotipagem dos Parentais e F_1	48
3.5.1 Etapas da genotipagem empregando a tecnologia <i>Beadchip</i> 60k	48
3.6 Seleção dos SNPs mais informativos	54
3.7 Genotipagem da geração F_2	57
3.7.1 Etapas da genotipagem empregando a tecnologia <i>BeadXpress</i>	57
3.8 Construção dos blocos de haplótipos	62
3.9 Testes de associação	63
3.10 QTL e genes candidatos.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Fenótipos	65
4.2 Modelagem fenotípica.....	66
4.3 Correlação fenotípica.....	68
4.4 Seleção da região alvo	71
4.5 Descrição dos SNPs na região alvo.....	73
4.6 Seleção e descrição dos 144 SNPs mais informativos	76
4.7 Genotipagem da geração F_2	79
4.8 Blocos de haplótipos.....	82
4.9 Testes de associação	89
4.10 QTL e genes candidatos.....	97
5 CONCLUSÕES.....	103
REFERÊNCIAS.....	105

RESUMO

Testes de associação em região de QTL ligados do cromossomo 1 da galinha doméstica

Atualmente, o Brasil é considerado o maior exportador mundial e terceiro maior produtor mundial de carne de frango. Este destaque é resultado, principalmente, do melhoramento animal baseado na estimação do valor genético a partir da mensuração de fenótipos e informações de *pedigree*. Entretanto, é comum que a seleção não seja feita para cada característica isoladamente devido à correlação genética entre elas. Esta correlação tem como causas a pleiotropia ou a ligação genética. Com este trabalho objetivou-se detectar associações entre características fenotípicas de interesse para a avicultura e SNPs em uma região do cromossomo 1 (168 – 208 cM e 57 – 71 Mbp), onde possíveis QTL ligados foram previamente mapeados. Utilizou-se o *Beadchip* de SNPs de 60k para genotipar 14 animais da geração Parental (machos TT e fêmeas CC) e 28 F₁ da população TCTC desenvolvida pela Embrapa Suínos e Aves. A linhagem TT apresentou maior variabilidade genotípica que CC, porém, os F₁ foram superiores às linhagens Parentais com base no número de heterozigotos e MAF. O polimorfismo com maior ocorrência em ambas as gerações foram as transições com 84,3%. Foram selecionados 144 SNPs mais informativos com base na heterozigosidade dos cinco casais F₁ que geraram os 453 F₂. Houve redução de heterozigotos e MAF em F₂, em função da média de F₁, decorrente de certo grau de parentesco e endogamia entre os animais que compuseram esta geração. Os blocos de haplótipos construídos demonstraram que os machos TT apresentaram 25 blocos, fêmeas CC (17), F₁ (32) e F₂ (23) com tamanho médio de 278, 467, 242 e 160 kpb, respectivamente. Foi evidenciado que 236 (42,7%) correlações fenotípicas foram significativas, das quais o maior número constatado foi entre PB_MS e outras 17 características e, o maior valor estimado foi entre PB_MS e EE_MS (-0,90). Do total esperado de 3.456 testes de associação, 609 (17,6%) foram considerados significativos ($p < 0,05$), sendo 424 (69,6%) com efeito aditivo e 185 com efeito de dominância (30,4%). PV41 apresentou maior número de associações (123), enquanto DOR não foi associado a nenhum SNP. Proporcionalmente, o maior número de SNPs foi associado próximo ao QTL pleiotrópico 2 para 17 características. Já os maiores níveis de significância ($p < 9,59 \times 10^{-8}$) para o efeito aditivo foram evidenciados para SNPs localizados próximos ao QTL pleiotrópico 1 e associados somente com PV41, a saber: *Gga_rs13869715* (A<C), *Gga_rs13870613* (T<C), *Gga_rs14827719* (A<G), *GGaluGA019336* (T<C) e *GGaluGA019533* (A<C). Foram detectadas associações ainda não descritas na literatura para GP3541, CA3541, INT, PES, CAB, FIG, COR, MOE, PUL, HEM, COL, TRI, TC, PB_MS, EE_MS, CZ_MS. Finalmente, foram indicados possíveis genes candidatos posicionais e funcionais, tais como, *IGF1*, *MYBPC1*, *MTPN*, *SOX-5*, *FGFR1OP2* e *TTLL12* que poderão ser empregados na análise de expressão gênica.

Palavras-chave: Avicultura; Carcaça; Chip; Desempenho; Genômica; SNP

ABSTRACT

Association tests on linked-QTL region of chicken chromosome 1

Actually, Brazil is considered the world's first- and third-biggest exporter and producer of poultry meat, respectively. These performances are mainly consequence of animal breeding based on the estimation of breeding value combining phenotypes and pedigree information. However, usually the selection is not carried out for each trait separately due to genetic correlation between them. This correlation is caused by pleiotropy or linkage. We aimed to detect associations between phenotypic traits of interest to poultry industry and SNPs on a region of chromosome 1 (168 - 208 cM and 57 - 71 Mbp), where putative linked-QTL were previously mapped. A chicken 60k SNP *BeadChip* was used to genotype 14 animals from Parental generation (TT males and CC females) and 28 F₁ of the TCTC population that was developed by Embrapa Swine and Poultry. The TT line showed greater genotypic variability than CC, however, F₁ were higher than Parental generation based on the number of heterozygotes and MAF. The polymorphism more frequent in both generations was the transitions with 84.3%. The 144 most informative SNPs were selected based on heterozygosity of the five F₁ couples which generated the 453 F₂. There was a reduction of heterozygotes and MAF in F₂, based on the F₁ mean value, as consequence of some degree of relationship and inbreeding between animals that formed this generation. Haplotype blocks demonstrated that the TT males showed 25 blocks, CC female (17) F₁ (32) and F₂ (23) with an average size of 278, 467, 242 and 160 kbp, respectively. It was observed that 236 (42.7%) phenotypic correlations were significant. Out of these, the highest number was found between PB_MS and other 17 traits and the highest estimated value was between PB_MS and EE_MS (-0.90). Out of 3,456 expected association tests, 609 (17.6 %) were considered significant ($p < 0.05$), being 424 (69.6%) with additive effect and 185 with dominance effect (30.4%). PV41 presented the highest number of associations (123), while DOR was not associated to any SNP. Proportionally, the highest number of SNPs was associated close to the pleiotropic QTL 2 with 17 traits. On the other hand, the highest significance levels ($p < 9.59 \times 10^{-8}$) for the additive effect were evidenced for SNPs located close to the pleiotropic QTL 1 and associated only with PV41 (*Gga_rs13869715* (A<C), *Gga_rs13870613* (T<C), *Gga_rs14827719* (A<G), *GGaluGA019336* (T<C) and *GGaluGA019533* (A<C)). Novel associations were detected for GP3541, CA3541, INT, PES, CAB, FIG, COR, MOE, PUL, HEM, COL, TRI, TC, PB_MS, EE_MS, CZ_MS when we compared our results with literature. Finally, putative positional and functional candidate genes were indicated such as *IGF1*, *MYBPC1*, *MTPN*, *SOX-5*, *FGFR10P2* and *TTLL12*, which may be used in gene expression analysis.

Keywords: Carcass; Chip; Genomic; Performance, Poultry; SNP

1 INTRODUÇÃO

Os incrementos nos índices econômicos da avicultura têm contribuído para um maior acesso da população mundial à proteína animal. Estes incrementos são decorrentes de algumas características que a galinha doméstica apresenta frente a outros animais de produção, como por exemplo, a maturidade sexual é atingida por volta da 18ª semana de vida (TAKATA et al., 2001), curto intervalo de gerações (7-8 meses) (CABALLERO, 1994) e alta eficiência produtiva (~ 3 kg em 42 dias; 6 ovos em 7 dias). Tais vantagens têm sido aprimoradas pelos programas de melhoramento genético, os quais em conjunto com melhorias no ambiente de criação, promovem uma diminuição no custo da carne de frango e maior acessibilidade ao mercado consumidor (FAO, 2007).

Adicionalmente, a galinha tem sido considerada um organismo modelo para pesquisas nas áreas da genômica, transcriptômica e proteômica animal. Os resultados provenientes destas pesquisas têm contribuído como ferramentas complementares ao melhoramento genético clássico, baseado exclusivamente no fenótipo (BURT, 2002; DEKKERS; HOSPITAL, 2002; DOERGE, 2002; ANDERSSON; GEORGES, 2004; GEORGES, 2007; JORGE et al., 2007; BURT, 2013).

Os programas de melhoramento genético têm quantificado por meio do fenótipo, como as características selecionadas se comportam entre gerações. Dessa forma, por meio da Genética Quantitativa e de Populações, são estimados parâmetros, tais como médias, variâncias genéticas e ambientais, herdabilidades, ganhos com seleção e correlações genéticas, o que apenas possibilita estimar a magnitude desses parâmetros para todos os genes simultaneamente, não sendo possível identificar suas causas individualmente.

É comum ainda que, no processo de melhoramento, a seleção não seja conduzida para cada característica isoladamente, pois é possível que duas características sejam correlacionadas geneticamente. Este fato implica que a seleção destas características não ocorre de forma independente. Na galinha doméstica, as características de desempenho são positivamente correlacionadas com as de carcaça (VAN KAAM et al., 1999) e estas duas, por sua vez, são correlacionadas negativamente com características de reprodução e sanidade

(YONASH et al., 1996). As causas da correlação genética são atribuídas à pleiotropia ou à ligação genética.

Atualmente, duas empresas multinacionais (*Aviagen* e *Cobb-Vantress*) detêm quase que a totalidade da base genética mundial de frangos de corte (SILVA, 2009). Portanto, no Brasil não há programas de melhoramento genético que visem disponibilizar um produto comercial, seja no segmento de corte ou de postura. Consequentemente, as pesquisas mundiais, conduzidas na área de genética e melhoramento avícola, apresentam um objetivo muito mais acadêmico e de geração de conhecimento científico do que de desenvolvimento de um produto comercial, em que este seja competitivo aos genótipos selecionados, multiplicados e comercializados por estas duas companhias.

Apesar de os resultados de pesquisas desenvolvidas pela *Aviagen* e *Cobb-Vantress* não serem acessíveis, é sabido que tais empresas vêm empregando a informação obtida diretamente do DNA, por meio da utilização de chips de SNPs. Esta estratégia é resultado de avanços de genotipagem em larga escala e de parcerias entre estas empresas e instituições de ensino e pesquisa.

Assim, em decorrência da parceria entre a *Illumina*[®], *Wageningen University, USA*, *Hendrix-Genetics* e *Cobb-Vantress* foi desenvolvido um chip contendo 60 mil SNPs (GROENEN et al., 2011). Outro exemplo ocorreu entre *Roslin Institute* (Escócia), *Affymetrix*, *Aviagen*[™] *Group* e *Hy-line International*, que desenvolveram um chip contendo 600 mil SNPs segregantes em diferentes populações de frango (KRANIS et al., 2013).

Esta nova forma de obtenção de dados genotípicos têm permitido uma revolução na área da genômica avícola, pois é capaz de detectar ao longo do genoma milhares de SNPs em um curto período de tempo e a preço acessível. Dessa forma, estratégias de mapeamento associativo e seleção genômica podem ser efetivamente implementadas.

OBJETIVO GERAL

Detectar associações entre características de interesse para a avicultura e SNPs por meio da saturação com este tipo de marcador de uma região do cromossomo 1 (GGA1), onde possíveis QTL ligados foram previamente mapeados por Rosário et al. (2012).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir da definição do objetivo geral, foi possível propor os seguintes objetivos específicos:

- (i)** Selecionar uma região alvo do GGA1 com base em dois possíveis QTL ligados, previamente mapeados e associados com características de desempenho e carcaça da população TCTC da Embrapa;
- (ii)** Genotipar 14 aves da geração Parental (linhagens TT e CC) e 28 F_1 empregando o chip de 60 k;
- (iii)** Selecionar 144 SNPs mais informativos, a partir do chip de 60 k, posicionados na região alvo a fim de customizar um ensaio com menor densidade de SNPs mais informativos;
- (iv)** Genotipar 453 animais F_2 desta população empregando o ensaio customizado;
- (v)** Descrever e caracterizar fenotipicamente a geração F_2 ;
- (vi)** Descrever e caracterizar genotipicamente as gerações Parental, F_1 e F_2 ;
- (vii)** Construir blocos de haplótipos para as três gerações da população TCTC;
- (viii)** Conduzir testes de associação entre os SNPs mais informativos e as características fenotípicas previamente avaliadas nos animais F_2 .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Avicultura e sua importância

A avicultura mundial, em 2012, produziu 82,3 milhões de toneladas de carne de frango, sendo os Estados Unidos o maior produtor com 16,4 milhões de toneladas, enquanto que a importação mundial de carne de frango foi de 8,5 milhões de toneladas, sendo o Japão o maior importador com 855 mil de toneladas. Neste mesmo ano, o Brasil foi considerado o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, produzindo 12,6 milhões de toneladas, das quais 98% corresponderam a produtos *in natura*, como por exemplo, frango congelado, coxa e sobrecoxa, peito, asas, e o restante a produtos industrializados, tais como salsicha, mortadela, linguiça e carne mecanicamente separada (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA – UBABEF, 2013). Ainda segundo a UBABEF (2013), estima-se que para o ano de 2014, a produção de carne no Brasil deverá crescer 4% ao comparar-se com a produção de 2013. Esta evolução na produtividade avícola indica uma constante melhoria no sistema de produção e nas ferramentas disponíveis aos programas de melhoramento genético (YANG, 1999).

O Brasil vem se destacando no cenário mundial, desde o ano de 2004, quando assumiu a primeira posição no *ranking* de exportações de carne de frango. Em 2012, foram exportadas 3,9 milhões de toneladas de carne de frango (UBABEF, 2013). A avicultura brasileira, atualmente, emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente e representa aproximadamente 1,5% do Produto Interno Bruto nacional (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA - UBABEF, 2013). Este destaque tem sido em parte, decorrência, de o Brasil ser o terceiro e segundo maior produtor mundial de milho e soja, respectivamente (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA, 2012). Estes dois grãos são os componentes principais da alimentação dos frangos, a qual corresponde a aproximadamente 70% dos custos totais de produção.

Outro ponto a favor reside no fato de a carne de frango apresentar uma composição nutricional satisfatória em comparação a outros tipos de carnes. Por exemplo, ao se considerar a carne proveniente de frango inteiro, com pele, sem osso, crua, evidenciam-se 67% de umidade, 226 kcal.100 gramas⁻¹, 16 g de proteínas, 17 g lipídeos e 85 mg de colesterol (<http://www.exgordo.com.br/dicas/tabelaunicamp.htm>, acesso em 22/05/2013). Os preços no atacado também são competitivos, ou seja, R\$ 2,72/kg do frango resfriado e R\$ 2,89/kg do frango congelado. Segundo o CEPEA (2013), houve um aumento no consumo desta carne ao longo dos anos (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA, 2013). O consumo *per capita* de frango dobrou no país no período entre 1994-2012, atingindo 45 kg/hab/ano em 2012 (UBABEF, 2013).

Estes relevantes índices produtivos da avicultura mundial e do Brasil têm sido possibilitados graças aos avanços que ocorreram em diversas áreas como, por exemplo: genética, nutrição, ambiência, manejo, equipamentos e instalações (HUNTON, 1990). Havenstein et al. (2003a, b) demonstraram uma maior contribuição da genética em relação à nutrição. Estes autores avaliaram uma linhagem comercial de 2001 (*Ross 308*) e uma linhagem controle de 1957 (*Athens-Canadian Randombred Control*) alimentadas com dietas comerciais representativas dos anos de 1957 e 2001 sobre o desempenho e carcaça e, concluíram que a seleção genética foi responsável por 85% a 90% dos ganhos e, a nutrição correspondeu de 10 a 15% das mudanças ocorridas em 44 anos para ambas as linhagens avaliadas.

Desde a década de 1990, ferramentas relacionadas à genômica têm sido empregadas com o objetivo de melhor compreender como as características de interesse para a avicultura são controladas geneticamente.

2.2 Genômica avícola e suas contribuições

A galinha doméstica apresenta vantagens frente a outras espécies de animais de produção (bovinos e suínos), pois é considerada um animal de eficiência reprodutiva elevada, iniciando a postura em torno da 23ª semana de idade (RUTZ et al., 2007), crescimento rápido (~ 3 kg em 42 dias) e curto intervalo

entre gerações (7-8 meses). Esta espécie apresenta hemácias nucleadas, diferentemente dos mamíferos, facilitando a extração do DNA e disponibilizando suficiente quantidade deste material genético para que estudos, empregando abordagens da Biologia Molecular, possam ser conduzidos. Seu genoma é relativamente pequeno (1,05 Gpb) (HILLIER et al., 2004) quando comparado ao genoma de outras espécies de animais domésticos, como por exemplo, bovinos com 2,92 Gpb (ELSIK et al., 2009), suínos com 2,47 Gpb (GROENEN et al., 2012) e caprinos com 2,66 Gpb (DONG et al., 2012).

Serebrovskay e Petrov (1930) foram os pioneiros a empregar a galinha doméstica em estudos voltados ao genoma já que obtiveram o primeiro mapa de ligação. Na época, estes autores se basearam em marcadores morfológicos, como, por exemplo, cor da plumagem, crista, barbel, para calcular a taxa de recombinação. Como este tipo de marcador é escasso ao longo do genoma, houve limitações no avanço nos estudos sobre o genoma da galinha.

Por isso, com o advento da Tecnologia do DNA Recombinante e dos marcadores moleculares de DNA, a partir da década de 1970, houve a possibilidade de uma maior acessibilidade à informação contida na molécula de DNA. Combinado a este cenário, métodos de genotipagem mais eficientes e o desenvolvimento de métodos genético-estatísticos possibilitaram a implementação de algumas estratégias genômicas, tais como a construção de mapas de ligação, mapeamento de QTL, testes de associação, estudos envolvendo expressão gênica e de proteínas (MACKAY et al., 2009). Estas estratégias têm contribuído para uma melhor compreensão da arquitetura genética de características quantitativas de interesse econômico para a avicultura (MACKAY et al., 2001).

Dessa forma, a partir da década de 1990, esforços internacionais foram iniciados a fim de construir mapas de ligação cada vez mais saturados para a galinha doméstica. Três populações referência foram desenvolvidas para esta finalidade, a saber, *Compton* (BUMSTEAD; PALYGA, 1992), *East Lansing* (LEVIN et al., 1994) e *Wageningen* (GROENEN et al., 1998). Groenen et al. (2000) integraram os mapas de ligação destas três populações, definindo o Mapa Consenso da Galinha Doméstica, com 1.889 locos em 50 grupos de ligação que cobriram 3.800 cM (centiMorgan). Schmid et al. (2000; 2005) atualizaram este

mapa incluindo 372 locos, totalizando 4.200 cM distribuídos por 53 grupos de ligação. Groenen et al. (2009) publicaram um outro Mapa Consenso com a inclusão de 8.599 SNPs, cobrindo 3.228 cM e, com a inclusão de microssatélites, totalizou 9.268 locos.

Outra contribuição importante da galinha às pesquisas foi quando seu genoma foi publicado por Hillier et al. (2004) totalizando 1,05 Gpb. Esta espécie foi o primeiro animal de produção a ter seu genoma sequenciado a partir do DNA de uma fêmea de *Red Jungle Fowl*, a qual foi sugerida por Charles Darwin como o ancestral desta espécie (FUMIHITO et al., 1994). Atualmente, a sequência de seu genoma totaliza 1,046 Gpb contendo 17.993 genes já identificados e 17.671 proteínas (NCBI, 2013).

Este genoma possui uma variabilidade relacionada ao tamanho dos cromossomos, sendo classificado como bimodal, ou seja, é composto por cinco macrocromossomos, cinco cromossomos intermediários e 28 microcromossomos (CHENG, 1997; BURT, 2013). Embora estes últimos apresentem um pequeno tamanho quando comparado com os macrocromossomos, eles contêm cerca de duas vezes a densidade de genes encontrados nos outros tipos de cromossomos (BURT, 2004). Portanto, o genoma da galinha é constituído por 78 cromossomos (2n), que são divididos em 38 pares autossômicos e um par de cromossomos sexuais (Z e W), sendo a fêmea heterogamética (ZW) e o macho homogamético (ZZ) (CHENG, 1997).

Em paralelo ao desenvolvimento do projeto de sequenciamento do genoma desta espécie, foram identificados mais de 2,8 milhões de SNPs a partir da comparação da sequência do genoma do ancestral da galinha (*Red Jungle Fowl*) com sequências obtidas de três diferentes materiais genéticos domesticados: um macho de corte (*White Cornish*), uma fêmea de postura (*White Leghorn*) e outra fêmea de uma espécie ornamental (*Silkie chinesa*). A taxa global média de substituição de bases nitrogenadas foi em torno de 5 SNP.kpb⁻¹ (WONG et al., 2004).

Existem 1.397.577 SNPs associados com 33.566 genes, segundo a *Chicken Variation Database* (dados disponíveis em <http://chicken.genomics.org.cn>, acesso em 22/10/2013) (WANG et al., 2005). De acordo com o banco de dados *Short Genetic Variations* (dbSNP,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) há 9.425.377 de SNPs já anotados (dados disponíveis em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>, acesso em 22/05/13).

2.3 Mapeamento de QTL

O mapeamento de QTL (*Quantitative Trait Loci* - locos que controlam características quantitativas) permite estabelecer associações entre regiões cromossômicas e características quantitativas de interesse econômico. Influenciam no poder de detecção do QTL, por exemplo, o tamanho e estrutura da população experimental, a herdabilidade da característica considerada, o adensamento com marcadores do mapa de ligação, o nível de desequilíbrio de ligação entre marcador e QTL (LYNCH; WALSH, 1998).

A identificação destas regiões é dependente do desenvolvimento de mapas genéticos saturados por marcadores moleculares polimórficos, como os microssatélites (SCHMID et al., 2005) e SNPs (GROENEN et al., 2009). Também é necessário o desenvolvimento de uma população experimental, delineada em pelo menos três gerações, por exemplo, F₂, e estruturada em famílias, cujos animais fundadores sejam fenotipicamente divergentes. Todos os animais devem ser fenotipados e genotipados. Estas etapas demandam elevados recursos financeiros e humanos, além de tempo.

Por meio da compilação dos resultados referentes a 192 publicações, foram identificados 3.919 QTL mapeados para 297 características diferentes, tais como: crescimento (2.538 QTL), suscetibilidade a doenças (415), qualidade de ovos (283), características relacionadas ao comportamento (139), produção de ovos (132), outras produções (122), bioquímica e metabolismo (113), qualidade de carne (68), consumo de alimento (37), conformação (28), outras doenças (44). Especificamente para o cromossomo 1 (GGA1), o qual corresponde a 19,1% do genoma e objeto de deste estudo, já foram mapeados 770 QTL (19,6%), de acordo com *Chicken QTL database* (disponível em: <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/index>, acesso em 22/10/2013).

Os QTL mencionados acima têm sido mapeados, quase que em sua totalidade, empregando métodos de mapeamento de QTL sob o enfoque univariado (HALEY et al., 1994; SEATON et al., 2002; SEATON et al., 2006), o

que certamente é uma limitação, pois não tem usufruído ao máximo das informações geradas por tais experimentos. Assim, o emprego de métodos multivariados de mapeamento de QTL pode ser uma alternativa a esta limitação, além de permitir que a base genética da correlação entre características seja mais bem compreendida. Testes estatísticos envolvendo um QTL (pleiotropia) ou dois QTL (ligação) podem ser implementados para esta finalidade.

A pleiotropia descreve a ação de um mesmo gene ou QTL sobre diversas características, sendo uma causa permanente. Já a ligação, descreve a ação de um gene ou QTL associado a alguma característica e outro gene ou QTL próximo do primeiro (ligado) associado à outra característica e, é uma causa transitória. Se esta última for evidenciada, cruzamentos direcionados podem promover a recombinação entre os genes ou QTL (FALCONER; MACKAY, 1996) que controlam duas características quaisquer, permitindo o melhoramento simultâneo de ambas.

Pinto (2007), empregando a população experimental TCTC da Embrapa, o programa *QxPak* (PÉREZ-ENCISO; MISZTAL, 2004), transformação canônica e análise bivariada, mapeou QTL pleiotrópicos nos GGA1, 2 e 3 associados ao peso vivo, partes da carcaça e peso de órgãos. Apesar de esta ser uma abordagem plausível para o mapeamento de QTL multivariadamente, o programa *QxPak* ainda apresenta limitações, pois não implementa o Mapeamento por Intervalo Composto e nem a abordagem proposta por Knott e Haley (2000) baseada em quadrados mínimos. A superação destas duas limitações foi realizada por Rosário et al. (2008; 2011), por meio da implementação do Mapeamento por Intervalo Composto Multivariado (multiCIM).

Rosário et al. (2008) identificaram uma região do GGA4 da população recíproca CTCT associada com rendimento de pernas e que esta encontrava-se ligada à outra associada simultaneamente com pesos vivos aos 35 e 42 dias, e ganhos de pesos da eclosão aos 35 e 42 dias e consumo de alimento entre 35 e 41 dias de idade no mesmo cromossomo. Em outro trabalho, Rosário et al. (2011), empregando a mesma população e abordagem de análises, demonstraram que a pleiotropia foi a causa da correlação genética entre características de desempenho e de carcaça no GGA1. Neste último exemplo, os programas de melhoramento genético precisarão conduzir a seleção a fim de

definir um índice que maximize, simultaneamente, os ganhos para as características avaliadas.

Ainda sob o enfoque multivariado, Rosário et al. (2012), empregando o multiCIM no GGA1 da população experimental TCTC, delimitaram regiões genômicas cuja base da correlação genética foi a pleiotropia. Mapearam quatro QTL pleiotrópicos: um a 173 cM associado com peso vivo 41 dias, peso do coração, gordura abdominal e teor de cinzas na matéria seca; o segundo QTL foi localizado a 203 cM associado com peso vivo 41 dias, peso das asas, peso da cabeça, peso do coração, peso da moela, peso da gordura abdominal, proteína bruta, extrato etéreo e teor de cinzas em matéria seca; o terceiro QTL foi mapeado a 267 cM e associado com peso vivo 41 dias, peso do peito, peso das coxas e sobrecoxas, peso da cabeça, peso da moela e teor de proteína bruta; e por fim, o quarto QTL a 436 cM e associado com peso vivo 41 dias, peso do peito, peso das asas, peso das coxas e sobrecoxas, peso da moela, comprimento do intestino, colesterol + triglicerídeos e níveis de colesterol. Este trabalho deu suporte para que fosse conduzida a presente pesquisa.

Após a realização do mapeamento de QTL, pode-se implementar o mapeamento fino por meio da saturação de regiões previamente contendo QTL com SNP e lançar mão de testes de associação.

2.4 SNPs e desequilíbrio de ligação

O SNP é um polimorfismo de apenas um único nucleotídeo que se encontra distribuído ao longo do genoma em mais de 1% da população (COLLINS et al., 1998). Este tipo de marcador tem como origem uma mutação no genoma, e esta, ocorre em um determinado nucleotídeo convertendo-o em outro qualquer. A fixação destas mutações, ao longo de gerações, pode ser devida a fatores de seleção, migração e deriva (BROWN, 2002). Com a descoberta destes marcadores, tornou-se factível a condução de testes de associação e mapeamento fino visando reduzir a extensão das regiões de QTL (GEORGES, 2007) as quais dependem da extensão do desequilíbrio de ligação (DL).

É comum haver confundimento entre os termos ligação e DL, ainda que exista relação entre eles. O termo ligação refere-se à herança relacionada de

determinados locos por meio de uma conexão física em um determinado cromossomo. Já o DL refere-se à associação não aleatória de alelos em dois ou mais locos, não necessariamente no mesmo cromossomo, descrevendo uma situação em que algumas combinações de alelos ou marcadores genéticos ocorrem mais ou menos frequentemente. Portanto, a origem do DL reside nas frequências alélicas e eventos que conduzam à alteração de tais frequências podendo aumentar ou diminuir o DL. Estes eventos são: a ligação física entre locos (daí o confundimento), a seleção artificial, migração ou cruzamento recente e mutação. Quanto maior for a ligação entre dois locos quaisquer, maior pode ser o nível DL (FALCONER; MACKAY, 1996; FLINT-GARCIA et al., 2003).

A partir da estimação do DL, é possível identificar blocos de haplótipos ao longo dos cromossomos da galinha considerando a ligação física existente entre os locos. Cada bloco é composto pela combinação particular entre alelos de locos em elevado DL, a qual é denominada de haplótipo (ALTSHULER et al., 2005). Portanto, os haplótipos são considerados combinações de alelos em uma determinada região do genoma, onde ocorre mínima ou nenhuma recombinação genética, sendo, portanto, transmitidos integralmente ao longo das gerações (LEWIN, 2007).

A estimação da extensão do DL tem permitido construir blocos de haplótipos para a galinha e lançar mão do mapeamento associativo (AERTS et al., 2007; ANDREESCU et al., 2007; QANBARI et al., 2010; WRAGG et al., 2012).

2.5 Mapeamento associativo

Os trabalhos pioneiros em associar SNP com características quantitativas se baseavam no sequenciamento de regiões de genes candidatos posicionais e/ou funcionais, identificação dos SNPs, genotipagem de animais e condução dos testes de associação. Apesar de esta abordagem ter propiciado a detecção de diversas associações de SNPs com características de interesse para a avicultura, ela é limitada, já que não cobre a maior parte do genoma.

Alguns exemplos desta estratégia foram dados por Nie et al. (2005), os quais associaram polimorfismos do gene *hormônio do crescimento*, localizados no GGA27, com ganhos de peso, peso corporal e comprimento da canela e Wang et

al. (2005) do gene *IGF2* (GGA5) com peso da gordura abdominal, peso ao nascimento e peso de peito. Já Zhou et al. (2005) associaram polimorfismos do gene candidato *IGF1* (GGA1) com características de integridade óssea, características metabólicas, crescimento e composição corporal. Para a região promotora do gene *IGF1*, um SNP foi associado com a maioria das características estudadas.

Wu et al. (2006) confirmaram a associação entre o peso da gordura abdominal a 12 semanas de frangos com o genótipo GG do gene *PPARGC1A*, sendo que estes frangos apresentaram de 34,26 a 28,71% mais gordura do que aqueles com genótipos AA e AG, respectivamente. Este resultado indicou o polimorfismo *Asp216Asn* no gene, o qual pode ser usado como um potencial marcador molecular para a seleção contra a gordura abdominal, sem interferir na reprodução e na taxa de crescimento.

Também Wang et al. (2008) identificaram SNPs no gene *miogenina* (GGA26), avaliado em aves de linhagens puras e três híbridos. Estes polimorfismos foram associados à densidade de fibras musculares, peso do músculo peitoral e porcentagem de músculo de pernas. Zhang et al. (2009) identificaram dois SNPs no gene *calpaína 3* (GGA5) em linhagens divergentes de frango de corte. Eles evidenciaram diversas associações dos genótipos, haplótipos e diplótipos com peso do músculo do peito, peso do músculo das pernas, peso vivo e peso da carcaça.

Zhang et al. (2011), empregando quatro populações de galinhas (*Bian, Jinghai, Youxie* e *Arbor Acre*) detectaram quatro polimorfismos no gene *miostatina* (GGA7), sendo eles: *G2283A*, *C7552T*, *C7638T* e *T7661A*. Estes SNPs foram associados com características de peso vivo em 6-18 semanas de idade.

Liu et al. (2012), utilizando animais da raça *Beijing-You*, evidenciaram associação de três SNPs (g.-1654A>G, g.-1411A>G e g.-142T>C) com características de crescimento e reprodução. Estes SNPs foram localizados na região promotora do gene *receptor do hormônio liberador de hormônio de crescimento* (*GHRHR*) localizado no GGA2.

Porém, mais recentemente, com o emprego de plataformas de sequenciamento de nova geração, tem sido possível identificar um número cada vez maior de SNPs no genoma da galinha. Consequentemente, tornou-se factível

a obtenção dos chamados chips de SNPs, os quais têm gerado uma revolução na área da genômica animal. Esta tecnologia tornou possível a varredura genômica em uma determinada população e a um custo benefício acessível gerando dados genotípicos de forma rápida e em densidade cada vez maior (COUTINHO; ROSÁRIO, 2010).

Com a informação do sequenciamento completo do genoma da galinha doméstica e disponibilizada em bancos de dados públicos, em 2004, as principais empresas que conduzem programas de melhoramento genético avícola investiram no sentido de incluir a informação genômica na seleção de aves economicamente mais eficientes. No ano de 2008, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (*United States Department of Agriculture* - USDA) investiu US\$ 5 milhões em pesquisas relacionadas à identificação e caracterização de SNPs em diversas espécies de produção animal incluindo a galinha doméstica. Dessa forma, o Consórcio constituído pela *Cobb-Vantress*, *Hendrix Genetics* e USDA foi pioneiro no desenvolvimento do chip de SNPs para a galinha doméstica (FULTON, 2012).

Assim, Groenen et al. (2011) desenvolveram um chip de SNP de 60 k, denominado de *Chicken 60 k CobbCons*, o qual comporta efetivamente 57.636 SNPs. Este chip emprega a tecnologia *Illumina SNP BeadChip* (dados disponíveis em http://www.illumina.com/technology/beadarray_technology.ilmn, acesso em 22/05/2013). Estes autores obtiveram este chip a partir de SNPs que sabidamente segregavam com frequência alélica de alta a média em materiais genéticos comerciais de corte e postura. Os SNPs contidos neste chip cobrem todos os cromossomos, em que o espaçamento e o número destes marcadores variaram de acordo com o tamanho do cromossomo. A partir de então, tem sido possível conduzir alguns estudos empregando este chip.

Gu et al. (2011) utilizaram uma população F_2 , proveniente do cruzamento entre as raças *White Plymouth Rock* e *Silky Fowl*, as quais apresentavam diferenças em relação à taxa de crescimento e peso corporal, e conduziram Estudos de Associação Genômica Ampla (*Genome Wide Association Studies* – GWAS) empregando o chip de 60 k. Dessa forma, identificaram 26 SNPs localizados nos cromossomos: GGA1 (2 SNPs), GGA4 (23) e GGA18 (1). Também associaram os SNPs presentes no GGA4 com o peso corporal (7-12

semanas) e ganho médio diário (6-12 semanas). Também foram detectados 128 SNPs com efeitos sugestivos nos GGA1 (14 SNPs), GGA2 (8), GGA3 (10), GGA4 (73), GGA7 (2), GGA11 (4), GGA13 (2), GGA14 (2), GGA18 (3), GGA20 (5) e GGA24 (5).

Em galinhas de postura, um estudo de associação com características de produção e qualidade de ovos em galinhas das raças *Brown-egg dwarf* e *White Leghorn* foi realizado por Liu et al. (2011) empregando o chip de 60 k. Estes autores detectaram associação de oito SNPs com estas características, em que a maioria foi localizada em regiões de QTL ou em possíveis genes candidatos, como por exemplo, *GRB14* (*growth factor receptor-bound protein 14*) presente no GGA7 e *GALNT1* (*UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:-polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 gene*) no GGA2. Foram detectadas associações no GGA7 (1 SNP) com número de ovos; no GGA13 (1) para idade ao primeiro ovo; no GGA2 (1) e GGA3 (1) para peso da casca do ovo 40 semanas; no GGA11 (1) para peso da casca do ovo 60 semanas; no GGA1 (3) um SNP para peso da gema 40 semanas e dois associados à espessura da casca do ovo 40 semanas.

Xie et al. (2012) avaliaram características de importância econômica em aves da geração F₂ provenientes do cruzamento entre *White Recessive Rock* e *Xinghua* genotipadas com o chip de 60 k e, fenotipadas para 23 características de crescimento. Identificaram cinco SNPs significativos para todas as características de crescimento, os quais estavam em uma região de 1,5 Mpb (entre 173,5 – 175,0 Mpb) próxima aos genes *KPNA3* (*karyopherin alpha 3*) e *FOXO1A* (*forkhead box O1*). Estes genes localizam-se no GGA1, indicando que esta região apresenta efeitos no crescimento de frangos no período de 22 a 42 dias.

Para o estudo do polimorfismo denominado de Variação no Número de Cópias (*Copy Number Variation* – CNV), Jia et al. (2012), empregando o chip de 60 k para genotipar duas linhagens geneticamente divergentes (*White Leghorn* e *Brown-egg Dwarf*), detectaram um total de 209 regiões de CNVs, localizadas nos cromossomos GGA 1-22 e 24-28, abrangendo um total 13,5 Mpb (1,42%) do genoma autossômico da galinha.

Liu et al. (2013), visando à identificação de locos e genes candidatos para características fenotípicas de qualidade de carne e composição de carcaça,

genotiparam 724 animais da raça *Beijing-You* com o chip de 60 k e mensuraram 16 características. Dentre os 7.224 SNPs posicionados no GGA1, estes autores evidenciaram associação do peso de carcaça e vísceras com o SNP *Gga_rs13964189*, posicionado no gene *DACH1* (*dachshund homolog 1*), próximo a uma região de QTL previamente mapeado e associado ao peso da carcaça na população TCTC por Nones et al. (2006).

Luo et al. (2013a) associaram uma região nova de QTL localizada no GGA1 associada à modulação de anticorpos para a doença de Newcastle em frangos de 41 dias genotipados com o chip de 60 k. Nesta região, estes autores identificaram dois SNPs, *rs15354805* [C/T] e *rs15355555* [A/G], que explicaram 5% e 4%, respectivamente, da variação fenotípica relacionada à resposta de anticorpos para esta doença.

Além do chip de 60 k, outro chip com densidade de 600k foi desenvolvido por Kranis et al. (2013) em parceria com a empresa *Affymetrix® Axiom®*. O Consórcio envolveu diversas empresas privadas de melhoramento genético, a saber, *Aviagen*, *Lohmann*, *Hy-Line International*, coordenadas pelo *Roslin Institute*. O chip contém efetivamente 580.954 SNPs e foi obtido empregando-se o equipamento de sequenciamento de nova geração, *Illumina GAIIx*, por meio do qual foi conduzido o ressequenciamento do genoma de 243 animais provenientes de 24 linhagens divergentes, tanto experimentais, quanto comerciais (corte e postura).

Por meio da comparação com a versão 4.0 do genoma da galinha, Kranis et al. (2013) identificaram, inicialmente, cerca de 139 milhões de SNPs. Porém, este grande número foi reduzido após uma cuidadosa filtragem com diferentes critérios. De acordo com os autores, este chip poderá ser utilizado em pesquisas que abordem o mapeamento fino de QTL, detecção de variação no número de cópias (CNV), assinaturas de seleção, análise de associação genômica ampla (GWAS) e seleção genômica.

2.6 Contribuição brasileira à genômica avícola

Em decorrência de diversos estudos pelo mundo terem sido conduzidos a partir da década de 1990, o Brasil, no ano de 1999, deu início ao Projeto Genoma

Brasileiro da Galinha. Este Projeto foi uma iniciativa entre Embrapa Suínos e Aves e ESALQ/USP. Foram desenvolvidas duas populações referência para mapeamento de QTL e genes associados com características de desempenho e carcaça. Estas populações foram denominadas de TCTC e CTCT, em estrutura F_2 , tendo como origem cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de corte (TT) e outra de postura (CC).

Ao longo da condução deste Projeto, mapas de ligação foram construídos para a população TCTC (NONES et al., 2005; AMBO et al., 2008) e para a população CTCT (ROSÁRIO et al., 2010) bem como QTL foram mapeados na população TCTC para características de desempenho e de carcaça.

Nones et al. (2006) sob o modelo F_2 e meios-irmãos, mapearam QTL no GGA1 para peso vivo, consumo de ração, peso da carcaça, peso das coxas e sobrecoxas, peso da gordura abdominal, peso do coração, peso dos pulmões, peso da moela, peso do fígado, peso dos pés e comprimento do intestino.

Ambo et al. (2009) identificaram oito QTL na população TCTC: peso vivo 35 dias (GGA2, 3 e 4), peso 41 dias (GGA2, 3, 4 e 10) e comprimento de intestino (GGA4) empregando o modelo F_2 ; sob modelo meios-irmãos, sendo o pai como parente comum, mapearam cinco QTL: peso vivo do primeiro dia (GGA3 e 18), peso vivo 35 dias (GGA2 e 3) e peso vivo 41 dias (GGA3). Entretanto quando utilizou a mãe como parente comum, evidenciaram sete QTL: peso vivo do primeiro dia (GGA2), peso 35 dias (GGA2, 3 e 4), peso vivo 41 dias (GGA2, 3 e 4).

Campos et al. (2009), sob o modelo F_2 , mapearam sete QTL, a saber: gordura abdominal (GGA3 e 27), porcentagem de gordura abdominal (GGA3, 10 e 12) e teor de triglicerídeos (GGA5 e 27). Quando empregaram o modelo de meios-irmãos mapearam oito QTL: gordura abdominal (GGA2, 3 e 27), porcentagem de gordura abdominal (GGA3, 12 e 27) e teor de triglicerídeos (GGA5 e 23).

Baron et al. (2010) avaliaram características de carcaça (porcentagem e partes da carcaça) e, sob o modelo F_2 identificaram 29 QTL para: peso da carcaça (GGA2, 3 e 14), peso do peito (GGA2, 3, 8, 12 e 18), peso de coxas e sobrecoxas (GGA3 e 4), peso das asas (GGA1 e 3), peso do dorso (GGA2, 11 e 12), peso dos pés (GGA1, 2, 3, 4 e 27) e peso da cabeça (GGA1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e

9); já sob modelo meios-irmãos, mapearam 24 QTL: porcentagem de carcaça (GGA1, 2 e 5), porcentagem de peito (GGA1, 3, 5 e 14), peso de coxas e sobrecoxas (GGA2, 3, 5 e 15), peso de asas (GGA1, 3 e 5), peso de dorso (GGA12), peso de pés (GGA1, 2, 3, 4 e 27) e peso da cabeça (GGA1, 2, 3 e 27).

Nones et al. (2012) mapearam QTL associados com características de proteína, gordura, água e cinzas na carcaça. Empregando o modelo F_2 , identificaram 11 QTL associados com gordura no GGA1 (4 QTL), GGA15 (2) e no GGA27 (2); proteína no GGA15 (1) e GGA27 (1) e cinzas no GGA27 (1); já sob modelo de meios-irmãos, mapearam 10 QTL associados com gordura no GGA1 (2 QTL) e GGA27 (1); proteína no GGA1 (2) e GGA27 (1); cinzas no GGA1 (1), GGA10 (1) e GGA27 (1) e teor de água na carcaça no GGA27 (1).

Além do mapeamento de QTL, a estratégia de identificação de SNPs e associação com características quantitativas também tem sido conduzida nos materiais genéticos provenientes da Embrapa Suínos e Aves. Assim, Souza (2004) estudou polimorfismos em cinco genes relacionados ao desenvolvimento muscular: *MyoD* (GGA26), *Myf5* (GGA1), *miogenina* (GGA26), *MRF4* (GGA1) e *miostatina* (GGA7) nas linhagens TT e CC e detectou associações com características de ganho de peso, peso da carcaça, peso vivo aos 42 dias, asas, gordura abdominal, fígado e pulmões.

Ninov et al. (2008) investigaram polimorfismos presentes no gene *receptor da leptina* (GGA8) e encontraram seis polimorfismos, em que dois deles foram específicos para a linhagem TT e quatro com maior frequência na linhagem CC. O SNP C352T foi associado com a proteína bruta e cinzas e rendimento do fígado, peito e carcaça, enquanto que, o SNP G915A com consumo de ração, rendimento dos pulmões e coxas e sobrecoxas.

Felício et al. (2013a) empregaram a população TCTC e uma comercial de frangos de corte e identificaram SNPs nos genes *FGFBP1* (g.2014G>A) e *FGFBP2* (g.651G>A), ambos localizados no GGA4. Estes SNPs foram associados a características de desempenho, carcaça e qualidade de carne. Felício et al. (2013b), empregaram as mesmas populações para identificação de SNPs nos genes *CAPN1* (GGA3) e *CAPN3* (GGA5). O SNP g.2554T>C (*CAPN1*) foi associado ao peso 35 a 42 dias, peso de coxa, peso de peito, peso de carcaça e luminosidade da carne. Já o SNP g.15486C>T (*CAPN3*) encontraram associação

com rendimento de coxa, perda de água na carne por cozimento e força de cisalhamento.

Boschiero et al. (2013) estudaram os genes *IGF1* e *KDM5A*, ambos localizados no GGA1, na população TCTC. Para o gene *IGF1*, o SNP *c.47673G>A* foi associado com as características de peso corporal, porcentagem de hematócrito, ingestão alimentar, porcentagens de gordura abdominal e peso da moela. Enquanto que, para o gene *KDM5A*, foi encontrada a associação do SNP *c.34208C>T* para as características de peso corporal, ingestão alimentar, porcentagens de gordura abdominal, peso da carcaça, peso da moela e hematócrito.

Estas estratégias genômicas, baseadas na construção de mapas de ligação, mapeamento de QTL e testes de associação em materiais genéticos provenientes da Embrapa Suínos e Aves têm sido de relevante importância, pois têm contribuído para uma melhor compreensão do complexo processo biológico que envolve o crescimento e desenvolvimento muscular na galinha doméstica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População experimental

Os animais utilizados neste trabalho foram oriundos da população experimental F_2 , desenvolvida por meio de uma iniciativa entre a Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC, e a ESALQ/USP, Piracicaba/SP, entre 1999 e 2001 (FIGUEIREDO et al., 2003a, b). Linhagens fenotipicamente divergentes para crescimento e desenvolvimento muscular, a saber, machos de uma linhagem de corte (TT) e fêmeas de uma linhagem de postura (CC), foram empregadas como fundadores desta população, a qual foi denominada de TCTC. Dessa forma, obteve-se uma população segregante, na qual fosse possível empregar estratégias genômicas relacionados ao mapeamento de QTL (NONES et al., 2006; AMBO et al., 2009; CAMPOS et al., 2009; BARON et al., 2010; NONES et al., 2012) e genes candidatos (NINOV et al., 2008; BOSCHIERO et al., 2013; FELÍCIO et al., 2013a, b) associados a características de desempenho e carcaça.

A linhagem TT foi composta geneticamente pelas raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*, sendo selecionada, por seis gerações, para características de corte (conversão alimentar, rendimentos do peito e carcaça, peso corporal, redução da gordura abdominal, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, morte súbita e ascite). Já a linhagem CC foi composta apenas pela raça *White Leghorn*, sendo selecionada, por oito gerações, para características de postura (conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, produção de ovos, peso do ovo, qualidade do ovo e redução do peso corporal), maiores detalhes podem ser obtidos em Figueiredo et al. (2003a, b).

Quatorze Parentais (7 machos TT e 7 fêmeas CC), 28 F_1 (7 machos TC e 21 fêmeas TC) e aproximadamente 2.100 F_2 compuseram a população TCTC. A partir de sete cruzamentos iniciais entre as linhagens TT e CC (Parentais) na proporção 1:1, obteve-se a geração F_1 TC, com aproximadamente 50 animais por cruzamento. Assim, para a formação da geração F_2 , um total de sete machos e 21 fêmeas (21 famílias de irmãos completos), na proporção de um macho para três fêmeas não aparentadas de cada família da geração F_1 , foi selecionado para

servir como parentais da geração F_2 . Cada fêmea F_1 produziu aproximadamente 100 animais F_2 , obtidos ao longo de 17 incubações, quinzenalmente, totalizando um período de 8,5 meses (ROSÁRIO et al., 2009).

Na Figura 1, é apresentado um esquema simplificado de como se desenvolveu a população TCTC.

Figura 1 – Esquema da estrutura da população TCTC
Fonte: Rosário et al. (2009)

Do total de 2.100 F_2 , foram selecionados 453 pertencentes cinco famílias mais informativas para se proceder este trabalho. A seguir, apresenta-se como foi conduzida esta seleção.

3.1.1 Seleção dos animais F_2

Esta etapa foi previamente conduzida por Rosário et al. (2012). Dentre as 21 famílias F_1 de irmãos-completos que compuseram a geração F_2 da população TCTC, de cinco a sete famílias, em um total de 11, foram selecionadas com base na etapa de genotipagem seletiva (DARVASI; SOLLER, 1992). Estas famílias tiveram cada uma, cerca de 90 animais F_2 genotipados (~ 410-650 animais) empregando-se 127 marcadores microssatélites mais um SNP, distribuídos por 22 autossomos em uma estratégia de varredura genômica (AMBO et al., 2009). Entretanto, estes autores demonstraram que houve uma variação no número de animais F_2 genotipados para os cromossomos 1 a 5 e, que a partir do cromossomo 6, houve maior regularidade, sendo genotipados ~ 410 a 450 animais F_2 (Tabela 1).

As famílias 1, 2, 5, 6 e 7 foram as que tiveram animais F_2 genotipados para um maior número de cromossomos (1, 6, 7, 8 e micros) e que para os demais cromossomos outras famílias foram selecionadas (Tabela 1). Isso se deveu ao fato de que no início do Projeto Genoma Brasileiro da Galinha, os trabalhos que estudaram os cromossomos 1 a 5 terem sido realizados considerando-se apenas o cromossomo 1 (NONES, 2004), os cromossomos 2 e 4 (BARON, 2004) e os cromossomos 3 e 5 (RUY, 2004). Assim, para estes três conjuntos de cromossomos, a seleção das famílias foi feita independentemente, de acordo com a etapa de genotipagem seletiva.

Tabela 1 – Número de animais F_2 genotipados em cada família e cromossomo da população TCTC

Cromossomo	Nº F_2 genotipados	Famílias*										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	648	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
2	577	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
3 e 5	544	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
4	567	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
6	414	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
7	446	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
8	441	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Micros (9-15, 18-19, 23-24, 26-28)	411	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

*1- 7716 (macho F_1) x 7978 (fêmea F_1); 2- 7716x7810; 3- 7769x7709; 4- 7769x7749; 5- 7769x7816; 6- 7822x7971; 7- 7822x7765; 8- 7797x7972; 9- 7797x7812; 10- 7977x7771; 11- 7975x775

Diante deste fato, selecionou-se um número máximo de animais F_2 que fosse concomitante ao maior número de cromossomos possível. Em certos casos, lançou-se mão de manter um animal que foi genotipado para diversos cromossomos, mas que para alguns outros, frequentemente os cromossomos 2, 3, 4 e 5, o genótipo desse animal foi considerado como dado perdido, a fim de que a matriz de genótipos fosse completada. Em outros casos, não se utilizaram de todos os F_2 , cujos genótipos estavam disponíveis para cromossomos 2, 3, 4 e 5, pois também seria necessário considerar o genótipo de muitos animais como dado perdido. Em ambos os casos, buscou-se minimizar os prejuízos ou as influências de se considerar muitos dados genotípicos como perdidos. Portanto, empregou-se a solução do bom senso, isto é, zerar o genótipo do menor número de F_2 , a fim de se manter o maior número destes no arquivo de genótipos.

A Tabela 2 resume as famílias empregadas neste estudo com os respectivos números de anilhas dos animais que compuseram as gerações Parental e F_1 .

Tabela 2 – Identificação das famílias representando os animais das gerações Parental e F_1 com seus respectivos números de anilhas e o número de animais da geração F_2 selecionados

Família	Avós Paternos		Avós Maternos		F_1		Nº F_2 selecionados
	Macho TT	Fêmea CC	Macho TT	Fêmea CC	Macho TC	Fêmea TC	
1	5649	886	6037	241	7716	7978	103
2	5649	886	6232	332	7716	7810	82
3	5661	88	6232	332	7769	7816	94
4	6232	332	5921	37	7822	7971	101
5	6232	332	5661	88	7822	7765	73
Total							453

Fonte: Rosário et al. (2012)

Dessa forma, os 453 animais F_2 selecionados foram oriundos de cinco famílias mais informativas da população TCTC, compostas por Parentais (10 animais) e F_1 (oito animais). Estes animais F_2 tiveram mensuradas ou calculadas diversas características fenotípicas descritas abaixo.

3.2 Características fenotípicas

A criação dos animais F_2 se deu nas instalações da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC, e seguiu as recomendações de manejo preconizadas para frangos de corte.

As características mensuradas ou calculadas nos animais F_2 da população TCTC foram divididas em cinco classes: desempenho, carcaça, órgãos, gordura e composição de carcaça, totalizando 24 fenótipos. Elas são apresentadas a seguir:

1. Desempenho: peso aos 41 dias (PV41), ganho de peso de 35 a 41 dias (GP3541), consumo de ração de 35 a 41 dias (CR3541), conversão alimentar de 35 a 41 dias (CA3541) e comprimento do intestino (INT);
2. Carcaça: peso dos pés (PES), peso das coxas e sobrecoxas (PER), peso do peito com pele e ossos (PEI), peso da cabeça (CAB), peso das asas

- (AS), peso do dorso (DOR) e peso da carcaça obtido com a soma das partes (CAR);
3. Órgãos: peso do fígado (FIG), peso do coração (COR), peso da moela (MOE), peso dos pulmões (PUL) e hematócrito (HEM);
 4. Gordura: peso da gordura abdominal (GOR), níveis séricos de colesterol total (COL), níveis séricos de triglicerídeos (TRI) e triglicerídeos + colesterol no plasma (TC);
 5. Composição da carcaça: porcentagem de proteína bruta na matéria seca (PB_MS), porcentagem de extrato etéreo na matéria seca (EE_MS) e porcentagem de cinzas na matéria seca (CZ_MS).

Os dados fenotípicos, bem como a informação de *pedigree*, foram tabulados em planilha do programa *Excel*[®] e ordenados de acordo com o número da anilha de identificação de cada animal F₂ juntamente com informações complementares como, por exemplo, identificação dos pais e avós, incubação e sexo. Esta planilha foi empregada na organização das amostras de sangue descrita no item 3.3.

Adicionalmente, empregando-se o PROC MEANS do programa SAS[®] (SAS, 2007), foram obtidas estatísticas descritivas, tais como, número de observações, média, desvio-padrão, valor de mínimo e máximo para cada fenótipo mensurado ou calculado.

3.2.1 Modelagem fenotípica

Os dados fenotípicos foram coletados durante 17 incubações, sendo estas obtidas quinzenalmente, por um período de 8,5 meses. O processo de incubação em si é totalmente controlado, como por exemplo, a temperatura, umidade relativa e o tempo de rotação dos ovos. Porém, considerou-se a incubação como um efeito aleatório, uma vez que há efeito da idade da matriz entre as posturas.

Segundo McDaniel et al. (1979) e Hamilton (1982), no decorrer do tempo, com o avanço da idade das matrizes, há um aumento no tamanho e o peso do ovo, mas o mesmo não ocorre com o peso da casca, a qual não aumenta na mesma proporção. Há evidências de que os ovos provenientes de matrizes com

idade mais avançada confirmam maior peso na eclosão dos pintos (LIMA et al., 2001). Dessa forma, a incubação foi considerada como uma medida repetida no tempo, em que animais provenientes de incubações adjacentes apresentam maior correlação entre dois fenótipos quaisquer daqueles obtidos em tempos mais distantes.

Diante destas considerações, os dados fenotípicos foram analisados empregando-se um modelo misto [efeitos fixos de família (5) e sexo (2) e aleatório de incubação (17)] por meio do PROC MIXED (SAS, 2007) e as funções RANDOM e REPEATED.

O modelo inicialmente empregado foi em que,

$$y_{ijkm} = \mu + F_i + S_j + (F \times S)_{ij} + I_k + (F \times I)_{ik} + (S \times I)_{jk} + e_{ijkm}$$

em que, y_{ijkm} : valor fenotípico no m -ésimo animal da i -ésima família de irmãos completos, j -ésimo sexo e k -ésima incubação; μ : intercepto; F_i : efeito fixo da i -ésima família de irmãos completos ($i = 1, \dots, 5$); S_j : efeito fixo do j -ésimo sexo ($j = 1, 2$); $(F \times S)_{ij}$: interação entre a i -ésima família de irmãos completos e o j -ésimo sexo; I_k : efeito aleatório da k -ésima incubação ($k = 1, \dots, 17$); $(F \times I)_{ik}$: interação entre a i -ésima família de irmãos completos e a k -ésima incubação; $(S \times I)_{jk}$: interação entre o j -ésimo sexo e a k -ésima incubação; e_{ijkm} : erro aleatório. As interações incluindo o efeito de incubação foram consideradas mistas e as demais fixas.

Para as características PV41, COL, INT, TRI, TC, PB_MS, EE_MS e CZ_MS não foi empregada covariável. Por outro lado, para CAB, PES, FIG, COR, MOE, AS, PER, PEI, DOR, CAR, GOR, PUL e HEMA foi utilizado PV42 e para GP3541, CR3541 e CA3541 foi utilizado o PV35 como covariáveis.

Empregando-se esta abordagem, as matrizes de co(variância) $\mathbf{G}\sigma^2$ (efeito aleatório de incubação) e $\mathbf{R}\sigma^2$ (efeito aleatório de erro) foram modeladas de acordo com cinco estruturas, a saber: componentes de variância (VC) simetria composta (CS), simetria composta heterogênea (CSH), auto-regressiva de primeira ordem (AR1) e auto-regressiva de primeira ordem heterogênea (ARH1) (SAS, 2007).

Após terem sido avaliados vários submodelos, oriundos do modelo inicial, foram mantidos somente os efeitos fixos significativos de família e sexo e o efeito

aleatório de incubação, eliminando-se as possíveis interações para a análise de todas as características. Entretanto, para cada característica, foi selecionada a combinação de estruturas para $\mathbf{G}\sigma^2$ e $\mathbf{R}\sigma^2$ que apresentasse o menor valor para o Critério de Informação Bayesiana (BIC) (SCHWARZ, 1978).

A seguir, procedeu-se à obtenção dos valores preditos ($\hat{y}_{ijkm}$) de cada animal para cada característica empregando-se a combinação de estruturas para $\mathbf{G}\sigma^2$ e $\mathbf{R}\sigma^2$ mais apropriada. Sabendo-se que $y_{ijkm} = \hat{y}_{ijkm} + e_{ijkm}$, o componente e_{ijkm} (resíduo) foi isolado, pois, além de conter a variação devido ao acaso, comum a todos os animais, o mesmo contém a variação genética, a qual é de interesse para se conduzir os testes de associação. Estes resíduos foram organizados em planilha *Excel*.

Adicionalmente, empregando-se o PROC CORR (SAS, 2007), foram estimadas as correlações fenotípicas baseadas no componente e_{ijkm} entre todas as 24 características avaliadas considerando-se $p < 0,05$.

3.3 Organização das amostras de DNA

As amostras de DNA empregadas neste estudo já foram utilizadas em outros trabalhos de nossa equipe desde o ano de 2000, porém, estavam diluídas a $20 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Adicionalmente, em função do tempo de estocagem em *freezer* - 20°C foi necessária a avaliação prévia de todas as amostras antes de se prosseguir com outras etapas relacionadas à genotipagem.

Dessa forma, todas as amostras foram avaliadas levando-se em consideração: volume mínimo, concentração de trabalho e integridade de bandas em gel de agarose. Estes critérios são descritos abaixo.

O volume mínimo considerado foi de $20 \mu\text{L}$; para a determinação da concentração, empregou-se o espectrofotômetro (*NanoDrop™ 2000*), a fim de verificar a concentração e determinar o grau de pureza por meio da relação de absorbância $260/280 \text{ nm}$, possibilitando a identificação de possíveis contaminações, como por exemplo, fenol e proteína (WARBURG; CHRISTIAN, 1942). A relação de absorbância das amostras previamente extraídas foi de 1,8 a

2,0, demonstrando a pureza do DNA extraído (EMBRAPA, 2009). A concentração de trabalho considerada foi de $50 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, devido às recomendações do equipamento *HiScan™SQ System*, empregado no procedimento de genotipagem; e, finalmente, a integridade do DNA foi verificada com o auxílio de gel de agarose a 1%, pela técnica de eletroforese por aproximadamente 1,5 h a uma tensão de 80 V.

Amostras que foram reprovadas em qualquer um dos critérios acima foram extraídas novamente (N = 250); já as aprovadas foram preservadas a -20°C até as etapas subsequentes.

3.3.1 Extração de DNA

Inicialmente, foi empregado o protocolo do *DNAzol®* (Invitrogen Life Technologies), composto pelo reagente tiocianato de guanidina, para a extração das 250 amostras reprovadas no item 3.3., uma vez que este protocolo é de rápida execução. Detalhes são apresentados a seguir.

Foi empregada uma alíquota inicial de apenas 5 μL de sangue de cada animal, previamente coletado em EDTA (10%) e descongelado. Esta alíquota foi acondicionada em tubo plástico de 1,5 mL, e após, adicionados 500 μL de *DNAzol®*, agitando-se manualmente de forma vigorosa por 5 segundos. Em seguida, foram adicionados 250 μL de etanol absoluto e inverteu-se o tubo, manualmente, por cinco vezes para que ocorresse a precipitação dos ácidos nucleicos em forma de pélete. Com auxílio de ponteira de 0-200 μL , o pélete foi mantido na parede do tubo enquanto a fração aquosa foi descartada. O pélete, então, foi lavado com 500 μL de etanol 95% e centrifugado por 10 minutos a $5.354 \times \text{G}$, sendo o sobrenadante descartado logo em seguida. Este último passo foi repetido uma vez a fim remover resíduos de sais. O tubo plástico, contendo o pélete, permaneceu em temperatura ambiente por 10 minutos ou até a completa evaporação do etanol 95%. Em seguida, o pélete foi ressuspensionado em 50 μL de água ultrapura.

Posteriormente, todas as amostras reextraídas (N = 250) foram quantificadas e tiveram suas qualidades avaliadas empregando-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.3. Do total de 250 amostras, apenas 70 (28%) foram consideradas apropriadas e diluídas para a concentração de trabalho.

Portanto, 180 amostras tiveram de ser extraídas novamente empregando-se o protocolo de Proteinase K (*Thermo Scientific*[®]).

Este protocolo é recomendado quando as amostras de sangue se encontram coaguladas e/ou quando são descongeladas e recongeladas muitas vezes, o que certamente, acarreta algum nível de degradação dos componentes do sangue, dificultando ou impedindo a extração pelo *DNAzol*[®]. Por outro lado, este protocolo é mais demorado quando comparado ao primeiro. Detalhes sobre ele são apresentados a seguir.

O protocolo de Proteinase K consistiu no aquecimento (37°C) das alíquotas de sangue congeladas e conservadas em EDTA (10%). Em tubos plásticos de 1,5 mL, foram adicionados 50 µL de sangue e 1 mL de tampão de lise de células vermelhas (Sucrose 0,32 M; 12 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM MgCl₂ e 1% Triton X). Após, os tubos foram centrifugados, por 1 minuto, a 17.400 xG e descartado o sobrenadante. Este passo foi repetido duas vezes para que ocorresse, por completo, a lise das hemácias, visualizada pela formação de um pélete esbranquiçado no fundo do tubo. Os péletes foram lavados com a adição de 500 µL de água ultrapura e os tubos novamente centrifugados a 17.400 xG, por um minuto. O sobrenadante foi descartado e, então, em cada tubo foram adicionados 80 µL do tampão de Proteinase K 5 x (0,375 M NaCl e 0,12 M EDTA pH 8,0), 7 µL de Proteinase K (20 mg.mL⁻¹) para a hidrólise das proteínas, 10 µL de SDS 20%, a fim de solubilizar a fração lipídica e 283 µL de água ultrapura, sendo agitado em vórtex a 3.748 xG para completa homogeneização por 15 segundos.

Os tubos plásticos foram, então, submetidos a 55°C em placa aquecedora por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 120 µL de NaCl (5 M), o qual fornece íons Na⁺ necessários para a fase de precipitação do DNA. Para uma melhor homogeneização, as amostras foram agitadas em vórtex a 3.748 xG por 15 segundos e após, centrifugadas a 17.400 xG por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico e adicionado 1 mL de etanol absoluto para a precipitação do DNA. Em seguida, foram homogeneizadas e centrifugadas por 5 minutos a 17.400 xG. O sobrenadante foi descartado e, posteriormente, o pélete foi lavado com 1 mL de etanol 95% e novamente centrifugado a 17.400 xG por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante, e o pélete foi mantido a temperatura

ambiente por 10 minutos ou até a completa evaporação do etanol absoluto. Após, o pélete foi ressuspendido em 100 µL de água ultrapura e armazenados a -20°C.

Novamente, as 180 amostras extraídas foram quantificadas, submetidas à eletroforese e diluídas para a concentração de trabalho, seguindo os detalhes apresentados no item 3.3., sendo todas aprovadas.

3.4 Seleção da região alvo

Em decorrência do trabalho conduzido por Rosário et al. (2012), QTL pleiotrópicos foram mapeados empregando-se o mapeamento por intervalo composto multivariado (multiCIM). Estes QTL foram identificados com base no mesmo conjunto de dados fenotípicos e genotípicos do presente estudo. Dentre tais QTL mapeados, quatro foram mapeados no cromossomo 1. A Tabela 3 apresenta detalhes destes QTL pleiotrópicos e as respectivas características que cada um controla.

A partir destes resultados, foram estabelecidos os seguintes critérios para a seleção preliminar da região alvo: 1) que contivesse evidência de no mínimo dois QTL ligados; 2) que apresentasse o maior valor de significância; 3) que estivesse associada a características de relevância à avicultura; e 4) que apresentasse o menor intervalo entre marcadores microssatélites.

Tabela 3 - QTL pleiotrópicos mapeados no cromossomo 1 da população TCTC. Valores em negrito são significativos

QTL	Posição (cM) ¹ (Cromossomo)	LOD	Características combinadas	LOD	a ²	LOD	d ³	LOD
1	173	20,58	PV41	3,67	48,05	3,66	3,27	0,02
			COR	1,79	0,26	1,73	-0,03	0,04
			GOR	2,33	-1,02	1,85	0,43	0,43
			CZ	1,74	-0,15	0,99	-0,12	0,82
2	203	20,47	PV41	3,59	38,36	2,83	17,85	0,98
			AS	2,13	-0,91	2,11	-0,11	0,05
			CAB	1,54	-0,43	1,20	0,16	0,26
			COR	1,71	0,23	1,70	0,03	0,05
			MOE	1,91	-0,70	1,89	-0,09	0,05
			GOR	1,39	-0,17	0,06	0,62	1,28
			PB	2,47	-0,25	0,36	-0,49	2,22
			EE	2,47	0,47	0,57	0,70	2,04
3	267	18,74	CZ	3,36	-0,19	1,88	-0,14	1,73
			PV41	1,46	24,98	1,38	5,40	0,11
			PEI	1,54	1,14	0,91	-0,68	0,56
			PES	3,07	-0,75	2,73	-0,23	0,44
			CAB	4,20	-0,69	3,70	-0,22	0,67
			MOE	3,38	-0,80	2,88	0,22	0,39
4	436	22,98	PB	1,78	-0,50	1,73	0,05	0,03
			PV41	3,03	50,15	3,00	-3,10	0,01
			PEI	2,92	-2,76	2,87	-0,51	0,09
			AS	1,83	0,96	1,45	-0,48	0,32
			PES	3,79	1,21	3,78	0,01	0,00
			INT	3,66	4,23	3,63	0,57	0,06
			MOE	3,24	1,07	2,76	-0,42	0,39
			COL	1,33	-3,93	1,10	1,71	0,19
			TC	1,56	-4,69	0,84	4,55	0,66

¹Posição do primeiro loco em função do mapa Consenso (SCHMID et al., 2005). ²Efeito aditivo: valores negativos e positivos correspondem à origem do alelo na linhagem de postura (CC) e linhagem de corte (TT), respectivamente. ³Efeito de dominância: valores negativos e positivos correspondem aos heterozigotos serem inferiores e superiores à média de seus parentais, respectivamente

Fonte: Adaptado de Rosário et al. (2012)

3.5 Genotipagem dos Parentais e F₁

O uso do *Beadchip* de SNPs de 60 k foi proposto para genotipar todos os animais da geração Parental (7 machos TT e 7 fêmeas CC) e F₁ (7 machos e 21 fêmeas). Dentre estes, somente 10 Parentais e oito (3 machos e 5 fêmeas) F₁ foram utilizados neste estudo, pois foram os fundadores das cinco famílias mais informativas da população TCTC, conforme descrito no item 3.1..

Os reagentes empregados no procedimento de genotipagem e os *Beadchips* de 60 k foram adquiridos por meio da *Illumina*[®]. Para a genotipagem, foi empregado o equipamento *HiScan*[™] SQ System dentro da linha de financiamento de Equipamentos Multi-Usuários (FAPESP), o qual encontra-se sediado no Laboratório de Biotecnologia Animal, ESALQ/USP, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho.

As etapas laboratoriais e as reações para processamento dos *Beadchips* seguiram as recomendações estabelecidas pelo fabricante do equipamento (ILLUMINA, 2009a) e são descritas a seguir.

3.5.1 Etapas da genotipagem empregando a tecnologia *Beadchip* 60k

Foram utilizados quatro *Beadchips* de SNP de 60 k (57.636 SNPs), em que cada *Beadchip* continha 12 spots para aplicação das amostras (12 amostras/*Beadchip*). Seguiu-se o protocolo *Infinium*[®] II Assay Super *Illumina*[®] para a utilização na plataforma *HiScan*[®] SQ System, a qual foi empregada no escaneamento destes (ILLUMINA, 2009a).

As etapas de processamento do *Beadchip* com as amostras de DNA foram realizadas em três dias, sendo as que se seguem: 1) pré-amplificação; 2) pós-amplificação e 3) leitura do *Beadchip* no equipamento (Figura 2).

Figura 2 – Sumário do processo de genotipagem empregando *Beadchip* de SNP
 Fonte: www.illumina.com

Primeiramente, foi realizada a amplificação isotérmica do DNA genômico por meio de polimerases termoestáveis. Cada *Beadchip*, também denominado de lâmina (Figura 3A), contém milhares de *beads* (Figura 3B) e cada *bead* possui milhares de sondas fixadas em sua superfície, sendo representativas para um mesmo SNP. Há uma redundância de até 30 repetições em uma mesma *bead* em cada painel de amostras, o que minimiza a chance de erros determinação do genótipo de cada animal para cada SNP.

A extensão de uma única base empregando terminadores marcados distintamente com duas fluorescências (verde: C/G e vermelha: T/A) permite a diferenciação entre os dois alelos de cada SNP (Figura 3C). A seguir, o *Beadchip* é escaneado no *HiScan™SQ System*, sendo, então, obtidas as imagens e seus respectivos genótipos visualizados com o uso do software *Illumina GenomeStudio*. Na Figura 3D, encontra-se ilustrada a imagem do escaneamento do *Beadchip*, visualizada pelo software *Illumina BeadStudio* sendo representadas as fluorescências verde e vermelha (homozigotos) e amarela (heterozigotos).

Figura 3 – Representação esquemática do processo de genotipagem por *Beadchips*

Fonte: Adaptado de Peiffer (acesso em 20 de maio 2013)

3.5.1.1 Amplificação genômica

Neste passo, foram adicionados 20 μL de solução tampão e 4 μL de cada amostra de DNA na concentração de 50 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (200 ng) em placa (MSA3) própria para o desenvolvimento do protocolo com capacidade volumétrica máxima de 0,8 mL. O DNA foi desnaturado com a adição de NaOH (0,1 N) e depois neutralizado com a adição do reagente disponibilizado pelo fabricante. Após, foi acrescentada uma solução para a amplificação isotérmica do DNA em aproximadamente 1.000 cópias por meio da polimerase termoestável. Nesta etapa, a placa MSA3 foi incubada em forno de hibridização (*Illumina Hyb Oven*) a 37°C por 16 horas (Figura 4A).

3.5.1.2 Fragmentação do produto amplificado

No segundo dia de protocolo, foi realizada a fragmentação enzimática do produto amplificado adicionando à placa uma solução para fragmentação do DNA (enzima de restrição *end point*). Este processo foi controlado, evitando, assim, um excesso de fragmentação da amostra, de forma a obter no final *amplicons* com tamanhos entre 300 - 600 pb. Para tanto, a placa foi incubada em bloco térmico previamente aquecido a 37°C por 1 hora (Figura 4B).

Figura 4 – (A) Etapa de fragmentação do produto amplificado em que a placa MSA3 foi incubada em bloco térmico previamente aquecido a 37°C por 1 hora. (B) Ilustração da placa MSA3 com as amostras no interior do forno de hibridização (*Illumina Hyb Oven*) utilizado para a amplificação genômica, em que permaneceu a 37°C por até 24 horas
Fonte: Arquivo pessoal

3.5.1.3 Precipitação e ressuspensão do DNA fragmentado

Foi adicionada uma solução de precipitação juntamente com o 2-propanol a 100% para precipitação do DNA fragmentado e posterior remoção dos resíduos de reagentes presentes na solução. Após incubação a 4°C e posterior centrifugação, a placa foi invertida rapidamente sobre vários papéis absorventes visando à eliminação da solução e permaneceu invertida por 1 hora para secagem do pélete precipitado (Figura 5). Em seguida, as amostras foram ressuspensas no *buffer* de hibridização, o qual forneceu condições ideais para hibridização dos fragmentos de DNA nas sondas das *beads*. Para tanto, a placa MSA3 foi novamente colocada no forno de hibridização (*Illumina Hyb Oven*) por 1 hora a 48°C para auxiliar na ressuspensão do DNA fragmentado.

Figura 5 – Placa MSA3 contendo os péletes precipitados (pontos azuis)

Fonte: Arquivo pessoal

3.5.1.4 Hibridização do DNA no *Beadchip*

A placa MSA3 foi colocada no bloco aquecedor a fim de desnaturar o DNA a 95°C para, em seguida, ser hibridizado no *Beadchip*. Para tanto, em cada *spot* contido no *Beadchip*, foram adicionados 15 µL do DNA ressuspendido (Figura 6A) e então, colocado na câmara de hibridização (Figura 6B) para ser incubado no forno *Illumina Hyb Oven* (48°C) por um período de 24 horas. Neste procedimento, ocorreu a hibridização covalente das amostras com os 57.636 locos específicos contidos no *Beadchip*, em que cada *bead* representa um alelo por loco de SNP.

(A)

(B)

Figura 6 – (A) Imagem do *Beadchip* 60 K com 12 *spots*. A seta vermelha representa um *spot* contendo uma amostra de DNA. (B) Câmara de hibridização contendo dois *Beadchips* totalizando 24 amostras para hibridização nas *beads*

Fonte: Arquivo pessoal

3.5.1.5 Extensão

No passo seguinte à hibridização, os *Beadchips* foram lavados com reagentes para retirada do DNA que não foi corretamente hibridizado ou foi inespecífico, juntamente com o DNA que não hibridizou em nenhuma *bead*. Na Figura 7A, está ilustrado o momento em que a fita de DNA molde hibridiza corretamente com a sonda presente na *bead*. Estão representados os três possíveis genótipos, porém por SNPs diferentes.

Depois, na superfície dos *Beadchips* foi adicionada uma solução que contém reagentes para iniciar a reação de extensão, seguida pelo acréscimo dos dNTPs modificados (sítio de incorporação para as moléculas fluorescentes) que foram incorporados ao final das sondas da *bead* (*single base extension*). Após esta etapa, ocorreu uma segunda desnaturação das fitas de DNA, a qual foi anteriormente hibridizada na sonda presente na *bead*, restando apenas às sondas com a base modificada incorporada na extremidade (Figura 7B).

Figura 7 – (A) Momento da hibridização da fita molde de DNA com as *beads* localizadas no *Beadchip*. Em detalhe (setas vermelhas) encontram-se ilustrados: dNTP modificado, DNA fita molde e sonda. (B) Instante em que a fita de DNA molde é retirada, permanecendo, então, as sondas ligadas à *bead*, juntamente com o dNTP modificado

Fonte: Adaptado de Illumina (2008b)

Em seguida, foram adicionadas, repetidamente, soluções próprias para que houvesse incorporação das moléculas que liberam fluorescência às bases modificadas, gerando amplificação do sinal de fluorescência. Depois, os *Beadchips* foram lavados e imersos em polímero de proteção quando, então, foram transferidos para dessecador por aproximadamente 50 minutos. Após este

procedimento, os *Beadchips* foram submetidos à leitura no equipamento *HiScan™SQ System* (Figura 8A), no qual foram expostos à incidência de laser e, após, à intensidade da fluorescência foi escaneada e quantificada (Figura 8B).

Figura 8 – (A) Equipamento *HiScan™SQ System* utilizado para genotipagem do *Beadchip* de SNPs. (B) Imagem capturada pela leitura do *Beadchip* de SNPs por meio da digitalização de sinais de fluorescência

Fonte: Arquivo pessoal

3.6 Seleção dos SNPs mais informativos

Depois de realizada a leitura dos *Beadchips* de SNPs pelo equipamento *HiScan™SQ System*, para visualização das imagens obtidas e avaliar a consistência dos dados, foi utilizado o programa *GenomeStudio™*. Empregando-se a opção de filtragem, selecionaram-se somente os SNPs localizados na região alvo do GGA1 das gerações Parentais e F₁. Nesta etapa, avaliou-se o sinal de fluorescência e qualquer possibilidade de erro entre agrupamentos de homozigotos e heterozigotos foram corrigidos.

Ainda com o auxílio do programa *GenomeStudio®*, foi possível exportar os arquivos obtidos na genotipagem para o formato que o programa *PLINK®* (v1.07) pudesse realizar algumas análises. Este programa, desenvolvido por Purcell et al. (2007), foi empregado tanto para a estimação da MAF (*Minor Allele Frequency*, Menor Frequência Alélica) quanto para testar a aderência às frequências genotípicas em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), considerando-se o modelo $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Esta etapa permitiu verificar excesso ou falta de heterozigotos por meio da estimação da heterozigosidade observada e

esperada sob EHW. Foi assumida como frequência genotípica mínima 0,1% e $p < 0,05$ com correção de Bonferroni (144 testes dependentes).

Posteriormente, foram gerados arquivos separados por geração (Parental e F_1) e por sexo (machos F_1 e fêmeas F_1), a fim de caracterizar genotipicamente estas duas gerações na região alvo selecionada empregando-se o programa *PLINK*[®]. E para a seleção dos SNPs mais informativos, que foram empregados na genotipagem dos animais da geração F_2 , somente foram utilizados os dados dos animais F_1 . Com o auxílio do programa *Excel*[®], os dados foram tabulados, organizados por geração e sexo e concatenados a fim de facilitar a seleção dos mais informativos.

Para tanto, os genótipos dos animais F_1 (3 machos e 5 fêmeas) foram empregados e, como critérios, foram utilizados:

1. **Sinal de fluorescência:** com o auxílio do programa *GenomeStudio*[®] foi possível a visualização de medidas relacionadas à eficiência de genotipagem de cada amostra (*Call Rate*) e de cada SNP (*Call Freq*), que são determinadas por meio das porcentagens dos SNPs com *ScoreGenCall* maior ou igual ao limite estabelecido. Foi assumido um limite de *ScoreGenCall* $\geq 0,15$.
2. **Proporção de genótipos perdidos e *Minor Allele Frequency* (MAF):** avaliadas pelo programa *PLINK*[®].
3. **Heterozigosidades observada e esperada:** foram determinadas pelo programa *PLINK*[®] em que foram determinadas as frequências alélicas dos dois alelos de cada SNP, heterozigosidades observada e esperada sob EHW e as respectivas probabilidades para o teste de aderência para cada SNP de cada animal.

Ainda empregando os genótipos dos animais F_1 (3 machos e 5 fêmeas), foi possível selecionar os 144 SNPs mais informativos. Para tanto, empregou-se uma estratégia que permitisse a seleção dos SNPs mais informativos levando-se em consideração a estrutura de famílias de F_1 , as quais compuseram a geração

F₂. Isto se deveu ao fato de que, ao se considerar as cinco famílias selecionadas em conjunto, um dado SNP podia ser informativo para uma família enquanto para outra não. Esta é uma característica intrínseca de uma população *outbred* ou parcialmente endogâmica, na qual, parte dos locos encontram-se em homozigose e outra parte em heterozigose em um dado animal.

A Tabela 4 resume as possibilidades de genótipos entre os animais que compuseram cada casal F₁ nas sete etapas de seleção dos SNPs.

Tabela 4 - Descrição das possibilidades de genótipos entre os animais de cada casal F₁ na seleção dos SNPs mais informativos

Etapas de seleção	Casais				
	A ¹	B	C	D	E
1 ^a	he/he ²	he/he	he/he	he/he	he/he
2 ^a	he/he	he/he	he/he	he/he	he/ho ²
3 ^a	he/he	he/he	he/he	he/ho	he/ho
4 ^a	he/he	he/he	he/he	he/ho	ho/ho
5 ^a	he/he	he/he	he/he	ho/ho	ho/ho
6 ^a	he/he	he/he	he/ho	he/ho	he/ho
7 ^a	he/he	he/he	he/ho	he/ho	ho/ho

¹As letras representam qualquer um dos cinco casais F₁ selecionados, a saber, (macho x fêmea): 7716 x 7978, 7716 x 7810, 7769 x 7816, 7822 x 7971 e 7822 x 7765, não estabelece nenhuma ordem. ²he/he = loco heterozigoto em ambos os animais de cada casal F₁ selecionado, he/ho = loco heterozigoto em um animal e homozigoto em outro animal de cada casal F₁ selecionado, ho/ho = loco homozigoto em ambos os animais de cada casal F₁ selecionado

A MAF e aderência ao EHW foram empregadas como critérios adicionais apenas a partir da 4^a etapa da Tabela 4, na qual podia ser selecionado pelo menos um casal ho/ho. Nesta situação, como havia um número maior de SNPs dentro do genótipo ho/ho para completar o total de 144 SNPs, tais SNPs foram ordenados por MAF (maior-menor), selecionando-se aqueles de maior MAF e que não desviaram do EHW.

Finalmente, os 144 SNPs foram selecionados e enviados para a *Illumina*[®] para que fossem sintetizados os ensaios customizados. Para este propósito, foram encaminhadas as seguintes informações de cada SNP selecionado: identificação no banco de dados *dbSNP* (NCBI); sequência flanqueadora contendo - 60 pb e + 60 pb a partir do SNP, posição em Mbp; versão do genoma na qual os SNPs foram anotados e orientação da fita (versão 2.1).

Todas as informações acima foram processadas pela *Illumina*[®] com o auxílio do programa *Assay Design Tool* (ADT) (dados disponíveis em <www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_goldengate_design.p

df>, acesso em: 20/05/13), o qual forneceu uma pontuação final (*score*) para cada SNP. Foram selecionados aqueles SNPs cujos *scores* foram mais próximos de 1, o que correspondeu a maior chance de que o ensaio customizado tivesse sucesso durante a genotipagem dos animais. Para aqueles SNPs com *score* menor que 0,5 estes foram substituídos. Finalmente, o arquivo foi enviado para *Illumina*[®] e os ensaios customizados sintetizados.

3.7 Genotipagem da geração F₂

A genotipagem dos 453 animais da geração F₂ empregou somente os 144 SNPs mais informativos localizados na região alvo e selecionados conforme descrito no item 3.5. Todas as etapas de genotipagem foram conduzidas no Instituto de Biociências (IB), localizado no campus da USP, em São Paulo, no Laboratório coordenado pela Professora Doutora Maria Rita dos Santos Passos Bueno. Foi utilizado o equipamento *BeadXpress*, o qual faz a leitura da placa contendo os SNPs previamente selecionados e que compuseram os ensaios customizados.

Esta genotipagem, empregando as 144 sondas, empregou a tecnologia *VeraCode GoldenGate* desenvolvida pela *Illumina*[®] (dados disponíveis em www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_goldengate_design.pdf, Acesso em: 20/05/13). Nesta tecnologia, o DNA de cada um dos animais foi hibridizado aos oligonucleotídeos, sendo estes considerados alelo-específicos. Após, ocorreu o anelamento e amplificação destes, e em seguida, foram submetidos à leitura no equipamento *BeadXpress* da *Illumina*[®].

3.7.1 Etapas da genotipagem empregando a tecnologia *BeadXpress*

Para tanto, os procedimentos foram desenvolvidos em dois dias e em cinco etapas: 1) ativação da fita de DNA, 2) extensão/ligação, 3) amplificação do DNA pela PCR, 4) hibridização e 5) leitura das sondas pelo equipamento *BeadXpress*.

Todas as amostras de DNA foram previamente quantificadas e diluídas para a concentração de 50 ng.µL⁻¹ para o uso no procedimento de genotipagem

empregando as 144 sondas. De cada amostra foram utilizados 5 μ L de DNA (250 ng).

3.7.1.1 Ativação da fita de DNA

Primeiramente, as amostras de DNA foram acondicionadas em uma placa de 96 poços. Em seguida, para o procedimento de ativação, foi adicionado em todas as amostras, um reagente contendo biotina visando tornar a fita de DNA biotinilada e esta foi incorporada aleatoriamente à fita de DNA (Figura 9). Após, foi adicionado isopropanol nas amostras para a precipitação do DNA biotinilado. Consequentemente, o que não foi incorporado à fita de DNA, foi removido evitando assim, a ocupação desnecessária do excesso de biotina em locais específicos de ligação entre a estreptavidina, presente na superfície das *beads* magnéticas, em um passo posterior. Depois, as amostras foram ressuspensas com a adição do reagente RS1 (solução de ressuspensão).

Figura 9 – Etapa de ativação da fita de DNA, em detalhe, adição de biotina marcando a fita aleatoriamente. Neste caso, o SNP é uma timina (T)

Fonte: Adaptado de Illumina (2009b)

3.7.1.2 Fase de extensão e ligação

Neste procedimento, foram adicionadas as *beads* magnéticas contendo em sua superfície a estreptavidina, a qual se liga às biotinas anteriormente incorporadas à fita de DNA, capturando-o (Figura 10A). Após, foi adicionado o reagente contendo todos os oligonucleotídeos (OPA - *Oligo Pool All*), abrangendo a adição de oligos: específicos para um determinado alelo (ASO - *Allele-Specific Oligo*) bem como foi adicionado um oligo específico para cada loco (LSO - *Locus-specific oligo*). Os oligos ASO e LSO foram sintetizados pela *Illumina*[®].

Figura 10 – (A) *Beads* magnéticas ligadas à fita de DNA biotilado por meio da estreptavidina localizada em sua superfície. (B) Anelamento por complementaridade dos oligonucleotídeos ASO (*primer* universal 1 e 2) e LSO (*primer* universal 3) à fita de DNA biotilada formando um *gap* entre eles
Fonte: Adaptado de Illumina (2009b)

Para cada SNP, foram sintetizados dois tipos de *primers* ASO (*primer* universal 1 e 2) a fim de permitir a identificação do SNP. Para tanto, estes *primers* diferiram somente no último nucleotídeo e foram complementares ao SNP de interesse.

O ASO foi composto por aproximadamente 20 pb referentes às sequências de bases contidas antes do SNP a ser identificado. Portanto, pelo fato de desconhecer qual alelo estava presente em determinada posição da região alvo deste trabalho, em cada animal, foi necessário que os dois *primers* fossem adicionados na reação, permitindo, assim, a efetiva genotipagem.

O LSO, composto por cerca de 20 pb após o SNP (*primer* universal 3), também se anelou à fita de DNA. Este *primer* foi o fator determinante para identificação do SNP, por possuir o *IllumiCode Address* (código). Para cada

marcador, foi sintetizado um LSO com um único *IllumiCode Address* e este foi identificado pelo equipamento *BeadXpress* em um passo seguinte. Este oligo tem como distância, a contar da última base do ASO e a sua primeira base, aproximadamente 20 pb conferindo, então, uma lacuna entre estes dois *primers* (Figura 10B).

Em seguida, foi adicionado às amostras o *mix* para a reação de extensão e ligação (MEL – *Master Mix Extension/Ligation*), o qual contém duas enzimas importantes para esta etapa: a polimerase e ligase. A polimerase realizou a extensão dos oligos específicos (ASO e LSO), e a enzima ligase, uniu estes *primers*, onde se encontrava a lacuna.

3.7.1.3 Amplificação do DNA biotinilado

Neste procedimento, ocorreram as seguintes etapas: a) inoculação da PCR, b) ciclo da PCR e c) ligação na PCR.

Durante a inoculação da PCR, com a adição das *beads* magnéticas, ocorreu a captura do DNA previamente biotinilado, em que o excesso de DNA juntamente com os reagentes, foi retirado por meio da lavagem com a adição do *buffer*. Após, foram dissociadas as *beads* das fitas de DNA e adicionados os reagentes para que fosse recuperado o DNA que estava ligado as *beads* magnéticas. Este processo foi realizado com o auxílio da placa magnética, sendo o sobrenadante (*mix* e oligonucleotídeos) descartado.

Em seguida, foi adicionado um reagente contendo um conjunto de *primers* universal (1 e 2), porém estes não estavam em conjunto com ASOs. A diferença destes, é que possui em sua composição, o fluoróforo Cy3 e Cy5, coloração verde e vermelha, respectivamente. Adicionou-se também o reagente que continha um diferente *primer* universal 3 e este era biotinilado e também não se encontrava em associação com o LSO.

Na etapa da PCR, ao contrário do que comumente ocorre, apenas uma das fitas foi amplificada com orientação do *primer* universal 3 adicionado no primeiro ciclo da PCR. Entretanto, este *primer* foi sintetizado na orientação contrária (3'-5') e somente foram obtidos *amplicons* associados à biotina, e esta, presente no *primer* universal 3. Porém, depois de realizada a etapa de

anelamento, a PCR prosseguiu de forma convencional, com o intuito de produzir fitas contendo este oligo biotinilado em um total de 34 ciclos.

Os *primers* universal 1 e 2 foram anelados conforme a complementaridade das sequências antes do SNP a ser avaliado, pois estes oligos foram sintetizados na orientação correta (5'-3').

Em um passo seguinte, foram adicionadas aos *amplicons*, novas *beads* magnéticas, anteriormente empregadas, visando, novamente, capturá-los, porém, agora, em fita dupla.

3.7.1.4 Hibridização do DNA às sondas

Finalizada a etapa da PCR, iniciou-se a fase de hibridização. As amostras, anteriormente ligadas as *beads* magnéticas por meio da presença de biotina no *primer* universal 3 e este ligado a uma das fitas de DNA, foram, então, adicionadas a uma placa-filtro.

Para tanto, foi acrescentado o hidróxido de sódio (NaOH) aos pocinhos, visando a dissociação das fitas de DNA. Com o auxílio da placa-filtro, foi possível reter as *beads* magnéticas ligadas o DNA associado o *primer* biotinilado. Neste momento, a fita ligada ao *primer* com fluoróforo atravessou o filtro, e foi retida no fundo do pocinho da placa que estava abaixo.

Em um passo seguinte, para a hibridização do DNA marcado às sondas (*VeraCode bead*), os produtos da PCR foram adicionados a uma placa contendo as sondas (144 sondas em cada um dos 96 pocinhos) previamente identificadas com seus respectivos *Illumicode* (códigos de sequência) e estes específicos para cada loco.

3.7.1.5 Leitura dos fluoróforos

Após a etapa de hibridização, as placas contendo as sondas hibridizadas ao DNA foram submetidas à leitura no equipamento *BeadXpress*. Este procedimento foi composto por incidência de um *laser* nas amostras a fim de excitar o fluoróforo (verde ou vermelho) e gerando, assim, as imagens de cada um dos SNPs presentes nos ensaios. Para cada animal, foi determinado seu respectivo genótipo da seguinte forma: homozigoto (fluoróforos verde ou vermelho) e heterozigoto (fluoróforos verde e vermelho).

Os genótipos dos animais da geração F₂ foram avaliados seguindo os mesmos critérios e procedimentos descritos no item 3.6.

3.8 Construção dos blocos de haplótipos

Após a análise dos dados genotípicos dos animais das gerações Parentais, F₁ e F₂ pelos programas *GenomeStudio*[®] e *PLINK*[®], estes foram salvos no formato compatível para a leitura no programa *Haploview version 4.2* (BARRETT et al., 2005) por meio do *plugin Haploview Input Report 2.0.0*, instalado no *GenomeStudio*[™] (ILLUMINA, 2006) também disponível pela *Illumina*[®].

O *Haploview version 4.2* foi empregado com a finalidade de verificar se os SNPs comporiam blocos de haplótipos a fim de se conhecer a dinâmica destes blocos ao longo das três gerações da população TCTC. Além de fornecer um conjunto abrangente de ferramentas para análise de haplótipos e informações de desequilíbrio de ligação (DL), este programa apresenta como características essenciais à obtenção de estatísticas para qualidade de marcador, frequências de haplótipos na população e estatísticas de associação com SNPs.

O DL estimado pelo *Haploview version 4.2* se baseia no quadrado das correlações entre as frequências alélicas dos locos, denominado de r^2 (BARRETT et al., 2005) para cada par de SNP. Adicionalmente, por meio de sua interface gráfica, foi possível visualizar os blocos de haplótipos com seus respectivos tamanhos bem como os níveis de DL ao longo da região alvo. Neste estudo, o r^2 foi escolhido como medida de DL por ser considerado de interesse no caso de marcadores bialélicos, como é o caso dos SNPs, pela facilidade de interpretação (varia entre 0 – azul escuro a 1 – vermelho) e devido ao fato de não ser dependente do tamanho da amostra (DEVLIN; RISCH, 1995).

Os blocos de haplótipos foram definidos de acordo com a regra dos quatro gametas (WANG et al., 2002). Esta regra emprega as frequências populacionais dos quatro haplótipos possíveis em cada um dos pares de SNP. Para cada par de marcador, as frequências populacionais dos quatro possíveis haplótipos de dois marcadores são computadas. Se todos os quatro haplótipos forem observados com frequência de pelo menos 1%, uma recombinação é

considerada como ocorrida. Portanto, o bloco inicialmente construído é finalizado e um novo bloco terá início até a presença de uma nova recombinação e, assim, sucessivamente (WANG et al., 2002).

Foram considerados os seguintes critérios pelo programa *Haploview version 4.2* durante a construção dos blocos: $MAF > 0,05$, $EHW > 0,001$ e genotipagem $> 75\%$ e distância mínima entre os blocos = 0 kb, de acordo com Luo et al. (2013b).

3.9 Testes de associação

Os genótipos provenientes de cada SNP foram convertidos em 0 (AA), 1 (AB) e 2 (BB) para que os testes de associação pudessem ser conduzidos no PROC GLM (SAS, 2007). Considerou-se a análise de marcas individuais univariada por meio do seguinte modelo de regressão:

$y_m^* = \beta_0 + \beta_1 SNP_m + \beta_2 SNP_m^2 + e_m$, em que y_m^* : resíduo da modelagem fenotípica (e_{ijk_m}) no $m^{ésimo}$ animal, β_0 : intercepto, β_1 e β_2 : coeficientes de regressão dos efeitos aditivo (linear) e de dominância (quadrático), respectivamente, SNP_m e SNP_m^2 : genótipo do $m^{ésimo}$ animal; e e_m : erro aleatório.

Inicialmente, o modelo de regressão considerou ambos os efeitos aditivo (linear) e de dominância (quadrático) à $p < 0,05$. Quando o efeito de dominância não foi significativo ($p > 0,05$), este foi excluído do modelo, permanecendo apenas o aditivo.

Para evidenciar os SNPs significativamente associados aos fenótipos considerados neste estudo, foram construídos gráficos, à semelhança do gráfico *Manhattan Plot*, empregando-se o programa *Excel®*. Os valores das probabilidades (*p-valores*) obtidos para cada uma das 144 análises de marcas individuais foram transformadas por meio de $-\log_{10}(p - \text{valores})$, em que SNPs fortemente associados às características apresentam *p-valores* pequenos e, conseqüentemente, seus respectivos $-\log_{10}$ serão elevados. Foram

considerados quatro níveis de probabilidade ($-\log_{10}$), a saber: $p < 0,05$ (1,30), $p < 0,01$ (2,00), $p < 0,001$ (3,00) e com correção de Bonferroni, isto é, $0,05 / 144$, o que corresponde a $p < 0,0003472$ (3,46) e somente plotados nos gráficos os SNPs significativos.

3.10 QTL e genes candidatos

Foram conduzidas buscas no banco de dados da *Chicken Quantitative Trait Loci database - ChickenQTLdb* (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>) a fim de verificar os QTL localizados nestes dois intervalos, previamente mapeados por outros estudos.

A seguir, realizou-se a busca *in silico* por genes candidatos posicionais e funcionais na região dos QTL pleiotrópicos 1 e 2 empregando-se um intervalo de 10 cM, sendo 5 cM antes e 5 cM após a posição para cada um dos QTL (PINARD-VAN DER LAAN et al., 2009). A posição dada em cM foi transformada em Mpb por meio da relação de 1:0,341 cM:Mpb. Portanto, o primeiro intervalo foi delimitado entre $168 \leftarrow 173 \rightarrow 178$ cM ($57,2 \leftarrow 59,0 \rightarrow 60,7$ Mpb), enquanto que para o segundo, compreendeu de $198 \leftarrow 203 \rightarrow 208$ cM ($67,5 \leftarrow 69,2 \rightarrow 70,9$ Mpb).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fenótipos

Para cada uma das 24 características fenotípicas mensuradas na população TCTC (descritas no item 3.1.), foram obtidas estatísticas descritivas que são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Descrição dos dados fenotípicos da população TCTC

Característica	N	Média	Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo
Peso vivo 41 d (g) (PV41)	453	1.006,54	186,96	407,00	1.686,00
Ganho de peso 35-41 d (g) (GP3541)	450	219,92	66,94	39,00	390,00
Consumo de ração 35-41 d (g) (CR3541)	453	605,27	139,87	258,00	1.176,00
Conversão alimentar 35-41 d (g/g) (CA3541)	450	2,93	0,86	1,52	8,20
Comprimento do intestino (cm) (INT)	452	151,38	14,95	111,00	204,00
Peso dos pés (g) (PES)	452	39,53	8,99	16,00	73,00
Peso das pernas (g) (PER)	453	208,49	44,73	67,00	354,00
Peso do peito (g) (PEI)	453	158,75	34,87	55,00	303,00
Peso da cabeça (g) (CAB)	452	34,56	6,00	18,00	55,00
Peso das asas (g) (AS)	453	80,33	14,82	31,00	127,00
Peso do dorso (g) (DOR)	453	183,04	38,61	75,00	334,00
Peso da carcaça (g) (CAR)	453	630,62	129,31	234,00	1.104,00
Peso do fígado (g) (FIG)	452	26,35	5,23	15,00	49,00
Peso do coração (g) (COR)	451	6,47	1,69	2,00	12,00
Peso da moela (g) (MOE)	452	23,38	4,38	13,00	39,00
Peso dos pulmões (g) (PUL)	452	8,07	2,21	3,00	14,00
Valor hematócrito (%) (HEM)	449	28,19	2,98	19,00	42,00
Peso da gordura abdominal (g) (GOR)	453	14,74	7,21	0,00	39,00
Teor de colesterol (mg.dL ⁻¹) (COL)	444	103,95	19,83	44,27	298,80
Teor de triglicerídeos (mg.dL ⁻¹) (TRI)	440	31,16	15,12	2,44	143,19
Triglicerídeos + colesterol (mg.dL ⁻¹) (TC)	436	135,04	28,65	74,87	396,06
Proteína bruta na matéria seca (%) (PB_MS)	424	51,20	3,04	42,21	62,76
Extrato etéreo na matéria seca (%) (EE_MS)	424	39,37	4,67	24,38	52,83
Cinzas na matéria seca (%) (CZ_MS)	424	7,43	1,00	5,07	11,06

As características avaliadas apresentaram variabilidade fenotípica em virtude de esta população ter sido obtida a partir de cruzamentos entre machos de uma linhagem de corte (TT) e fêmeas de uma linhagem de postura (CC), as quais eram divergentes para crescimento e desenvolvimento muscular (Tabela 5).

A variabilidade fenotípica contém dois componentes: a variabilidade genotípica e a ambiental. A primeira foi alvo de Rosário et al. (2009), os quais estimaram os parâmetros PIC (*Polymorphism Information Content* - Conteúdo de Informação Polimórfica), número de alelos e heterozigosidades observada e

esperada sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Estes autores evidenciaram que houve incremento destes parâmetros na geração F_1 em decorrência dos cruzamentos conduzidos entre as linhagens TT e CC. Consequentemente, esta variabilidade permitiu que diversos trabalhos fossem conduzidos visando mapear QTL (NONES et al., 2006; AMBO et al., 2009; CAMPOS et al., 2009; BARON et al., 2010; NONES et al., 2012) e associar SNPs (FELÍCIO et al., 2013a, b; BOSCHIERO et al., 2013) com os fenótipos previamente avaliados.

Abasht et al. (2006) apresentaram uma revisão sobre mapeamento de QTL em galinha, na qual pode ser consultada uma classificação hierárquica de características fenotípicas que tem sido mensurada em várias populações delineadas para mapeamento de QTL bem como as linhagens empregadas para esta finalidade.

4.2 Modelagem fenotípica

Inicialmente, foram testadas cinco estruturas de matriz de co(variância), combinadas entre si, conforme detalhado no item 3.2.1.. Entretanto, foram selecionadas apenas duas estruturas: componentes de variância (VC) e auto-regressiva de primeira ordem AR(1) em função de esta seleção ter sido baseada no menor valor de BIC tanto para a matriz $G\sigma^2$ (incubação) quanto para $R\sigma^2$ (erro).

Na Tabela 6, encontram-se as combinações selecionadas para cada característica. Como os valores de BIC não podem ser comparados entre duas características quaisquer, optou-se por apresentar apenas as combinações das estruturas de co(variância) selecionadas para a obtenção dos resíduos (e_{ijkn}), os quais foram empregados nos testes de associação.

A melhor combinação de estruturas de co(variância) foi auto-regressiva de primeira ordem (AR1) para modelagem da matriz $G\sigma^2$ (incubação) e componentes de variância (VC) para a matriz $R\sigma^2$ (erro). Esta combinação foi empregada na obtenção dos resíduos para nove características (INT, CAB, FIG, COR, AS, PER, PEI, CR3541 E CA3541). Para as outras 15 características, a melhor combinação foi componentes de variância (VC) tanto para modelar a matriz $G\sigma^2$ quanto para a matriz $R\sigma^2$ (Tabela 6).

Tabela 6 - Combinações entre as matrizes de co(variância) baseado nos menores valores de BIC para cada característica avaliada

Característica	Estrutura co(variância) ^a	
	Matriz $G\sigma^2$ (incubação)	Matriz $R\sigma^2$ (erro)
Sem covariável		
PV41	VC	VC
COL	VC	VC
INT	AR(1)	VC
TRI	VC	VC
TC	VC	VC
PB_MS	VC	VC
EE_MS	VC	VC
CZ_MS	VC	VC
Covariável PV42		
CAB	AR(1)	VC
PES	VC	VC
FIG	AR(1)	VC
COR	AR(1)	VC
MOE	VC	VC
AS	AR(1)	VC
PER	AR(1)	VC
PEI	AR(1)	VC
DOR	VC	VC
CAR	VC	VC
GOR	VC	VC
PUL	VC	VC
HEM	VC	VC
Covariável PV35		
GP3541	VC	VC
CR3541	AR(1)	VC
CA3541	AR(1)	VC

^aVC: componentes de variância e AR(1): auto-regressiva de primeira ordem

A estrutura AR1 se mostra interessante do ponto de vista biológico, pois considera que a correlação entre cada incubação adjacente é reduzida ao longo do tempo ($r^1, r^2, r^3, \dots, r^{17}$), ou seja, ela considera maior correlação entre duas quaisquer incubações adjacentes e menor correlação entre duas quaisquer incubações distantes.

Rosário et al. (2013) empregaram forma similar de modelagem fenotípica, porém utilizando fenótipos da população recíproca CTCT, a fim de implementar o mapeamento por intervalo composto (CIM). Já o mapeamento de QTL envolvendo dados longitudinais simulados foi conduzido por Macgregor et al. (2005) e com dados reais de gado leiteiro por Rodriguez-Zas et al. (2002). Embora a estrutura

de co(variância) AR1 não tenha sido avaliada em ambos os trabalhos, no presente estudo esta estrutura foi a escolhida para algumas características, pois apresentou o menor valor de BIC (Critério de Informação Bayesiana), isto é, o modelo final apresentou o mais alto nível de informação com o menor número de parâmetros.

Em um passo seguinte, foram obtidos os resíduos (e_{ijkm}), os quais apresentaram valores positivos ou negativos devido ao fato de representarem um desvio em relação ao valor do fenótipo original, excluindo-se os efeitos fixos de família e sexo e aleatório de incubação, os quais não são de interesse durante a condução dos testes de associação.

4.3 Correlação fenotípica

Em virtude de este trabalho se alicerçar em testes de associação por meio da saturação com SNPs de uma região do cromossomo 1, onde previamente foram mapeados QTL pleiotrópicos e supostamente ligados por Rosário et al. (2012), foram estimadas as correlações fenotípicas para as 24 características (Quadro 1).

Do total esperado de 552 correlações (24 características x 23 pares), 236 foram significativas (42,7%) e 289 (57,3%) não significativas. Porém, os valores únicos correspondem à metade do total, ou seja, 276 correlações, pois generalizando, a correlação estimada para as variáveis X e Y é igual àquela estimada para Y e X. As correlações positivas e negativas totalizaram 60 e 58, respectivamente, ou seja, metade das 236 citadas anteriormente.

A característica que apresentou maior número de correlação significativa foi PB_MS, a qual se correlacionou com 17 características, a saber: PV41, GP3541, CR3541, INT, PES, PEI, CAB, AS, DOR, CAR, MOE, GOR, COL, TRI, TC, EE_MS e CZ_MS (Quadro 1).

O maior valor estimado de correlação fenotípica, pelo Quadro 1, foi entre EE_MS e PB_MS (-0,90), sendo considerada uma correlação alta e inversa (negativa). Isso significa que ao incrementar a porcentagem de EE_MS, pode-se reduzir a porcentagem de PB_MS ou vice-versa.

O conhecimento do sinal (direção) e valor (magnitude) da correlação é importante, pois a seleção para determinada característica pode conduzir resposta positiva ou negativa em outra que esteja geneticamente correlacionada. Portanto, para fins de melhoramento, seria de interesse aumentar PB_MS e reduzir EE_MS, porém baseada na correlação genética e não somente na fenotípica.

Pelo fato de as 5 famílias de irmãos-completos F_1 terem sido selecionadas com base na genotipagem seletiva, na qual considerou-se o peso vivo 42 dias como característica padrão, foi surpreendente evidenciar que PV41 apresentou correlação significativa com apenas seis características (GP3541, CR3541, CA3541, PB_MS, EE_MS e CZ_MS) (Quadro 1). Um argumento para este resultado reside no fato de a geração F_2 , na qual foram mensuradas todas as características de interesse, ter sido oriunda de cruzamentos entre as linhagens TT e CC, resultando em um maior nível de variabilidade fenotípica. De fato, pela Tabela 5, observa-se que o peso mínimo e máximo foi de 407 e 1.686 g, respectivamente, ou seja, uma diferença de 1.279 em F_2 .

Rosário et al. (2007), empregando a população recíproca da utilizada neste estudo, obtiveram valores superiores para a correlação entre PV41 e GP3541 (0,76), PV41 e CR3541 (0,63) e GP3541 e CR3541 (0,71). Este fato pode ser devido ao diferente cruzamento empregado (machos CC e fêmeas TT) e também ao número de animais empregados nas análises (~ 1.800 F_2).

Pinto (2007), empregando a mesma população F_2 deste estudo, estimou a correlação fenotípica para características de desempenho, carcaça e hematócrito dos resíduos após excluir os efeitos de família, sexo e incubação. Por exemplo, a característica PV42 se correlacionou com PPés (peso de pés), PCx (peso de coxas), PP (peso de peito), PCa (peso de cabeça), PA (peso de asas), PC (peso de carcaça) e PCR (peso de coração). Estas correlações variaram entre 0,80 – 0,99, sendo consideradas altas e positivas. Já as estimativas entre H (hematócrito) x PM (peso de moela) e H x PA foram consideradas baixas (0,01) e positivas. Os resultados deste estudo corroboram em partes àqueles de Pinto (2007), pois HEM também apresentou valores baixos de correlação, porém entre características diferentes, sendo elas: GP3541, CR3541 e CA3541, apresentando valores de 0,20, 0,13, -0,15, respectivamente (Quadro 1).

	PV41	GP3541	CR3541	CA3541	INT	PES	PER	PEI	CAB	AS	DOR	CAR	FIG	COR	MOE	PUL	HEM	GOR	COL	TRI	TC	PB MS	EE MS	CZ MS	
PV41		0,34	0,23	-0,26	0,001	0,02	0,01	-0,01	-0,004	-0,001	-0,01	0,01	0,005	0,02	0,02	-0,01	0,06	-0,003	-0,03	0,06	0,01	-0,40	0,44	-0,38	
GP3541	<0,0001		0,57	-0,74	-0,11	-0,07	0,18	-0,03	0,003	-0,01	0,03	0,12	-0,13	0,08	-0,05	-0,06	0,20	0,05	-0,05	-0,001	-0,04	-0,11	0,16	-0,17	
CR3541	<0,0001	<0,0001		-0,09	0,04	-0,10	0,16	-0,08	0,03	-0,03	0,08	0,10	-0,006	0,07	-0,08	-0,04	0,13	0,07	-0,04	-0,01	-0,04	-0,20	0,20	-0,19	
CA3541	<0,0001	<0,0001	ns		0,13	0,04	-0,09	-0,01	-0,01	0,02	0,02	-0,05	0,15	-0,03	0,02	0,08	-0,15	-0,02	0,02	-0,03	-0,01	0,08	-0,11	0,10	
INT	ns	0,0227	ns	0,0062		0,05		-0,15	-0,20	-0,03	-0,09	-0,21	-0,35	0,24	0,07	0,23	-0,06	-0,09	-0,11	-0,18	-0,02	-0,14	0,12	-0,11	0,14
PES	ns	ns	0,0327	ns	ns		0,06	-0,19	0,27	0,32	-0,21	-0,11	0,13	0,10	0,28	-0,0004	0,001	-0,41	-0,001	-0,03	-0,02	0,32	-0,37	0,34	
PER	ns	<0,0001	0,0006	ns	0,0011	ns		0,05	0,10	0,16	-0,06	0,60	-0,19	0,03	-0,12	0,07	0,07	0,02	0,02	-0,07	-0,04	-0,003	0,02	-0,07	
PEI	ns	ns	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns		-0,09	0,01	-0,06	0,50	-0,24	-0,07	-0,16	0,03	-0,06	-0,08	-0,001	-0,03	-0,01	0,10	-0,13	0,04	
CAB	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001	0,0354	ns		0,14	-0,02	0,03	-0,15	0,15	0,15	-0,02	-0,03	-0,19	0,005	-0,04	-0,02	0,12	-0,13	0,11	
AS	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001	0,0005	ns	0,0022		-0,11	0,27	-0,07	-0,01	0,09	0,09	-0,07	-0,27	0,11	-0,08	0,04	0,19	-0,27	0,16	
DOR	ns	ns	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	0,0222		0,52	-0,10	0,06	-0,24	0,32	0,04	0,38	0,09	0,02	0,08	-0,31	0,32	-0,20	
CAR	ns	0,0137	0,0276	ns	<0,0001	0,0250	<0,0001	<0,0001	ns	<0,0001	<0,0001		-0,31	0,02	-0,28	0,28	0,02	0,13	0,09	-0,06	0,03	-0,10	0,09	-0,10	
FIG	ns	0,0069	ns	0,0017	<0,0001	0,0045	<0,0001	<0,0001	0,0015	ns	0,0287	<0,0001		0,15	-0,003	0,05	-0,08	0,009	0,08	0,20	0,17	-0,0005	-0,01	0,06	
COR	ns	ns	ns	ns	ns	0,0314	ns	ns	0,001	ns	ns	ns	0,0013		0,11	0,09	0,08	-0,02	0,11	0,06	0,11	0,05	-0,004	-0,001	
MOE	ns	ns	ns	ns	<0,0001	<0,0001	0,0083	0,0005	0,0017	ns	<0,0001	<0,0001	ns	0,0147		0,006	0,05	-0,25	-0,08	-0,03	-0,07	0,24	-0,28	0,25	
PUL	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns		0,05	0,04	0,11	-0,04	0,06	0,05	-0,03	0,02	
HEM	Ns	<0,0001	0,0051	0,0011	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		0,05	-0,01	-0,03	-0,01	-0,06	0,08	-0,04	
GOR	Ns	ns	ns	ns	0,0224	<0,0001	ns	ns	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0046	ns	ns	<0,0001	ns	ns		0,05	0,07	0,07	-0,54	0,63	-0,45	
COL	Ns	ns	ns	ns	0,0001	ns	ns	ns	ns	0,0228	ns	ns	ns	0,0186	ns	0,0221	ns	ns		0,26	0,84	-0,11	0,09	-0,08	
TRI	Ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns	ns	ns	ns	<0,0001		0,74	-0,11	0,12	-0,12	
TC	Ns	ns	ns	ns	0,0025	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,0004	0,0200	ns	ns	ns	ns	<0,0001	<0,0001		-0,14	0,13	-0,12	
PB MS	<0,0001	0,0241	<0,0001	ns	0,0159	<0,0001	ns	0,0429	0,0179	0,0001	<0,0001	0,0376	ns	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	0,0225	0,0247	0,0051		-0,90	0,56	
EE MS	<0,0001	0,0009	<0,0001	0,0191	0,0224	<0,0001	ns	0,0095	0,0064	<0,0001	<0,0001	ns	ns	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	0,0145	0,0113	<0,0001		-0,71	
CZ MS	<0,0001	0,0003	<0,0001	0,0359	0,0052	<0,0001	ns	ns	0,0253	0,0001	<0,0001	0,0320	ns	ns	<0,0001	ns	ns	<0,0001	ns	0,0131	0,0179	<0,0001	<0,0001		

Quadro 1 – Correlações fenotípicas das 24 características avaliadas (valores acima da diagonal) e seus respectivos valores de probabilidade (valores abaixo da diagonal)

PV41: peso vivo 41 dias; GP3541: ganho de peso 35-41 dias; CR3541: consumo de ração 35-41 dias; CA3541: conversão alimentar 35-41 dias; CAR: peso da carcaça; PEI: peso de peito; PER: peso de pernas; AS: peso das asas; DOR: peso do dorso; PES: peso dos pés; CAB: peso da cabeça; INT: comprimento do intestino; COR: peso do coração; MOE: peso da moela; FIG: peso do fígado; PUL: peso do pulmão; GOR: peso da gordura abdominal; HEM: valor de hematócrito; COL: teor de colesterol no plasma; TRI: teor de triglicerídeos no plasma; TC: triglicerídeos + colesterol no plasma; PB: proteína bruta na matéria seca; EE: extrato etéreo na matéria seca; CZ: cinzas na matéria seca. ns: valores não significativos referentes aos seus valores de probabilidade ($p < 0,05$). Correlações positivas e significativas (valores sombreados) e negativas significativas (valores em negrito)

4.4 Seleção da região alvo

A partir dos critérios estabelecidos e descritos no item 3.4., inicialmente foi selecionada a região destacada em vermelho na Figura 11, onde foram mapeados dois QTL pleiotrópicos (dois primeiros picos na linha preta). Quando se analisam detalhadamente as curvas marginais, representadas próximas ao eixo X, de cada um destes dois QTL pleiotrópicos, evidencia-se que há curvas para duas características distintas, por exemplo, peso da gordura abdominal (linha azul no primeiro QTL) e peso vivo 41 dias (linha vermelha no segundo QTL). Esta interpretação gráfica é um indício de que tais QTL estejam ligados e, seguindo este mesma ideia, outras combinações podem ser feitas nesta mesma região.

Figura 11 – QTL pleiotrópicos mapeados no GGA1 na linha preta. O eixo X representa o mapa de ligação, em que a posição zero é igual a 66 cM (SCHMID et al., 2005) e os triângulos (▲) correspondem à posição dos marcadores microssatélites no mapa; no eixo Y a linha tracejada/pontilhada corresponde ao nível de significância da curva multivariada (LOD=17,0) e a linha pontilhada corresponde ao nível de significância das curvas marginais (LOD=1,30) associadas a cada característica avaliada. A caixa em vermelho representa a região alvo deste estudo (ROSÁRIO et al., 2012)

Pela Tabela 3, apresentada no item 3.4., evidencia-se que os dois QTL pleiotrópicos distam de 30 cM, ou seja, encontram-se no limiar de serem considerados ligados, à semelhança de raciocínio quando da construção de mapas de ligação empregando-se marcadores microssatélites, por exemplo. Este

é um argumento adicional para que esta região fosse preliminarmente selecionada.

Finalmente, a região alvo foi definida assumindo-se 5 cM antes da posição do primeiro QTL pleiotrópico ($168 \leftarrow 173$ cM) e 5 cM após a posição do segundo QTL pleiotrópico ($203 \rightarrow 208$ cM). Esta distância foi baseada no trabalho de Pinard-van der Laan et al. (2009), que mapearam QTL associados com a resistência à coccidiose na galinha doméstica.

Assim, a região alvo definida compreendeu 40 cM ($168 - 208$ cM) no cromossomo 1, onde 1 cM corresponde a 0,341 Mpb (SCHMID et al., 2005; NCBI, *MapView*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>), equivalendo 13,6 Mbp. Este intervalo permitiu que com o adensamento proposto de 144 SNPs, a fim de saturar tal região, fosse possível posicionar, teoricamente, 3,6 SNPs por cM (144 SNPs/ 40 cM).

Considerando-se que a distância de ligação na galinha seja, em média, três vezes maior que nos mamíferos (1 Mpb / 1 cM), os resultados obtidos por Qanbari et al. (2010) com o *Beadchip* de 60 k sugerem que, o espaçamento de SNPs deva ser de ~ 100 kbp e ~ 35 kbp para linhagens comerciais de ovos brancos e marrons, respectivamente. Portanto, levando-se em conta que a região alvo do presente estudo compreende 13,6 Mpb, seriam necessários 136 SNPs para um adensamento seguindo as sugestões destes autores.

Por outro lado, Wragg et al. (2012) estimaram o desequilíbrio de ligação empregando o *Beadchip* de 60 k e evidenciaram $r^2 \geq 0,3$ em raças melhoradas e não melhoradas de galinha com blocos de haplótipos de tamanho ~ 10 kbp. Ainda relataram que para se conduzir o mapeamento associativo, uma vez que a galinha possui genoma ~ 1 Gbp, seriam necessários entre 90-100 mil SNPs em função da composição genética, estrutura e tamanho da população disponível bem como da informatividade dos SNPs. Seguindo a sugestão proposta por estes autores, na região alvo deste estudo, seriam necessários ~ 1.300 SNPs em 40 cM (13,6 Mbp), ou seja, uma densidade 9 vezes maior do que a efetivamente empregada. Daí a necessidade de se empregar chips de maior densidade, como por exemplo, o de 600 k (KRANIS et al, 2013).

Portanto, ainda não há um consenso sobre a densidade de SNPs a ser utilizada em mapeamento associativo na galinha doméstica. Dessa forma,

assumiu-se que o adensamento proposto, nesta primeira abordagem, permitiria determinar a extensão do desequilíbrio de ligação na região alvo ao longo das três gerações da população TCTC baseada na construção de blocos de haplótipos (item 3.7.) e, a seguir, conduzir os testes de associação (item 3.8.).

4.5 Descrição dos SNPs na região alvo

A caracterização genotípica das gerações Parental (TT e CC) e F_1 da população TCTC empregando o *Beadchip* de 60 k é pioneira. Assim, o banco de dados genotípicos gerado propiciará que estratégias genômicas, como por exemplo, mapeamento fino e testes de associação, possam ser efetivamente implementadas, por cobrirem praticamente todo o genoma da galinha doméstica com marcadores SNP.

O total de SNPs contido no *Beadchip* foi de 57.636 e estavam distribuídos ao longo do genoma, a saber, nos autossômicos GGA1-28, nos cromossomos sexuais GGAZ e GGAW e nos grupos de ligação E22C19W28_E50C23 e E64. Deste total, 1.098 SNPs foram considerados como normalizadores do sinal de fluorescência durante a etapa de escaneamento pelo equipamento *HiScan™SQ System*. Portanto, o total de SNPs efetivamente disponíveis foi de 56.538 SNPs. Especificamente no GGA1, objeto deste estudo, foram posicionados 9.059 SNPs e, como este cromossomo é o maior do genoma da galinha, compreendendo 200,4 Mpb, cada SNP, portanto, encontrava-se a uma distância média de 22,1 kpb.

Todos os animais genotipados obtiveram uma *Call Rate* $\geq 0,90$, exceto um macho da geração F_1 (anilha 7822), cujo valor foi de 0,77. A *Call Rate* é uma medida ampla referente a cada animal e que reflete a porcentagem de SNPs que apresentaram *ScoreGenCall* $\geq 0,15$, ou seja, com sinal de fluorescência detectado pelo equipamento *HiScan™SQ System* durante a etapa de escaneamento do chip. Portanto, no caso deste macho 7822, apenas 77,0% (43.534) do total de SNPs (56.538) foi determinado e os outros 33,0% (13.003) foram considerados como *No Call* (NC). Mesmo assim, as análises prosseguiram incluindo este macho, pois este foi empregado no cruzamento com duas fêmeas não aparentadas, para dar origem a duas famílias das cinco mais informativas da

população TCTC (macho F₁ 7822 x fêmea F₁ 7971; macho F₁ 7822 x fêmea F₁ 7765).

Com o auxílio do programa *GenomeStudio*TM, foi possível realizar a filtragem dos genótipos obtidos pelo *Beadchip* de 60 k empregando somente as informações que correspondesse à região alvo deste estudo, ou seja, para as demais análises, foram considerados somente os SNPs localizados entre 168 – 208 cM (57 – 71 Mpb) do GGA1, totalizando 40 cM (13,6 Mpb).

Dessa forma, foram evidenciados 641 SNPs nesta região, os quais apresentaram distância média de 21,2 kpb, mínima de 0,4 kpb e máxima de 69,0 kpb. Com a genotipagem dos Parentais, foi obtido um total de 6.410 (55,5%) genótipos (10 animais x 641 SNPs), enquanto que para a geração F₁ foram 5.128 (44,5%) genótipos (8 animais x 641 SNPs), totalizando 11.538 genótipos (100%).

Na Tabela 7, encontra-se um resumo das classes genotípicas na região alvo para as gerações Parental e F₁. Os genótipos foram determinados e contabilizados para todas as classes genotípicas, sendo homozigotos (AA e BB), heterozigotos (AB) e não detectados (*No Call* - NC). Esta última classe apresentou *ScoreGenCall* < 0,15. Diferentemente da *Call Rate*, o *ScoreGenCall*, fornecido pelo programa *GenomeStudio*TM, é considerado uma medida específica que reflete a confiabilidade na determinação do genótipo de cada animal para cada SNP.

Tabela 7 – Contagem dos homozigotos (AA e BB), heterozigotos (AB) e não detectados (NC), localizados na região alvo das gerações Parental e F₁ empregando os 641 SNPs

Classe genotípica	Geração			
	Parental		F ₁	
	machos TT (N = 5)	fêmeas CC (N = 5)	machos F ₁ (N = 3)	fêmeas F ₁ (N = 5)
Homozigoto (AA)	996	1.160	504	896
Heterozigoto (AB)	1.119	776	756	1.253
Homozigoto (BB)	1.038	1.212	514	1.008
Não detectado (NC) ^a	52	57	149	48
Total^b	3.205	3.205	1.923	3.205
Total^c	3.153	3.148	1.774	3.157

^a*ScoreGenCall* < 0,15; ^bcorresponde ao N multiplicado por 641 SNPs, mas inclui NC;

^ccorresponde ao N multiplicado por 641 SNPs, mas exclui NC

Um total de 306 genótipos (2,6% de 11.538 genótipos) foi identificado nas duas gerações como NC. Portanto, a taxa de sucesso de genotipagem foi de 97,4%. Proporcionalmente ao total de genótipos detectados (excluindo-se NC), os

machos F_1 apresentaram ~ 5 vezes mais NC em relação à média das demais gerações (Tabela 7), sendo consequência de o macho F_1 7822 ter apresentado *Call Rate* igual a 0,77.

Comparando-se as duas linhagens Parentais com base no total de genótipos (incluindo-se NC), as fêmeas CC apresentaram o maior número de homozigotos, totalizando 2.372 genótipos (74,0%). Este fato pode ser explicado devido ao maior número de ciclos de seleção que esta linhagem foi submetida, ao todo oito, e para as características de interesse, as quais foram relacionadas à produção de ovos. Outro aspecto relevante reside no fato de as fêmeas CC apresentarem composição genética baseada exclusivamente na raça *White Leghorn*. Já os machos TT exibiram 63,4% de homozigotos, o que pode ser decorrente do menor número de ciclos de seleção (6) voltados para características de corte e também por apresentarem composição genética baseada em três raças distintas, a saber, *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish* (ROSÁRIO et al., 2009).

Ao analisar proporcionalmente os heterozigotos dos machos e fêmeas F_1 (incluindo-se NC), evidenciaram-se porcentagens similares de 39,3 e 39,0%, respectivamente, porém superiores à geração Parental, em que foram observados 34,9 e 24,2% para TT e CC, respectivamente (Tabela 7). Este resultado era esperado, pois foram realizados cruzamentos entre linhagens fenotipicamente divergentes, com o intuito de obter gerações F_1 com maior variabilidade genotípica em relação aos seus Parentais, porém com variabilidade similar entre machos e fêmeas F_1 concordando com Rosário et al. (2009).

A seguir, os SNPs foram contabilizados quanto aos valores de MAF igual a 0 e maior que 0 e os tipos de trocas. O polimorfismo com maior ocorrência em ambas as linhagens, excluindo-se os NA, foram as transições (A/G + T/C) com 84,3%, enquanto que as transversões (A/C + T/G) com 15,7% (Tabela 8).

Tabela 8 – Número de SNPs identificados em função da *Minor Allele Frequency* (MAF) e tipo de SNP nas gerações Parentais e F₁ considerando os 641 SNPs posicionados na região alvo

Geração	MAF = 0				Total	MAF > 0				Total	NA ^c
	A/C ^a	T/G ^a	A/G ^b	T/C ^b		A/C	T/G	A/G	T/C		
Machos TT	14	7	61	42	124	51	27	243	188	509	8
Fêmeas CC	31	14	122	104	271	34	20	182	125	361	9
Machos F ₁	33	16	100	75	224	32	18	204	155	409	8
Fêmeas F ₁	14	7	56	29	106	51	27	248	201	527	8
Total	92	44	339	250	725	168	92	877	669	1806	33

^atransversão (A/C ou T/G); ^btransição (A/G ou T/C); ^cNA: *ScoreGenCall* < 0,15 (NC)

Os Parentais, em particular as fêmeas CC, apresentaram maior número de SNPs com MAF = 0, o que corresponde a alelos fixados (monomórficos), conduzindo a uma variabilidade genotípica inferior do que aqueles com valores de MAF > 0 (Tabela 8). Adicionalmente aos argumentos já apresentados na discussão da Tabela 7, os resultados acima corroboram os achados de Rosário et al. (2009), em que empregando 34 microssatélites nos cromossomos 1 (13), 3 (12) e 4 (9), observaram que a linhagem CC (0,39) obteve valor de PIC menor que a linhagem TT (0,49).

A seguir, verificou-se que nenhum SNP apresentou significância com correção de Bonferroni ($p < 7,80 \times 10^{-5} = 0,05 / 641$ SNPs) quanto ao teste de aderência entre os valores de heterozigosidade observada e esperada sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (resultados não mostrados). Portanto, as frequências genotípicas observadas na população TCTC se aderem àquelas esperadas, não havendo nem excesso nem restrição de heterozigotos nesta população.

4.6 Seleção e descrição dos 144 SNPs mais informativos

Dentre os 641 SNPs localizados no GGA1 (168 – 208 cM), foram selecionados os 144 SNPs mais informativos empregando-se dados referentes aos animais da geração F₁ (cinco fêmeas F₁ e três machos F₁), de acordo com os critérios descritos no item 3.6..

Na Tabela 9, apresenta-se o número de SNPs computados em cada etapa da seleção, considerando-se a classe genotípica, MAF e teste de aderência ao EHW dos casais da geração F₁.

Tabela 9 – Número de SNPs identificados nos cinco casais F_1 para seleção dos 144 SNPs mais informativos em cada etapa de seleção

Etapas da seleção	Nº de casais			Nº de SNPs selecionados
	he/he ¹	he/ho ¹	ho/ho ¹	
1 ^a	5	0	0	12
2 ^a	4	1	0	22
3 ^a	3	2	0	26
4 ^a	3	1	1	7
5 ^a	3	0	2	5
6 ^a	2	3	0	52
7 ^a	2	2	1	20
Total	22	9	4	144

¹he/he = loco heterozigoto em ambos os animais de cada casal F_1 selecionado, he/ho = loco heterozigoto em um animal e homozigoto em outro animal de cada casal F_1 selecionado, ho/ho = loco homozigoto em ambos os animais de cada casal F_1 selecionado

Para os 144 SNPs, foram contabilizados os homozigotos (AA e BB), heterozigotos (AB) e não detectados (NC) para os machos e fêmeas F_1 (Tabela 10).

Tabela 10 – Contagem dos homozigotos (AA e BB) e heterozigotos (AB) para os 144 SNPs na geração F_1

Classe genotípica	machos F_1 (N = 3)	fêmeas F_1 (N = 5)
Homozigoto (AA)	33	119
Heterozigoto (AB)	369	474
Homozigoto (BB)	28	126
Não detectado (NC) ^a	2	1
Total^b	432	720
Total^c	430	719

^aScoreGenCall < 0,15; ^bcorresponde ao N multiplicado por 144 SNPs, mas inclui NC; ^ccorresponde ao N multiplicado por 144 SNPs, mas exclui NC

O propósito inicial era de selecionar SNPs que possibilitassem incrementar o número de heterozigotos, o qual foi atingido. Quando se compararam, relativamente, os resultados apenas para a geração F_1 , pela Tabela 7 (641 SNPs) foram identificados 756 (39,3% de 1.774) heterozigotos nos machos F_1 e 1.253 (39,0% de 3.157 (excluindo-se NC) heterozigotos nas fêmeas F_1 , enquanto que pela Tabela 10 (144 SNPs) foram identificados 369 (85,8% de 430) nos machos F_1 e 474 (65,9% de 719) nas fêmeas F_1 . Portanto, houve um incremento de 118,3 e 68,9% de heterozigotos nos machos e fêmeas F_1 , respectivamente, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 em relação à Tabela 7. Este incremento também pode ser explicado, considerando-se

redundâncias, pelo maior número de casais he/he selecionados (22) quando comparado com o total de 13 dos demais casais (9 he/ho + 4 ho/ho) (Tabela 9).

Em seguida, foram enviadas as informações de cada SNP selecionado (item 3.6.) para a *Illumina*® a fim de que os ensaios customizados fossem sintetizados para genotipar os 453 F₂. Inicialmente, o arquivo continha oito SNPs com *score* < 0,5, fornecido pelo programa *Assay Design Tool* (ADT), sendo necessário substituí-los. Sendo assim, o arquivo final apresentou 116 SNPs com valores de *score* entre 1,00 a 0,75 e 28 SNPs com valores entre 0,75 a 0,50.

Portanto, após a seleção dos 144 SNPs mais informativos, empregando-se os 641 SNPs localizados na região alvo, foi possível verificar a posição dos SNPs selecionados, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 – Localização dos 144 SNPs (pontos cheios) mais informativos dentro da região alvo, onde estão localizados 641 SNPs (pontos vazios + cheios) obtidos pelo *Beadchip* de 60 k. Os ▲ representam as posições dos dois QTL pleiotrópicos mapeados por Rosário et al. (2012) e o retângulo a região aproximada do centrômero do GGA1

Pela Figura 12, observa-se que a cobertura da região alvo com os 641 SNPs possibilitou posicionar um SNP, em média, a cada 21,2 kpb, com distância mínima e máxima de 0,4 e 69,0 kpb, respectivamente (pontos vazios + cheios); já

os pontos cheios, representando apenas os 144 SNPs, cobriram satisfatoriamente esta região exceto entre 57,4 a 58,0 Mpb e de 59,6 a 62,6 Mbp.

De acordo com os resultados combinados de Galkina et al. (2006) e Zlotina et al. (2012), foi possível identificar que o centrômero encontra-se flanqueado pelos marcadores *MCW0112* (205 cM = 61,6 Mpb) e *LEI0101* (259 cM = 75,3 Mpb), compreendendo ~ 4 Mpb deste intervalo. Dessa forma, considerando-se sua posição no centro deste intervalo, então, ele se encontra entre 66,4 e 70,4 Mbp (Figura 12).

O centrômero é uma constrição primária que divide o cromossomo em duas partes (braços), sendo o GGA1 classificado como submetacêntrico (ASHRAFU, 2012). No centrômero há diversas sequências consideradas altamente repetitivas, as quais dificultam a montagem dos *reads* provenientes do sequenciamento desta região e, conseqüentemente, a identificação de marcadores microssatélites (HENIKOFF et al., 2001) como pode ser observado pela Figura 11. Esta limitação foi superada com a identificação de SNPs, os quais apresentam uma satisfatória cobertura de parte da região centromérica do GGA1 (Figura 12). Por outro lado, os SNPs são menos informativos, pois são bialélicos, em relação aos microssatélites (SCHOPEN et al., 2008).

4.7 Genotipagem da geração F₂

Na genotipagem dos 453 animais da geração F₂, foram empregados os 144 SNPs mais informativos dentre os 641 SNPs posicionados na região alvo. Todas as amostras obtiveram uma *Call Rate* acima de 0,90, exceto para sete animais que apresentaram valores entre 0,50 a 0,70. Estes animais, oriundos de diferentes famílias, a saber: 7971 (N = 2), 7978 (N = 1), 7765 (N = 2) e 7816 (N = 2), tiveram de ser novamente genotipados. Entretanto, após a nova genotipagem somente cinco obtiveram *Call Rate* acima de 0,90, enquanto que outros dois apresentaram valor de 0,70. Mesmo assim, os genótipos destes dois animais foram empregados nas análises subsequentes.

Portanto, um total de 65.232 genótipos foi obtido (453 animais x 144 SNPs), os quais são resumidos em homozigotos (AA e BB), heterozigotos (AB) e não detectados (NC) (Tabela 11).

Tabela 11 – Contagem dos homozigotos (AA e BB), heterozigotos (AB) e não detectados (NC), na geração F₂, empregando os 144 SNPs mais informativos

Classe genotípica	FAM7978 (N = 103)	FAM7810 (N = 82)	FAM7816 (N = 94)	FAM7971 (N = 101)	FAM7765 (N = 73)
Homozigoto (AA)	4.485	3.529	3.506	4.187	3.056
Heterozigoto (AB)	5.711	4.938	6.421	5.895	4.540
Homozigoto (BB)	3.812	2.656	3.006	3.617	2.399
Não detectado (NC) ^a	824	685	603	845	517
Total^b	14.832	11.808	13.536	14.544	10.512
Total^c	14.008	11.123	12.933	13.699	9.995

^aScoreGenCall < 0,15; ^bcorresponde ao N multiplicado por 144 SNPs, mas inclui NC; ^ccorresponde ao N multiplicado por 144 SNPs, mas exclui NC

Na geração F₂, um total de 3.474 (5,3% de 65.232) genótipos não foi detectado, resultando em 94,7% na taxa de sucesso de genotipagem. Proporcionalmente ao total de genótipos detectados (excluindo-se NC), os genótipos não detectados variaram entre 5,1 (FAM7765) a 6,4% (FAM7971) entre as cinco famílias, o que está de acordo com as recomendações dos ensaios empregando a tecnologia *VeraCode GoldenGate* desenvolvida pela *Illumina*[®] (dados disponíveis em www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_goldengate_design.pdf. Acesso em: 29/08/13).

Em espécies *inbred*, como por exemplo, tomate e soja, nas quais todos os locos encontram-se em completa homozigose, a cada ciclo de autofecundação reduz-se, em média, 25% a classe de heterozigotos (AB) e aumenta-se em 12,5% para cada classe de homozigotos (AA e BB), como consequência da endogamia extrema (LYNCH; WALSH, 1998).

Por outro lado, em espécies de reprodução sexuada, ou seja, que necessitam de união de gametas, como é o caso da galinha doméstica, parte dos locos encontram-se em homo e outra parte em heterozigose. Estas espécies são denominadas de *outbred*. Dessa forma, durante o paquíteno da meiose I, quando ocorre a recombinação, é possível que gametas sejam produzidos com combinações alélicas não idênticas daquelas do parental que os originou, sendo denominados de gametas recombinantes ou não parentais. Este evento genético é essencial para que novos genótipos possam ser identificados nas populações aptas ao melhoramento genético e também naquelas em que se tenha interesse em implementar estratégias genômicas, como por exemplo, mapeamento de QTL,

mapeamento fino, testes de associação, mapeamento associativo e seleção genômica. Estas estratégias exploram o nível de desequilíbrio de ligação (DL) exibido em uma população de interesse (LYNCH; WALSH, 1998).

Assim, quando se compararam relativamente os resultados apenas para a geração F_1 , pela Tabela 10 (144 SNPs) foram identificados 369 (85,8% de 430) heterozigotos nos machos F_1 e 474 (65,9% de 719) heterozigotos para fêmeas F_1 , enquanto que pela Tabela 11, considerando-se simultaneamente as cinco famílias, foram identificados 27.505 (44,5% de 61.758) heterozigotos.

A redução de heterozigotos em F_2 em relação à média de F_1 foi de 41,1% e já era esperada. Porém, esta porcentagem foi superior daquela prevista nas espécies *inbred*, nas quais o efeito da endogamia comprovadamente é mais drástico do que nas *outbred*. Um argumento para isso pode ser o pequeno tamanho amostral (5 machos TT e 5 fêmeas CC) das linhagens que constituíram a geração Parental da população TCTC. Este argumento é denominado de Princípio Fundador ou Efeito de Gargalo de Garrafa, que é um caso extremo de deriva genética em que uma nova população é fundada por um ou poucos animais.

Adicionalmente, constata-se pela Tabela 2, que há certo grau de parentesco (coeficientes não calculados) entre os animais F_2 da população, em que aqueles oriundos das famílias 7978 e 7810 eram meios-irmãos paternos assim como os das famílias 7971 e 7765; já os provenientes das famílias 7810 e 7816 possuíam os mesmos avós maternos.

Para as cinco famílias, os SNPs também foram contabilizados quanto aos valores de MAF (igual a 0 e maior que 0) e aos tipos de trocas para os 144 SNPs selecionados. O polimorfismo com maior ocorrência em todas as famílias foram as transições (A/G + T/C) com 88,0%, enquanto que as transversões (A/C + T/G) com 12,0% (Tabela 12).

Tabela 12 – Número de SNPs identificados em função da *Minor Allele Frequency* (MAF) e tipo de SNP nos 453 animais da geração F₂ para as cinco famílias empregando os 144 SNPs

Família	MAF = 0				Total	MAF > 0				Total	NA ^c
	A/C ^a	T/G ^a	A/G ^b	T/C ^b		A/C ^a	T/G ^a	A/G ^b	T/C ^b		
7971	1	0	11	7	19	10	6	60	47	123	2
7978	0	0	10	1	11	11	6	61	53	131	2
7810	0	0	10	1	11	11	6	60	53	130	3
7816	0	0	7	4	11	11	6	65	49	131	2
7765	0	0	11	4	15	11	6	59	50	126	3
Total	1	0	49	17	67	54	30	305	252	641	12

^atransversão (A/C ou T/G); ^btransição (A/G ou T/C); ^cNA: *ScoreGenCall* < 0,15 (NC)

Para este estudo, os machos TT, fêmeas CC, machos e fêmeas F₁ e F₂ apresentaram média de MAF entre 0,18 a 0,41 (Tabela 13), valores similares àqueles de Groenen et al. (2011). Estes autores empregaram quatro raças comerciais: duas linhagens de corte e duas linhagens de postura (ovos brancos e marrons) na genotipagem com o *Beadchip* de 60 k e evidenciaram média de MAF igual a 0,30.

Tabela 13 – Estatísticas descritivas de MAF referentes aos 144 SNPs nas três gerações (Parentais, F₁ e F₂)

Estatística descritiva	Geração				
	machos TT	fêmeas CC	machos F ₁	fêmeas F ₁	F ₂
Média	0,23	0,18	0,41	0,36	0,33
Desvio-padrão	0,16	0,16	0,12	0,10	0,16
Mínimo	0,00	0,00	0,25	0,20	0,00
Máximo	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

4.8 Blocos de haplótipos

Para as gerações Parental, F₁ e F₂, foram construídos blocos de haplótipos utilizando-se os genótipos provenientes dos 144 SNPs mais informativos da região alvo. Na geração Parental, os blocos foram construídos separadamente para TT e CC, pois estas duas linhagens divergiam na composição genética, número de ciclos de seleção e características de interesse que foram selecionadas. Esta estratégia visou a identificação de características peculiares, como por exemplo, número e tamanho dos blocos de haplótipos e SNPs completamente independentes.

Foram excluídos SNPs que não atingiram os critérios estabelecidos no programa *Haploview* para a construção dos blocos de haplótipos em cada geração da população TCTC (Tabela 14).

Tabela 14 – Número de SNPs que não atingiram os critérios estabelecidos no programa *Haploview* empregando os 144 SNPs mais informativos nas três gerações

Geração	MAF	EHW	% Genotipagem	Total ^a	Total ^b
Machos TT	21	0	0	21	123
Fêmeas CC	43	0	0	43	101
F₁	0	0	0	0	144
F₂	3	37	5	45	99

Crítérios: MAF > 0,05; EHW > 0,001; % Genotipagem > 75. ^aTotal: SNPs excluídos; ^bTotal: SNPs utilizados para a construção dos blocos de haplótipos

Assim, para a construção dos blocos de haplótipos dos machos TT, fêmeas CC, F₁ e F₂ foram utilizados, efetivamente, um total de 123, 101, 144 e 99, respectivamente. Destaca-se que os animais F₁ não tiveram nenhum SNP excluído (Tabela 14) pelo fato de que esta geração serviu de base para a seleção dos 144 SNPs mais informativos conforme Tabela 9.

Nos machos TT, foram evidenciados 25 blocos com tamanho mínimo, médio e máximo de 14,0 kpb, 278,0 kpb e 1.498 kpb, respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – Blocos de haplótipos dos machos TT empregando 123 SNPs contidos na região alvo. Cores tendendo ao vermelho e ao azul correspondem a maior e menor nível de desequilíbrio de ligação, respectivamente

Já nas fêmeas CC, foram obtidos 17 blocos, tendo como tamanho mínimo 50,0 kpb, médio 467,0 kpb e máximo 2.216 kpb (Figura 14).

Figura 14 – Blocos de haplótipos das fêmeas CC empregando 101 SNPs contidos na região alvo. Cores tendendo ao vermelho e ao azul correspondem a maior e menor nível de desequilíbrio de ligação, respectivamente

Megens et al. (2009) observaram blocos menores que 10,0 kpb em linhagens comerciais de postura (ovos brancos e castanhos) e corte; já Qanbari et al. (2010) evidenciaram, para *White Leghorn*, blocos muito maiores com 798,9 kpb.

Apesar de neste trabalho a região alvo apresentar tamanho restrito (13,6 Mpb) no GGA1, pôde-se empregar a caracterização dos blocos de haplótipos para uma melhor compreensão das diferenças entre TT e CC como consequência dos processos de seleção específicos a que cada linhagem foi submetida.

Dessa forma, comparando-se as Figuras 13 (TT) e 14 (CC), observa-se que os blocos de haplótipos das fêmeas CC apresentaram-se em maior tamanho, porém, em menor número em relação aos machos TT. Estes resultados podem explicados pelo fato de as linhagens TT e CC apresentarem, proporcionalmente ao número total de SNPs, 19,3 e 42,2% de SNPs com MAF = 0, respectivamente (Tabela 8). Portanto, CC exibiu maior nível de desequilíbrio de ligação (cor

vermelha) e, assim, blocos maiores, mas em menor número em decorrência do maior número de alelos fixados, com consequente alteração da frequência alélica.

Para que um determinado SNP possa ser empregado em programa de melhoramento genético assistido por marcadores moleculares, é necessário que a população apresente elevados níveis de desequilíbrio de ligação. Do contrário, a probabilidade de ocorrência de determinada classe de marcador será independente da segregação dos alelos dos QTN (SILVA, 2001). Assim, com o emprego de chip de SNPs com maiores densidades e que cobrem praticamente todo o genoma, espera-se que tais marcadores estejam próximos o suficiente da mutação causal, de tal forma que, as associações sejam consistentes entre famílias (DEKKERS, 2004).

Assim, observa-se pelas Figuras 13 e 14, que os SNPs localizados dentro de um mesmo bloco de haplótipo apresentaram elevado desequilíbrio de ligação e, estatisticamente, apenas um destes SNPs pode representar toda a informação genotípica proveniente dos demais. Consequentemente, haverá informações redundantes, as quais têm dificultado o processamento das análises de associação em virtude de existirem mais parâmetros a serem estimados do que observações disponíveis, além do custo desnecessário na obtenção dos genótipos dos animais. Portanto, seria de interesse selecionar apenas um SNP de cada bloco de haplótipo.

Estes SNPs selecionados têm sido denominados de *tagSNPs*, em que cada um representa os demais do mesmo bloco com alta eficiência estatística em uma região genômica que apresente elevado desequilíbrio de ligação. Por outro lado, em regiões que apresentem desequilíbrio de ligação inferior, ocorre uma associação menor entre os SNPs, sendo necessária a utilização da maioria ou de todos os marcadores. Ainda assim é possível identificar locos que estejam ligados a uma característica de interesse, porém a um custo maior dos estudos de associação (GABRIEL et al., 2002).

Pelas Figuras 13 e 14, observa-se um SNP em cada uma, caracterizados por faixas contínuas em cor azul, os quais são *GGa_{lu}GA019609* ($G < A$, 58.666.598 pb) e *Gga_{rs}13872178* ($A < G$, 59.454.532 pb), respectivamente. Estes SNPs não se encontram em desequilíbrio de ligação com outros marcadores adjacentes, sendo características peculiares das linhagens TT e CC.

Empregando-se o *MapViewr* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>), na versão 2.1 do genoma da galinha, o primeiro SNP não foi localizado, enquanto que o segundo foi posicionado na região do íntron 1 do gene *CREB3L2* (*proteína de ligação no elemento cAMP responsivo-2 semelhante ao tipo 3*), responsável pela regulação da transcrição dependente de DNA (CHAN, et al. 2011). Portanto, pelo fato de estes dois SNPs segregarem independentemente, eles não seriam de interesse para fins de seleção assistida por marcadores.

Para os animais da geração F_1 (machos e fêmeas F_1), foram obtidos 32 blocos com tamanho mínimo, médio e máximo foi de 7,0 kpb, 242,0 kpb e 1.721 kpb, respectivamente (Figura 15). Nesta geração, houve um aumento do número de blocos, porém de menor tamanho em decorrência de serem oriundos de um cruzamento entre duas linhagens parcialmente endogâmicas, as quais apresentavam um maior nível de desequilíbrio de ligação (Figuras 13 e 14).

Figura 15 – Blocos de haplótipos dos animais da geração F_1 empregando 144 SNPs contidos na região alvo. Cores tendendo ao vermelho e ao azul correspondem a maior e menor nível de desequilíbrio de ligação, respectivamente

Comparando-se as Figuras 13 (TT), 14 (CC) e 15 (F_1), observa-se que nesta última houve menor intensidade da cor vermelha, indicando menor nível de desequilíbrio de ligação (cor azul), como decorrência da provável recombinação

naqueles locos heterozigóticos evidenciados em TT e CC (Tabela 7). Também foram evidenciados 10 SNPs com segregação independente dos adjacentes.

Na Figura 16, observam-se 23 blocos de haplótipos para a geração F_2 com tamanho mínimo, médio e máximo de 13,0 kpb, 160,0 kpb e 490,0 kpb. Nesta geração, houve uma diminuição ainda maior da extensão de blocos ao comparar com as gerações Parental e F_1 decorrente da maior taxa de recombinação em toda a extensão da região alvo deste estudo em F_1 . Estas observações foram decorrentes do elevado nível de heterozigose observado em F_1 como resultado do processo de seleção dos 144 SNPs mais informativos (Tabelas 9 e 10).

Figura 16 – Blocos de haplótipos dos animais da geração F_2 empregando 99 SNPs contidos na região alvo. Cores tendendo ao vermelho e ao azul correspondem a maior e menor nível de desequilíbrio de ligação, respectivamente

O tamanho efetivo da população também pode influenciar no desequilíbrio de ligação bem como o nível de heterozigose. Nas linhagens TT e CC houve um aumento no desequilíbrio de ligação (Figuras 13 e 14, respectivamente) em decorrência da diminuição do número de indivíduos e aumento do nível de homozigose (Tabela 7). Sendo assim, um número maior de SNPs não segregou independentemente, havendo uma tendência de estes estarem fixados na população, ou seja, apresentando $MAF = 0$ (Tabela 8). Enquanto que, nas

gerações F_1 e F_2 , com o aumento do número de indivíduos na população e maior heterozigose (Tabelas 7 e 11), houve diminuição do desequilíbrio de ligação em decorrência dos eventos de recombinação entre SNPs, conforme as Figuras 15 e 16, respectivamente.

De maneira geral, evidencia-se uma tendência das cores verde e azul, o que corresponde a um menor nível de desequilíbrio de ligação (Figura 16). Dessa forma, um maior número de SNPs não compôs nenhum bloco, segregando independentemente. Este fato acarretou a redução da extensão dos blocos de haplótipos.

Sendo assim, foram verificadas diferenças no comprimento dos blocos entre as gerações empregadas neste estudo, apesar de o número de SNPs, efetivamente empregado na construção dos blocos de cada geração, ter variado entre 99 a 144. Estas diferenças são resultantes de quando o desequilíbrio de ligação entre os SNPs se originou. Quanto maior o número de gerações, menores serão os segmentos (haplótipos) e, conseqüentemente, o desequilíbrio de ligação tende a diminuir. Dessa forma, blocos menores são oriundos de um maior número de eventos de recombinação entre locos com $MAF > 0$, o que só pode ser obtido ao longo de um maior número de gerações, conforme foi constatado na geração F_2 . Enquanto que blocos maiores, como os observados nas linhagens TT e CC, são decorrentes de um maior número de locos com $MAF = 0$ (fixados), pois mesmo que ocorra recombinação entre dois SNPs quaisquer, a tendência é de não alterar a variabilidade genotípica.

Seguindo esta linha de raciocínio, Heifetz et al. (2005) também analisaram a consistência do desequilíbrio de ligação entre gerações e regiões cromossômicas e concluíram que em distâncias mais curtas, o desequilíbrio de ligação foi conservado ao longo de gerações, porém, foi variável entre regiões cromossômicas.

Andreescu et al. (2007) avaliaram a extensão do desequilíbrio de ligação em populações comerciais de frangos de corte no GGA1 e GGA4 por meio da utilização de painéis de SNPs de 3 e 6 k. Estes autores concluíram que o painel de 6 k permitiu uma melhor avaliação do desequilíbrio de ligação a curtas distâncias, pois este painel continha uma maior densidade de SNPs.

Abasht et al. (2009) também avaliaram a extensão do desequilíbrio de ligação utilizando o painel de SNPs de 3 k, porém, empregando populações comerciais de postura (ovos brancos e castanhos) ao longo de duas gerações. Estes autores verificaram que, em ambas as linhagens, em curtas distâncias, o desequilíbrio de ligação mensurado por r^2 foi maior que 0,2 e manteve-se elevado após uma geração. Este resultado indica que SNPs em elevado desequilíbrio de ligação com QTL a distâncias curtas permanecerão em desequilíbrio de ligação na progênie, sendo, portanto, de interesse para a seleção assistida por marcadores.

A estimação do desequilíbrio de ligação tomou impulso devido ao fato de que estudos de associação oferecem, substancialmente, maior poder de detecção de genes candidatos que os estudos tradicionais de ligação (ARDLIE et al., 2002). Dessa forma, a partir da caracterização das três gerações que compuseram a população TCTC por meio da construção de blocos de haplótipos, foram conduzidos testes de associação entre os 144 SNPs e 24 fenótipos.

4.9 Testes de associação

Para os testes de associação foram empregados os dados de genotipagem das cinco famílias da geração F_2 obtidos a partir dos 144 SNPs mais informativos. Os gráficos foram plotados para cada uma das características separadamente, incluindo os efeitos aditivos (ou de substituição alélica) e de dominância apenas dos SNPs significativos ($p < 0,05$), conforme Figura 17.

Do total de 3.456 associações esperadas (24 fenótipos x 144 SNPs), 609 (17,6% de 3.456) foram significativas. Considerando-se estas últimas, 424 (69,6%) exibiram efeito aditivo e 185 (30,4%) efeito de dominância (Figura 17).

Das 24 características avaliadas, PV41 apresentou o maior número de associações (123), das quais 99 foram aditivas (A) e 24 dominantes (D). Por outro lado, DOR não foi associado com nenhum SNP. A partir do número total de associações (A+D), a seguir, definiram-se três classes intermediárias para as demais características: 1) variando de 47 a 67 (EE_MS, COR, AS, CZ_MS e GOR); 2) variando de 13 a 35 (INT, TRI, CAB, FIG, MOE e PB_MS); 3) variando

de 1 a 9 (HEM, GP3541, CAR, CA3541, TC, COL, PER, CR3541, PEI, PES e PUL).

De maneira geral, constata-se que, proporcionalmente, o maior número de SNPs associados encontram-se posicionados próximos ao QTL pleiotrópico 2 mapeado por Rosário et al. (2012) para as seguintes características: PV41, CR3541, INT, PES, PEI, CAB, AS, FIG, COR, MOE, HEM, GOR, COL, TC, PB_MS, EE_MS e CZ_MS (Figura 17). Pela Figura 12, observa-se que 23 e 24 SNPs estão posicionados (pontos cheios) se for considerado ± 1 Mpb em relação à posição do QTL 1 e 2 pleiotrópicos, respectivamente. Por outro lado, os maiores níveis de significância para o efeito aditivo foram evidenciados para SNPs próximos do QTL pleiotrópico 1 e associados somente com PV41 (Figura 17A).

(continua)

(continuação)

(conclusão)

Figura 17 – Testes de associação empregando os 144 SNPs contidos na região alvo da geração F_2 . Pontos cheios e vazios representam os efeitos de aditividade e dominância, respectivamente. As linhas contínuas representam os valores de probabilidades utilizados, a saber: $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 3,472 \times 10^{-4}$ expressas na escala $-\log_{10}(p)$. As linhas pontilhadas representam os QTL pleiotrópicos 1 (173 cM = 58,9 Mpb) e 2 (203 cM = 69,2 Mpb) mapeados por Rosário et al. (2012)

Os SNPs que apresentaram os maiores níveis de significância bem como seus respectivos efeitos aditivos (de substituição alélica) são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 - Efeito de substituição alélica dos cinco SNPs com maiores níveis de significância associados com PV 41

Carac- terística	SNP	Posição (pb)	$-\log_{10}(p)$	Efeito de substituição alélica (g)	Erro- padrão (g)	Polimorfismo
PV41	<i>Gga_rs14827719</i>	57095537	7,39	52,22	9,34	A>G
	<i>Gga_rs13869715</i>	57186993	7,30	-51,47	9,28	A>C
	<i>GGaluGA019336</i>	58058352	7,01	69,55	12,82	T>C
	<i>Gga_rs13870613</i>	58145243	7,61	54,42	9,58	T>C
	<i>GGaluGA019533</i>	58457256	8,08	-54,75	9,32	A>C

O SNP com maior significância, *GGaluGA019533* (Tabela 15), é um marcador identificado especificamente nas populações avaliadas por Groenen et al. (2011), pois o mesmo não se encontra depositado na *Short Genetic Variations* (*dbSNP*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Adicionalmente, evidencia-se que três e dois SNPs apresentaram efeito de substituição alélica com sinal positivo e negativo e estatisticamente igual ($p > 0,05$), respectivamente. Portanto, para fins de melhoramento genético, ou seja, incremento na média de PV41, seria de interesse aumentar as frequências dos alelos G, A, C, C e A, respectivamente, para os SNPs *Gga_rs14827719*, *Gga_rs13869715*, *GGaluGA019336*, *Gga_rs13870613* e *GGaluGA019533*.

Empregando-se o *Mapviewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>), na versão 2.1 do genoma da galinha, foi possível localizar a posição de quatro dos cinco SNPs apresentados na Tabela 15, exceto para o SNP *Gga_rs14827719*. Já o SNP *Gga_rs13869715* está posicionado no íntron 10 do gene putativo *LOC771761*, a uma distância de 136.841 pb do gene *IGF1*; o SNP *GGaluGA019336* encontra-se no íntron 4 do gene putativo *LOC418101*; o SNP *Gga_rs13870613* está posicionado no éxon 1 do gene *HIPK2* (*interação do homeodomínio proteinase quinase 2*); e o SNP *GGaluGA019533* encontra-se no íntron 11 do gene putativo *LOC418106*.

Complementarmente, a Figura 18 ilustra a origem dos SNPs provenientes de TT (cor amarela) e CC (cor azul) em relação à F_2 para cada um dos 144 SNPs mais informativos selecionados.

SNP nº	SNP	Posição (bp)	Bloco nº				SNP nº	SNP	Posição (bp)	Bloco nº			
			Machos TT	Fêmeas CC	F1	F2				Machos TT	Fêmeas CC	F1	F2
1	Gga_rs14827719	57095537	NE	NE	NE	1	73	Gga_rs13878250	65856121	13	9	16	SB
2	Gga_rs13869715	57186993	NE	NE	NE	1	74	GGaluGA022457	65878747	13	NE	SB	SB
3	Gga_rs13869726	57208630	NE	1	1	1	75	Gga_rs13657522	65983604	13	10	17	NE
4	Gga_rs13654272	57230231	NE	1	1	1	76	GGaluGA022544	66170851	14	NE	17	SB
5	Gga_rs13869771	57272972	NE	1	1	1	77	Gga_rs13878578	66176520	NE	NE	NE	12
6	GGaluGA019336	58058352	NE	NE	1	NE	78	Gga_rs15295106	66214140	14	NE	SB	12
7	Gga_rs13870613	58145243	NE	2	1	2	79	Gga_rs14836801	66258202	NE	NE	NE	12
8	Gga_rs14828546	58215364	NE	2	1	NE	80	Gga_rs13878693	66288081	14	NE	SB	12
9	Gga_rs14828585	58254643	1	3	NE	NE	81	GGaluGA022581	66336464	14	10	18	NE
10	GGaluGA019475	58334465	1	3	2	NE	82	Gga_rs15295731	66532792	14	10	18	13
11	GGaluGA019519	58412953	1	3	2	NE	83	GGaluGA022685	66611570	14	10	18	13
12	GGaluGA019522	58426156	1	3	2	NE	84	Gga_rs15296153	66656334	14	10	18	NE
13	GGaluGA019533	58457256	1	3	2	2	85	GGaluGA022726	66758581	NE	11	18	SB
14	Gga_rs13654742	58504829	1	NE	NE	NE	86	Gga_rs14837314	66870221	15	11	19	14
15	GGaluGA019561	58527419	NE	NE	NE	NE	87	Gga_rs15296524	66883398	15	11	19	14
16	GGaluGA019609	58666598	NE	4	3	3	88	Gga_rs14837349	66907500	NE	NE	NE	15
17	GGaluGA019619	58689270	2	4	3	3	89	Gga_rs13879121	66982238	15	NE	20	15
18	Gga_rs14829049	58715755	2	4	4	NE	90	Gga_rs13879172	67020176	15	11	20	SB
19	GGaluGA019630	58723169	2	4	4	NE	91	Gga_rs14837537	67130198	15	11	SB	16
20	Gga_rs13871526	58904399	3	4	5	NE	92	GGaluGA022843	67142219	15	NE	21	16
21	Gga_rs13871583	58973717	NE	4	5	NE	93	GGaluGA022876	67246039	NE	11	21	16
22	Gga_rs15279200	59008592	3	NE	6	4	94	GGaluGA022896	67322889	15	11	21	SB
23	Gga_rs13871704	59077182	NE	4	6	4	95	Gga_rs14837791	67350164	15	NE	SB	SB
24	GGaluGA019785	59160363	4	5	6	SB	96	GGaluGA022910	67377233	15	11	SB	SB
25	Gga_rs14829729	59249324	4	5	SB	SB	97	Gga_rs13879406	67413843	15	11	NE	NE
26	GGaluGA019845	59300237	4	6	SB	SB	98	Gga_rs13879421	67427077	15	11	SB	17
27	GGaluGA019865	59351083	4	6	7	5	99	Gga_rs13879466	67475808	15	NE	22	17
28	Gga_rs13872178	59454532	4	NE	7	5	100	Gga_rs13658076	67601224	16	11	22	SB
29	Gga_rs14830979	60658693	4	NE	8	NE	101	GGaluGA023016	67697026	16	11	SB	SB
30	Gga_rs14832344	61831294	NE	7	8	NE	102	Gga_rs13879736	67735626	16	11	23	NE
31	Gga_rs14833069	62380465	NE	7	8	NE	103	Gga_rs13879784	67781230	16	NE	23	SB
32	Gga_rs13875293	62573281	5	7	SB	SB	104	Gga_rs15298738	67848008	16	NE	23	SB
33	GGaluGA021181	62601430	5	7	SB	SB	105	Gga_rs13879859	67872839	NE	12	24	NE
34	Gga_rs13875380	62693160	6	7	9	NE	106	Gga_rs13879887	67897978	17	12	24	NE
35	Gga_rs13875529	62790297	6	NE	9	NE	107	Gga_rs13879941	67965702	17	12	SB	SB
36	Gga_rs15287637	62817430	NE	7	SB	SB	108	Gga_rs13658256	68029439	18	12	25	SB
37	GGaluGA021292	62957204	6	7	10	SB	109	Gga_rs13880010	68060515	18	12	25	18
38	Gga_rs13875707	62981138	NE	NE	10	SB	110	Gga_rs14838655	68077445	18	12	26	NE
39	GGaluGA021405	63159745	7	8	11	SB	111	Gga_rs13880087	68137603	NE	NE	26	18
40	Gga_rs14834021	63247555	7	NE	11	6	112	Gga_rs13880135	68185624	NE	NE	26	NE
41	Gga_rs14834052	63276069	7	NE	11	6	113	Gga_rs13880197	68257241	19	NE	26	19
42	Gga_rs13876085	63313882	7	NE	11	6	114	Gga_rs13880199	68271184	19	12	26	19
43	GGaluGA021481	63361705	8	NE	11	6	115	Gga_rs13658373	68324195	19	NE	26	19
44	GGaluGA021560	63545902	8	8	11	6	116	GGaluGA023239	68353107	19	13	SB	SB
45	Gga_rs13656739	63651791	8	NE	11	6	117	Gga_rs13880343	68493718	NE	13	27	20
46	GGaluGA021609	63692559	8	8	11	6	118	GGaluGA023296	68576413	NE	NE	27	NE
47	Gga_rs13876452	63713012	8	NE	11	6	119	Gga_rs13880448	68621175	NE	14	27	20
48	GGaluGA021692	63825204	8	NE	11	6	120	Gga_rs13880630	68764271	20	14	27	21
49	Gga_rs13876645	63888976	NE	8	11	7	121	Gga_rs13880661	68781610	20	14	27	21
50	Gga_rs13876806	64003879	9	NE	11	NE	122	GGaluGA023395	68857860	21	14	27	NE
51	GGaluGA021805	64057360	9	NE	11	7	123	GGaluGA023415	68916459	21	14	NE	NE
52	Gga_rs15290417	64068668	9	NE	11	7	124	GGaluGA023421	68944045	21	NE	28	NE
53	GGaluGA021829	64129051	NE	8	11	7	125	Gga_rs14839731	69135264	21	NE	28	SB
54	GGaluGA021832	64142703	10	8	11	7	126	GGaluGA023496	69175190	22	15	29	NE
55	Gga_rs14705733	64305295	10	NE	12	NE	127	Gga_rs15302152	69217611	22	15	29	NE
56	GGaluGA021947	64379238	10	8	12	8	128	Gga_rs14839888	69284025	22	15	29	SB
57	Gga_rs13877395	64561111	10	8	12	NE	129	Gga_rs13658912	69486118	23	NE	29	SB
58	GGaluGA022049	64581351	10	8	12	8	130	Gga_rs13881403	69500407	23	NE	SB	SB
59	GGaluGA022061	64612147	11	8	12	9	131	GGaluGA023889	69936934	24	16	NE	NE
60	Gga_rs14835591	64689810	11	8	12	9	132	GGaluGA023939	70058837	24	NE	30	22
61	Gga_rs13877599	64907370	NE	NE	13	SB	133	Gga_rs13882073	70078073	24	16	30	NE
62	Gga_rs13877632	64970061	NE	8	13	NE	134	Gga_rs13882356	70362275	24	16	NE	NE
63	Gga_rs14835940	65060946	NE	NE	14	10	135	Gga_rs13882359	70378032	NE	NE	SB	22
64	Gga_rs15292659	65131853	NE	8	14	10	136	Gga_rs13882587	70580452	25	NE	SB	SB
65	Gga_rs13877808	65153963	12	8	14	NE	137	GGaluGA024281	70639443	25	17	31	NE
66	GGaluGA022242	65169917	12	NE	SB	10	138	GGaluGA024332	70721952	25	17	31	SB
67	Gga_rs13657382	65360381	12	8	15	NE	139	Gga_rs15306338	70768724	25	17	32	23
68	GGaluGA022366	65376328	12	8	15	NE	140	Gga_rs13882902	70825717	25	17	32	NE
69	GGaluGA022395	65500054	12	9	NE	NE	141	Gga_rs13882941	70857528	NE	17	32	23
70	GGaluGA022406	65536437	13	NE	16	11	142	GGaluGA024409	70888338	25	17	32	23
71	Gga_rs13878139	65686439	13	NE	16	11	143	Gga_rs13883050	70935582	25	NE	32	23
72	Gga_rs13878224	65808659	13	9	16	11	144	Gga_rs13883105	70983902	25	17	32	23

Figura 18 – Origem de cada um dos 144 SNPs selecionados nas gerações F₁ e F₂ provenientes dos machos TT (amarelo) e fêmeas CC (azul); a cor verde representa origem em ambas as linhagens; NE: SNP não empregado na construção dos blocos de haplótipos conforme Tabela 14; SB: SNP que não compôs nenhum bloco de haplótipo, ou seja, apresentou segregação independente; ▲ representa as posições dos dois QTL pleiotrópicos mapeados por Rosário et al. (2012)

De maneira geral, pela Figura 18, demonstra-se que há variabilidade em F_2 decorrente dos cruzamentos entre TT e CC, em que alguns SNPs tiveram origem específica em TT (amarelo) ou CC (azul) ou ainda em ambas as linhagens (verde). Há, ainda, SNPs que são consistentes ao longo das três gerações e encontram-se posicionados no mesmo bloco de haplótipos. Adicionalmente, dos cinco SNPs apresentados na Tabela 15, apenas para dois foi possível sugerir a origem, são eles: *Gga_rs13870613*, que apresentou origem exclusiva em CC (bloco 2) (Figura 14), e *GGaluGA019533* em ambas as linhagens (bloco 1 em TT, Figura 13 e bloco 3 em CC, Figura 14).

Quando se comparam os resultados de Rosário et al. (2012) com os do presente estudo, evidencia-se que o QTL pleiotrópico 1 (173 cM) mapeado por estes autores foi associado, simultaneamente, com: PV41, COR, GOR e CZ_MZ (Tabela 3), enquanto neste trabalho, SNPs, adjacentes a esta mesma região, foram associados com: PV41, GP3541, CA3541, INT, PES, PER, PEI, AS, CAR, FIG, COR, PUL, GOR, TRI, EE_MS e CZ_MS (Figura 17). As características PV41, COR e GOR corroboraram o efeito de aditividade observado por aqueles autores, enquanto para CZ_MS, eles evidenciaram apenas efeitos aditivos e neste trabalho, ambos os efeitos foram significativos (Figura 17X). Já o QTL pleiotrópico 2 (203 cM) foi, simultaneamente, associado com: PV41, AS, CAB, COR, MOE, GOR, PB_MS, EE_MS e CZ_MS, enquanto que neste estudo, SNPs, adjacentes a esta mesma região, foram associados com: PV41, CR3541, INT, PES, PEI, CAB, AS, FIG, COR, PUL, MOE, HEM, GOR, COL, TC, PB_MS, EE_MS e CZ_MS, corroborando os efeitos evidenciados por Rosário et al. (2012).

Portanto, mesmo com uma densidade menor de marcadores microssatélites, ao todo 10 posicionados na região alvo (Figura 11), a maior parte dos QTL mapeados por Rosário et al. (2012) foram confirmados neste trabalho empregando 144 SNPs mais informativos que adensaram a mesma região. Como esta foi selecionada com base em QTL supostamente ligados, os resultados obtidos abrem as portas para que sejam conduzidas análises de mapeamento de QTL empregando-se o multiCIM incluindo tanto os dados genotípicos provenientes de microssatélites (AMBO et al., 2009) quanto dos 144 SNPs. A partir deste adensamento, será possível implementar testes que considerem um QTL (pleiotrópico) ou dois QTL (ligados) na região compreendida entre 168 e 208

cM do GGA1. Desta forma, as causas da correlação genética entre características de interesse poderão ser ainda mais bem compreendidas na população TCTC.

Outro achado que merece destaque, reside no fato de que nas proximidades do QTL pleiotrópico 1 (173 cM) o PV41 ter sido associado com SNPs, os quais exibiram as maiores significâncias para efeito aditivo (Figura 17A e Tabela 15); já nas proximidades do QTL pleiotrópico 2 (203 cM), foram evidenciados SNPs associados com GOR, PB_MS e EE_MS, que exibiram as maiores significâncias para efeito de dominância (Figuras 17R, 17V e 17W, respectivamente). De acordo com o Quadro 1, a correlação fenotípica estimada entre PV41 e GOR não foi significativa, enquanto entre PV41 e PB_MS e PV41 e EE_MS foi de -0,40 e -0,38, respectivamente, ambas significativas. Acrescenta-se a este achado, que o maior valor de correlação significativa foi evidenciado entre PB_MS e EE_MS (-0,90).

Assim, uma forma de explorar melhor tal achado, pode ser a condução de testes de interação entre os SNPs adjacentes ao QTL pleiotrópico 1 (aditivos) com aqueles adjacentes ao QTL pleiotrópico 2 (dominância) e, assim, abrir possibilidades para estudar a ação gênica interalélica denominada de epistasia, a exemplo do trabalho conduzido por Pinto (2007). Esta pode ser mais bem compreendida, empregando-se modelos que incluam a interação entre efeitos $a \times a$, $a \times d$, $d \times a$ e $d \times d$ dos SNPs, já que agora tais efeitos foram estimados para cada SNP significativo na região alvo deste estudo.

Portanto, a condução de outros trabalhos se mostra de interesse para identificar e compreender melhor as regiões genômicas associadas a características de interesse para a avicultura, especialmente entre 168 e 208 cM do GGA1. Na prática, os programas de melhoramento genético têm almejado obter materiais genéticos que exibam, em média, maior peso vivo (PV41), ou seja, proteína bruta (PB_MS), e menor teor de gordura (GOR), ou seja, extrato etéreo (EE_MS).

4.10 QTL e genes candidatos

No presente estudo, alguns resultados corroboraram os QTL compilados na Tabela 16, enquanto que outros foram inéditos. As características para as

quais já foram mapeados QTL ou associados com SNPs foram: PV41 (SEWALEM et al., 2002; JENNEN et al., 2005; ATZMON et al., 2008; SU et al., 2012; BOSCHIERO et al., 2013), CR3541 (BOSCHIERO et al., 2013), PER (IKEOBI et al., 2004; ANKRA-BADU et al., 2010), PEI (ATZMON et al., 2008); AS (BOSCHEIRO et al., 2013), CAR (NASSAR et al., 2012; SU et al., 2012) e GOR (ATZMON et al., 2006; McELROY et al., 2006; ATZMON et al., 2007; ATZMON et al., 2008; ANKRA-BADU et al., 2010). Já para as características GP3541, CA3541, INT, PES, CAB, FIG, COR, MOE, PUL, HEM, COL, TRI, TC, PB_MS, EE_MS, CZ_MS as associações detectadas ainda não foram descritas na literatura.

Tabela 16 – QTL previamente descritos na literatura nas regiões onde os dois QTL pleiotrópicos: o primeiro (168 – 178 cM) e o segundo (198 – 208 cM) foram mapeados por Rosário et al. (2012)

QTL pleiotrópico 1 (168 - 178 cM)			
Característica	Posição (cM)	Tipo de mapeamento	Referência
Peso corporal (41 dias)	177,0	QTN	Boschiero et al. (2013)
Consumo de ração			
Porcentagem gordura abdominal	168,8	QTL	Hocking et al. (2012)
Comprimento de penas caudais			
Teor de gordura na carcaça com base na matéria seca	168,9	QTL	Nones et al. (2012)
Teor de gordura na carcaça	169,8	QTN	Dorshorst et al. (2011)
Crescimento (63 -77 dias)	174,0		
Peso da coxa e sobrecoxa	172,5	QTL	Ankra-Badu et al. (2010)
Porcentagem de coxa e sobrecoxa	174,5		
Peso da gordura abdominal	178,5	QTL	McElroy et al. (2006)
Peso da gordura abdominal	172,8		
Peso do músculo da coxa	169,0	QTL	Ikeobi et al. (2004)
Bicagem de penas	169,0	QTL	Buitenhuis et al. (2003)
Peso corporal	169,0	QTL	Sewalem et al. (2002)
QTL pleiotrópico 2 (198 - 208 cM)			
Comprimento da pena da asa	204,1	QTL	Hocking et al. (2012)
Peso da carcaça	203,4	QTL	Nassar et al. (2012)
Peso corporal (28, 42, 56, 70 e 84 dias)	202,0	QTN	Su et al. (2012)
Peso da carcaça	205,0	QTL	Baron et al. (2010)
Porcentagem de asas			
Peso corporal (21 e 42 dias)	204,0	QTN	Atzmon et al. (2008)
Peso do músculo do peito			
Peso da gordura abdominal	205,0	QTN	Atzmon et al. (2007)
Peso da gordura abdominal			
Coloração do peito	199,2	QTL	Nadaf et al. (2007)
Peso da gordura abdominal	205,0	QTL	Atzmon et al. (2006)
Peso corporal (35 e 49 dias)	200,8	QTL	Jennen et al. (2005)
Porcentagem de gordura abdominal	205,0		
Peso da gordura abdominal	205,0	QTL	Tilquin et al. (2005)
Carga bacteriana cloacal após o desafio com <i>Salmonella</i>	207,0		
Taxa de produção de ovos	205,0	QTL	Sasaki et al. (2004)
Idade ao primeiro ovo	207,0	QTL	Tuiskula-Haavisto et al. (2004)
Idade da maturidade sexual	205,0	QTN	Wardêcka, et al. (2002)

Fonte: *Chicken Quantitative Trait Loci database - ChickenQTLdb* (<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>)

Por meio de buscas *in silico* entre 57,2 a 60,6 Mpb (primeiro intervalo) e 67,5 a 70,9 Mpb (segundo intervalo), foi possível identificar 48 e 49 possíveis genes candidatos posicionais, respectivamente, o que corresponde ~ 4 % dos

genes posicionados no GGA1 da galinha (total de 2.411 genes), (dados disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>. Acesso em: 09/01/13).

Dentre o total de genes localizados no primeiro e segundo intervalos, excluindo-se todos os genes cujos símbolos são *LOC*, foram evidenciados 21 e 16 genes, respectivamente, cujas funções já foram previamente determinadas. Deste total, foram selecionados seis genes, sendo três contidos em cada intervalo.

Para o primeiro intervalo, foram selecionados o *IGF1* (*fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1*, gene ID: 418090), *MYBPC1* (*miosina proteína C de ligação tipo lenta*, gene ID: 418099) e *MTPN* (*miotrofina*, gene ID: 395702). Para o segundo: *SOX-5* (*região determinante do sexo Y*, gene ID: 418195), *FGFR1OP2* (*oncogene partner 2*, gene ID: 418214) e *TTLL12* (*semelhante a tubulina-tirosina ligase*, gene ID: 418227).

O gene *IGF1* tem sido amplamente estudado em diversas espécies, incluindo a galinha, pois está associado com importantes ações fisiológicas, a saber: crescimento, proliferação e diferenciação dos músculos (mioblastos e linhagens miogênicas), cartilagens e ossos (DUCLOS et al., 1999; ZHOU et al., 2005).

MYBPC1 pode estar relacionado com o desenvolvimento muscular e metabolismo de lipídeos em frangos. Cui et al., 2012, identificaram genes expressos e vias relacionadas à deposição de gordura intramuscular do peito em duas raças distintas: *Beijing-you* (crescimento lento) e *Arbor Acres* (crescimento rápido). Dentre outros genes identificados, estes autores verificaram que a expressão de *MYBPC1* foi correlacionada com as mudanças nos padrões de conteúdo lipídico ou peso do peito em ambas as linhagens.

O gene *MTPN* foi caracterizado e expresso em suínos por Wang et al. (2012) sendo importante para o crescimento do músculo esquelético. Este gene também se expressa no músculo cardíaco, em que controla a hipertrofia cardíaca bem como no crescimento normal de miócitos cardíacos em seres humanos (SIL et al., 1993).

Já *SOX-5* regula a diferenciação muscular, e foi evidenciado em células miogênicas de trutas durante o desenvolvimento embrionário (RESCAN et al.,

2010) e em células da medula espinhal de embriões de pintinho (MARTINEZ-MORALES et al., 2010).

A expressão gênica de *FGFR1OP2/wit3.0* foi identificada em um conjunto de fibroblastos de feridas bucais de ratos, localizado imediatamente abaixo da proliferação epitelial (LIN et al., 2010). Estes autores sugerem que este gene possa desempenhar papel na regeneração de tecidos.

Jorge et al. (2010), analisando expressão gênica de tecidos musculares oriundos de *pools* das linhagens TT (corte) e CC (postura), as mesmas empregadas neste estudo, identificaram que o gene *TTLL12* foi altamente expresso por meio de análises de *macroarrays*. A expressão deste gene também foi encontrada em células normais e linhagens de células tumorais de próstata em humano (WASYLYK et al., 2010).

Estes seis genes indicados poderão ser empregados em estudos mais detalhados, como por exemplo, análise de expressão gênica por meio da quantificação do RNA mensageiro de tecido muscular proveniente das linhagens TT e CC, à semelhança dos trabalhos conduzidos por Ninov (2010), Gois et al. (2013) e Gonçalves et al. (2013).

5 CONCLUSÕES

- (i) A região alvo selecionada foi definida entre 168 a 208 cM do GGA 1 (40 cM).
- (ii) O emprego do *Beadchip* de SNP de 60 k possibilitou a genotipagem das gerações Parental (linhagens TT e CC) e F_1 , e permitiu caracterizá-las com base na classe genotípica, MAF e tipo de polimorfismo.
- (iii) Os 144 SNPs mais informativos foram selecionados almejando maximizar o nível de heterozigose dos cinco casais F_1 , a fim de que as três classes genotípicas (AA, AB e BB), para um dado SNP, pudessem ser evidenciadas na geração F_2 .
- (iv) O ensaio customizado contendo os 144 SNPs mais informativos também permitiu caracterizar genotipicamente a geração F_2 em função da classe genotípica, MAF e tipo de polimorfismo.
- (v) A geração F_2 apresenta variabilidade fenotípica decorrente dos cruzamentos conduzidos entre as linhagens TT e CC, bem como, correlações fenotípicas significativas entre a maior parte das 24 características avaliadas.
- (vi) A linhagem TT apresenta maior variabilidade genotípica que CC, porém, os F_1 foram superiores às linhagens Parentais com base no número de heterozigotos e MAF. Adicionalmente, há redução de heterozigotos e MAF em F_2 , em função da média de F_1 , em decorrência de existir certo grau de parentesco e endogamia entre os animais que compuseram esta geração.
- (vii) Os blocos de haplótipos construídos evidenciaram regiões com diferentes níveis de desequilíbrio de ligação ao longo das três gerações, em que, TT e CC apresentaram os maiores níveis seguidos por F_1 , e por último, os F_2 .
- (viii) Os testes de associação não só permitiram confirmar regiões de QTL e QTN já descritos na literatura, como também aqueles mapeados por Rosário et al. (2012). Novas associações foram identificadas para características de interesse da avicultura, a saber: GP3541, CA3541, INT, PES, CAB, FIG, COR, MOE, PUL, HEM, COL, TRI, TC, PB_MS, EE_MS, CZ_MS.

REFERÊNCIAS

- ABASHT, B.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Review of quantitative trait loci identified in the chicken. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, p. 2079–2096, 2006.
- ABASHT, B.; SANDFORD, E.; ARANGO, J.; SETTAR, P.; FULTON, J.E.; O'SULLIVAN, N.P.; HASSEN, A.; HABIER, D.; FERNANDO, R.L.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Extent and consistency of linkage disequilibrium and identification of DNA markers for production and egg quality traits in commercial layer chicken populations. **BMC Genomics**, London, v. 10, (Suppl 2) S2, 2009.
- AERTS, J.; MEGENS, H.J.; VEENENDAAL, T.; OVCHARENKO, I.; CROOIJMANS, R.; GORDON, L.; STUBBS, L.; GROENEN, M. Extent of linkage disequilibrium in chicken. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 117, n. 1-4, p. 338–345, 2007.
- GIBBS, R.A.; BELMONT, J.W.; BOUDREAU, A.; LEAL, S.M.; HARDENBOL, P.; PASTERNAK, S.; WHEELER, D.A.; WILLIS, T.D.; YU, F.; YANG, H.; ZENG, C.; GAO, Y.; HU, H.; HU, W.; LI, C.; LIN, W.; LIU, S.; PAN, H.; TANG, X.; WANG, J.; WANG, W.; YU, J.; ZHANG, B.; ZHANG, Q.; ZHAO, H.; ZHAO, H.; ZHOU, J.; GABRIEL, S.B.; BARRY, R.; BLUMENSTIEL, B.; CAMARGO, A.; DEFELICE, M.; FAGGART, M.; GOYETTE, M.; GUPTA, S.; MOORE, J.; NGUYEN, H.; ONOFRIO, R.O.; PARKIN, M.; ROY, J.; STAHL, E.; WINCHESTER, E.; ZIAUGRA, L.; ALTSHULER, D.; SHEN, Y.; YAO, Z.; HUANG, W.; CHU, X.; HE, Y.; JIN, L.; LIU, Y.; SHEN, Y.; SUN, W.; WANG, H.; WANG, Y.; WANG, Y.; WANG, Y.; XIONG, X.; XU, L.; WAYE, M.M.Y.; TSUI, S.K.W.; XUE, H.; WONG, J.T.F.; GALVER, L.M.; JIAN-BING F.; MURRAY, S.S.; OLIPHANT, A.R.; CHEE, M.S.; MONTPETIT, A.; CHAGNON, F.; FERRETTI, V.; LEOUEUF, M.; OLIVIER, J.F.; PHILLIPS, M.S.; ROUMY, S.; SALLÉE, C.; VERNER, A.; HUDSON, T.J.; FRAZER, K.A.; BALLINGER, D.G.; COX, D.R.; HINDS, D.A.; STUVE, L.L.; KWOK, P.Y.; CAI, D.; KOBOLDT, D.C.; MILLER, R.D.; PAWLIKOWSKA, L.; TAILLON-MILLER, P.; XIAO, M.; TSUI, L.C.; MAK, W.; SHAM, P.C.; SONG, Y.Q.; TAM, P.K.H.; NAKAMURA, Y.; KAWAGUCHI, T.; KITAMOTO, T.; MORIZONO, T.; NAGASHIMA, A.; OHNISHI, Y.; SEKINE, A.; TANAKA, T.; TSUNODA, T.; DELOUKAS, P.; BIRD, C.P.; DELGADO, M.; DERMITZAKIS, E.T.; GWILLIAM, R.; HUNT, S.; MORRISON, J.; POWELL, D.; STRANGER, B.E.; WHITTAKER, P.; BENTLEY, D.R.; DALY, M.J.; DE BAKKER, P.I.W.; BARRETT, J.; FRY, B.; MALLER, J.; MCCARROLL, S.; PATTERSON, N.; PÉER, I.; PURCELL, S.; RICHTER, D.J.; SABETI, P.; SAXENA, R.; SCHAFFNER, S.F.; VARILLY, P.; ALTSHULER, D.; STEIN, L.D.; KRISHNAN, L.; SMITH, A.V.; THORISSON, G.A.; CHAKRAVARTI, J.H.A.; CHEN, P.E.; CUTLER, D.J.; KASHUK, C.S.; LIN, S.; ABECASIS, G.R.; GUAN, W.; MUNRO, H.M.; QIN, Z.S.; THOMAS, D.J.; MCVEAN, G.; BOTTOLO, L.; EYHERAMENDY, S.; FREEMAN, C.; MARCHINI, J.; MYERS, S.; SPENCER, C.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P.; CARDON, L.R.; CLARKE, G.; EVANS, D.M.; MORRIS, A.P.; WEIR, B.S.; TSUNODA, T.; MULLIKIN, J.C.; SHERRY, S.T.; FEOLO, M.; ZHANG, H.; ZENG, C.; ZHAO, H.; MATSUDA, I.; FUKUSHIMA, Y.; MACER, D.R.; SUDA, E.; ROTIMI, C.N.; ADEBAMOWO, C.A.; AJAYI, I.; ANIAGWU, T.; MARSHALL, P.A.; NKWODIMMAH, C.; ROYAL, C.D.M.; LEPPERT, M.F.; DIXON, M.; PEIFFER, A.; QIU, R.; KENT, A.; KATO, K.; NIIKAWA, N.; ADEWOLE, I.F.; KNOPPERS, B.M.;

FOSTER, M.W.; CLAYTON, E.W.; WATKIN, J.; GIBBS, R.A.; BELMONT, J.W.; MUZNY, D.; NAZARETH, L.; SODERGREN, E.; WEINSTOCK, G.M.; WHEELER, D.A.; YAKUB, I.; GABRIEL, S.B.; ONOFRIO, R.C.; RICHTER, D.J.; ZIAUGRA, L.; BIRREN, B.W.; DALY, M.J.; ALTSHULER, D.; WILSON, R.K.; FULTON, L.L.; ROGERS, J.; BURTON, J.; CARTER, N.P.; CLEE, C.M.; GRIFFITHS, M.; JONES, M.C.; MCLAY, K.; PLUMB, R.W.; ROSS, M.T.; SIMS, S.K.; WILLEY, D.L.; CHEN, Z.; HAN, H.; KANG, L.; GODBOUT, M.; WALLENBURG, J.C.; ARCHEVÊQUE, P.; BELLEMARE, G.; SAEKI, K.; WANG, H.; AN, D.; FU, H.; LI, Q.; WANG, Z.; WANG, R.; HOLDEN, A.L.; BROOKS, L.D.; MCEWEN, J.E.; BIRD, C.R.; GUYER, M.S.; NAILER, P.J.; WANG, V.O.; PETERSON, J.L.; SHI, M.; SPIEGEL, J.; SUNG, L.M.; WITONSKY, J.; ZACHARIA, L.F.; COLLINS, F.S.; KENNEDY, K.; JAMIESON, R.; STEWART, J. A haplotype map of the human genome. **Nature**, London, v. 437, n. 27, p.1299-1320, 2005.

AMBO, M.; CAMPOS, R.L.R.; MOURA, A.S.M.T.; BOSCHIERO, C.; 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**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 200-208, 2009.

ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 5, n. 3, p. 202-212, 2004.

ANDREESCU, C.; AVENDANO, S.; BROWN, S.R.; HASSEN, A.; LAMONT, S.J.; DEKKERS, J.C.M. Linkage disequilibrium in related breeding lines of chickens. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 177, p. 2161–2169, 2007.

ANKRA-BADU, G.A.; SHRINER, D.; BIHAN-DUVAL, E.L.; MIGNON-GRASTEAU, S.; PITEL, F.; BEAUMONT, C.; DUCLOS, M.J.; SIMON, J.; PORTER, T.E.; VIGNAL, A.; COGBURN, L.A.; ALLISON, D.B.; YI, N.; AGGREY, S.E. Mapping main, epistatic and sex-specific QTL for body composition in a chicken population divergently selected for low or high growth rate. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 107, 2010.

ARDLIE, K.G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, n. 4, p. 299-310, 2002.

ASHRAFUL, K.M. Karyotypic analysis of chickens and other birds. **Global Advanced Research Journal of Biotechnology**, New York, v. 1, n. 2, p. 23-32, 2012.

ATZMON, G.; RONIN, YI.; KOROL, A.; YONASH, N.; CHENG, H.; HILLEL, J. QTLs associated with growth traits and abdominal fat weight and their interactions with gender and hatch in commercial meat-type chickens. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 4, p. 352-358, 2006.

ATZMON, G.; BLUM, S.; FELDMAN, M.; LAVI, U.; HILLEL, J. Detection of agriculturally important QTLs in chickens and analysis of the factors affecting genotyping strategy. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 117, n. 1-4, p. 327-337, 2007.

ATZMON, G.; BLUM, S.; FELDMAN, M.; CAHANER, A.; LAVI, U.; HILLEL, J. QTLs detected in a multigenerational resource chicken population. **Journal of Heredity**, Washington, v. 99, n. 5, p. 528–538, 2008.

BARON, E.E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. 2004. 96p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

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

BOSCHIERO, C.; JORGE, E.C.; NINOV, K.; NONES, K.; ROSÁRIO, M.F.; COUTINHO, L.L.; LEDUR, M.C.; BURT, D.W.; MOURA, A.S.A.M.T. Association of *IGF1* and *KDM5A* polymorphisms with performance, fatness and carcass traits in chickens. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 54, n. 1, p. 103–112, 2013.

BROWN, T.A. **Genomes**. Manchester: BIOS Scientific Publishers, 2002, 572p.

BUITENHUIS, A.J.; RODENBURG, T.B.; VAN HIERDEN, Y.M.; SIWEK, M.; CORNELISSEN, S.J.; NIEUWLAND, M.G.; CROOIJMANS, R.P.; GROENEN, M.A.; KOENE, P.; KORTE, S.M.; BOVENHUIS, H.; VAN DER POEL, J.J. Mapping quantitative trait loci affecting feather pecking behavior and stress response in laying hens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 1215-1222, 2003.

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

BURT, D.W. Applications of biotechnology in the poultry industry. **World's Poultry Science Journal**, Rotterdam, v. 58, p. 5-13, 2002.

BURT, D.W. The chicken genome and the developmental biologist. **Mechanisms of Development**, New York, v. 121, p. 1129–1135, 2004.

BURT, D.W. Chicken genome: Current status and future opportunities. **Genome Research**, Basel, v. 15, n. 12, p. 1692-1698, 2013.

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

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**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 729-736, 2009.

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 22 maio 2013.

CHAN, C.P.; KOK, K.H.; JIN, D.Y. CREB3 subfamily transcription factors are not created equal: Recent insights from global analyses and animal models. **Cell and Bioscience**, London, v. 1, n. 6, 2011.

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

CHICKEN QTL DATABASE. Dados disponíveis em: <<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/GG/index>>. Acesso em: 22 out. 2013.

CHICKEN VARIATION DATABASE (VD). Dados disponível em: <<http://chicken.genomics.org.cn>>, acesso em: 22 out. 2013.

COLLINS, F.S.; BROOKS, L.D.; CHAKRAVARTI, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetics variation. **Genome Research**, Basel, v. 8, n. 12, p. 1229-1231, 1998.

COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F. Biotecnologia Animal. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.

CUI, H.X.; LIU, R.R.; ZHAO, G.P.; ZHENG, M.Q.; CHEN, J.L.; WEN, J. Identification of differentially expressed genes and pathways for intramuscular fat deposition in *pectoralis major* tissues of fast-and slow-growing chickens. **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 213, 2012.

DARVASI, A.; SOLLER, M. Selective genotyping for determination of linkage between a marker locus and quantitative trait locus. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v.85, p.353-359, 1992.

DEKKERS, J.C.M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 3, n. 1, p. 22-32, 2002.

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

DEVLIN, B.; RISCH, N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. **Genomics**, San Diego, v. 29, p. 311–322, 1995.

DOERGE, R.W. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. **Nature Reviews Genetics**, London, v.3, n. 1, p. 43-52, 2002.

DONG, Y.; XIE, M.; JIANG, Y.; XIAO, N.; DU, X.; ZHANG, W.; TOSSER-KLOPP, G.; WANG, J.; YANG, S.; LIANG, J.; CHEN, W.; CHEN, J.; ZENG, P.; HOU, Y.; BIAN, C.; PAN, S.; LI, Y.; LIU, X.; WANG, W.; SERVIN, B.; SAYRE, B.; ZHU, B.; SWEENEY, D.; MOORE, R.; NIE, W.; SHEN, Y.; ZHAO, R.; ZHANG, G.; LI, J.; FARAUT, T.; WOMACK, J.; ZHANG, Y.; KIJAS, J.; COCKETT, N.; XU, X.; ZHAO, S.; WANG, J.; WANG, W. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). **Nature Biotechnology**, London, v. 31, n. 2, p. 135 -143, 2013.

DORSHORST, B.J.; SIEGEL, P.B.; ASHWELL, C.M. Genomic regions associated with antibody response to sheep red blood cells in the chicken. **Animal Genetics**, Oxford, v. 42, n. 3, p. 300–308, 2011.

DUCLOS, M.J.; BECCA VIN, C.; SIMON, J. Genetic models for the study of insulin like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 17, p. 231-243, 1999.

ELSIK, C.G.; TELLAM, R.L.; WORLEY, K.C.; GIBBS, R.A.; MUZNY, D.M.; WEINSTOCK, G.M.; ADELSON, D.L.; EICHLER, E.E.; ELNITSKI, L.; GUIGÓ, R.; HAMERNIK, D.L.; KAPPES, S.M.; LEWIN, H.A.; LYNN, D.J.; NICHOLAS, F.W.; REYMOND, A.; RIJNKELS, M.; SKOW, L.C.; ZDOBNOV, E.M.; SCHOOK, L.; WOMACK, J.; ALIOTO, T.; ANTONARAKIS, S.E.; ASTASHYN, A.; CHAPPLE, C.E.; CHEN, H.C.; CHRAST, J.; CÂMARA, F.; ERMOLAEVA, O.; HENRICHSEN, C.N.; HLAVINA, W.; KAPUSTIN, Y.; KIRYUTIN, B.; KITTS, P.; KOKOCINSKI, F.; LANDRUM, M.; MAGLOTT, D.; PRUITT, K.; SAPOJNIKOV, V.; SEARLE, S.M.; SOLOVYEV, V.; SOUVOROV, A.; UCLA, C.; WYSS, C.; ANZOLA, J.M.; GERLACH, D.; ELHAIK, E.; GRAUR, D.; REESE, J.T.; EDGAR, R.C.; MCEWAN, J.C.; PAYNE, G.M.; RAISON, J.M.; JUNIER, T.; KRIVENTSEVA, E.V.; EYRAS, E.; PLASS, M.; DONTU, R.; LARKIN, D.M.; REECY, J.; YANG, M.Q.; CHEN, L.; CHENG, Z.; CHITKO-MCKOWN, C.G.; LIU, G.E.; MATUKUMALLI, L.K.; SONG, J.; ZHU, B.; BRADLEY, D.G.; BRINKMAN, F.S.; LAU, L.P.; WHITESIDE, M.D.; WALKER, A.; WHEELER, T.T.; CASEY, T.; GERMAN, J.B.; LEMAY, D.G.; MAQBOOL, N.J.; MOLENAAR, A.J.; SEO, S.; STOTHARD, P.; BALDWIN, C.L.; BAXTER, R.; BRINKMEYER-LANGFORD, C.L.; BROWN, W.C.; CHILDERS, C.P.; CONNELLEY, T.; ELLIS, S.A.; FRITZ, K.; GLASS, E.J.; HERZIG, C.T.; IIVANAINEN, A.; LAHMERS, K.K.; BENNETT, A.K.; DICKENS, C.M.; GILBERT, J.G.; HAGEN, D.E.; SALIH, H.; AERTS, J.; CAETANO, A.R.; DALRYMPLE, B.; GARCIA, J.F.; GILL, C.A.; HIENDLEDER, S.G.; MEMILI, E.; SPURLOCK, D.; WILLIAMS, J.L.; ALEXANDER, L.; BROWNSTEIN, M.J.; GUAN, L.; HOLT, R.A.; JONES, S.J.; MARRA, M.A.; MOORE, R.; MOORE, S.S.; ROBERTS, A.; TANIGUCHI, M.; WATERMAN, R.C.; CHACKO, J.; CHANDRABOSE, M.M.; CREE, A.; DAO, M.D.; DINH, H.H.; GABISI, R.A.; HINES, S.; HUME, J.; JHANGIANI, S.N.; JOSHI, V.; KOVAR, C.L.; LEWIS, L.R.; LIU, Y.S.; LOPEZ, J.; MORGAN, M.B.; NGUYEN, N.B.; OKWUONU, G.O.; RUIZ, S.J.; SANTIBANEZ, J.; WRIGHT, R.A.; BUHAY, C.; DING, Y.; DUGAN-ROCHA, S.; HERDANDEZ, J.; HOLDER, M.; SABO, A.; EGAN, A.; GOODELL, J.; WILCZEK-BONEY, K.; FOWLER, G.R.; HITCHENS, M.E.; LOZADO, R.J.; MOEN, C.; STEFFEN, D.; WARREN, J.T.; ZHANG, J.; CHIU, R.; SCHEIN, J.E.; DURBIN, K.J.; HAVLAK, P.; JIANG, H.; LIU, Y.; QIN, X.; REN, Y.; SHEN, Y.; SONG, H.; BELL, S.N.; DAVIS, C.; JOHNSON, A.J.; LEE, S.; NAZARETH, L.V.; PATEL, B.M.; PU, L.L.;

VATTATHIL, S.; WILLIAMS, R.L.J.; CURRY, S.; HAMILTON, C.; SODERGREN, E.; WHEELER, D.A.; BARRIS, W.; BENNETT, G.L.; EGGEN, A.; GREEN, R.D.; HARHAY, G.P.; HOBBS, M.; JANN, O.; KEELE, J.W.; KENT, M.P.; LIEN, S.; MCKAY, S.D.; MCWILLIAM, S.; RATNAKUMAR, A.; SCHNABEL, R.D.; SMITH, T.; SNELLING, W.M.; SONSTEGARD, T.S.; STONE, R.T.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A.; TAYLOR, J.F.; VAN TASSELL, C.P.; MACNEIL, M.D.; ABATEPAULO, A.R.; ABBEY, C.A.; AHOLA, V.; ALMEIDA, I.G.; AMADIO, A.F.; ANATRIELLO, E.; BAHADUE, S.M.; BIASE, F.H.; BOLDT, C.R.; CARROLL, J.A.; CARVALHO, W.A.; CERVELATTI, E.P.; CHACKO, E.; CHAPIN, J.E.; CHENG, Y.; CHOI, J.; COLLEY, A.J.; DE CAMPOS, T.A.; DE DONATO, M.; SANTOS, I.K.; DE OLIVEIRA, C.J.; DEOBALD, H.; DEVINOY, E.; DONOHUE, K.E.; DOVC, P.; EBERLEIN, A.; FITZSIMMONS, C.J.; FRANZIN, A.M.; GARCIA, G.R.; GENINI, S.; GLADNEY, C.J.; GRANT, J.R.; GREASER, M.L.; GREEN, J.A.; HADSELL, D.L.; HAKIMOV, H.A.; HALGREN, R.; HARROW, J.L.; HART, E.A.; HASTINGS, N.; HERNANDEZ, M.; HU, Z.L.; INGHAM, A.; ISO-TOURU, T.; JAMIS, C.; JENSEN, K.; KAPETIS, D.; KERR, T.; KHALIL, S.S.; KHATIB, H.; KOLBEHDARI, D.; KUMAR, C.G.; KUMAR, D.; LEACH, R.; LEE, J.C.; LI, C.; LOGAN, K.M.; MALINVERNI, R.; MARQUES, E.; MARTIN, W.F.; MARTINS, N.F.; MARUYAMA, S.R.; MAZZA, R.; MCLEAN, K.L.; MEDRANO, J.F.; MORENO, B.T.; MORÉ, D.D.; MUNTEAN, C.T.; NANDAKUMAR, H.P.; NOGUEIRA, M.F.; OLSAKER, I.; PANT, S.D.; PANZITTA, F.; PASTOR, R.C.; POLI, M.A.; POSLUSNY, N.; RACHAGANI, S.; RANGANATHAN, S.; RAZPET, A.; RIGGS, P.K.; RINCON, G.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; ROMERO, N.E.; ROSENWALD, A.; SANDO, L.; SCHMUTZ, S.M.; SHEN, L.; SHERMAN, L.; SOUTHEY, B.R.; LUTZOW, Y.S.; SWEEDLER, J.V.; TAMMEN, I.; TELUGU, B.P.; URBANSKI, J.M.; UTSUNOMIYA, Y.T.; VERSCHOOR, C.P.; WAARDENBERG, A.J.; WANG, Z.; WARD, R.; WEIKARD, R.; WELSH, T.H.J.; WHITE, S.N.; WILMING, L.G.; WUNDERLICH, K.R.; YANG, J.; ZHAO, F.Q. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, Landmark, v. 324, p. 522-528, 2009.

EMBRAPA. **Manual de laboratório**. Curso: Técnicas de biologia molecular aplicadas à produção animal. São Carlos, 2009. 14p.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4th ed. New York: Longman: 1996. 464p.

FAO STATISTICAL YEARBOOK 2007. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2007. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1200e/a1200e00.pdf>>. Acesso em: 25 maio 2013.

FAO STATISTICAL YEARBOOK 2013. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e03.pdf>>. Acesso em: 06 dez. 2013.

FELÍCIO, A.M.; BOSCHIERO, C.; BALIEIRO, J.C.C.; LEDUR, M.C.; FERRAZ, J.B.S.; MOURA, A.S.A.M.T.; COUTINHO, L.L. Polymorphisms in *FGFBP1* and *FGFBP2* genes associated with carcass and meat quality traits in chickens. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 208-222, 2013a.

FELÍCIO, A.M.; BOSCHIERO, C.; BALIEIRO, J.C.C.; LEDUR, M.C.; FERRAZ, J.B.S.; FILHO, T.M.; A.S.A.M.T.; COUTINHO, L.L. Identification and association of polymorphisms in *CAPN1* and *CAPN3* candidate genes related to performance and meat quality traits in chickens. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 472-482, 2013b.

FELÍCIO, A.M.; GAYA, L.G.; FERRAZ, J.B.S.; MONCAU, C.T.; MATTOS, E.C.; SANTOS, N.P.; FILHO, T.M.; BALIEIRO, J.C.C.; ELER, J.P. Heritability and genetic correlation estimates for performance, meat quality and quantitative skeletal muscle fiber traits in broiler. **Livestock Science**, Montpellier, v. 157, p. 81–87, 2013c.

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

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

FLINT-GARCIA, S.A.; THORNSBERRY, J.M.; BUCKLER, E.S. Structure of linkage disequilibrium in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 357–374, 2003.

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

FUMIHITO, A.; MIYAKE, T.; TAKADA, M.; OHNO, S.; KONDO, N. One subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 91, p. 12505–12509, 1994.

GABRIEL, S.B.; SCHAFFNER, S.F.; NGUYEN, H.; MOORE, J.M.; ROY, J.; BLUMENSTIEL, B.; HIGGINS, J.; DEFELICE, M.; LOCHNER, A.; FAGGART, M.; LIU-CORDERO, S.N.; ROTIMI, C.; ADEYEMO, A.; COOPER, R.; WARD, R.; LANDER, E.S.; DALY, M.J.; ALTSHULER, D. The structure of haplotype blocks in the human genome. **Science**, Landmark, v. 296, p. 2225-2229, 2002.

GALKINA, S.; DERYUSHEVA, S.; FILLON, V.; VIGNAL, A.; CROOIJMANS, R.; GROENEN, M.; RODIONOV, A.; GAGINSKAYA, E. FISH on avian lampbrush chromosomes produces higher resolution gene mapping. **Genetica**, New York, v. 128, p. 241-251, 2006.

GOIS, A.F.D.; GONÇALVES, G.D.M.; ATTÍLIO, D.B.; PADUAN, M.; COUTINHO, L.L.; LEDUR, M.C.; ROSÁRIO, M.F. Expressão dos genes *ETS2*, *THBS2* e *BTC* associados ao crescimento da galinha doméstica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 21., 2013. Piracicaba. **Anais...** São Paulo: USP, 2013. 1 CD-ROM.

GONÇALVES, G.D.M.; GOIS, A.F.D.; ATTÍLIO, D.B.; PADUAN, M.; COUTINHO, L.L.; LEDUR, M.C.; ROSÁRIO, M.F. Expressão dos genes *FHL2* e *PPARGC1A* associados ao crescimento e nutrição da galinha doméstica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA USP, 21., 2013. Piracicaba. **Anais...** São Paulo: USP, 2013. 1 CD-ROM.

GROENEN, M.A.; ARCHIBALD, A.L.; UENISHI, H.; TUGGLE, C.K.; TAKEUCHI, Y.; ROTHSCCHILD, M.F.; ROGEL-GAILLARD, C.; PARK, C.; MILAN, D.; MEGENS, H.J.; LI, S.; LARKIN, D.M.; KIM, H.; FRANTZ, L.A.; CACCAMO, M.; AHN, H.; AKEN, B.L.; ANSELMO, A.; ANTHON, C.; AUVIL, L.; BADAOU, B.; BEATTIE, C.W.; BENDIXEN, C.; BERMAN, D.; BLECHA, F.; BLOMBERG, J.; BOLUND, L.; BOSSE, M.; BOTTI, S.; BUJIE, Z.; BYSTROM, M.; CAPITANU, B.; CARVALHO-SILVA, D.; CHARDON, P.; CHEN, C.; CHENG, R.; CHOI, S.H.; CHOW, W.; CLARK, R.C.; CLEE, C.; CROOIJMANS, R.P.; DAWSON, H.D.; DEHAIS, P.; DE SAPIO, F.; DIBBITS, B.; DROU, N.; DU, Z.Q.; EVERSOLE, K.; FADISTA, J.; FAIRLEY, S.; FARAUT, T.; FAULKNER, G.J.; FOWLER, K.E.; FREDHOLM, M.; FRITZ, E.; GILBERT, J.G.; GIUFFRA, E.; GORODKIN, J.; GRIFFIN, D.K.; HARROW, J.L.; HAYWARD, A.; HOWE, K.; HU, Z.L.; HUMPHRAY, S.J.; HUNT, T.; HORNSHOJ, H.; JEON, J.T.; JERN, P.; JONES, M.; JURKA, J.; KANAMORI, H.; KAPETANOVIC, R.; KIM, J.; KIM, J.H.; KIM, K.W.; KIM, T.H.; LARSON, G.; LEE, K.; LEE, K.T.; LEGGETT, R.; LEWIN, H.A.; LI, Y.; LIU, W.; LOVELAND, J.E.; LU, Y.; LUNNEY, J.K.; MA, J.; MADSEN, O.; MANN, K.; MATTHEWS, L.; MCLAREN, S.; MOROZUMI, T.; MURTAUGH, M.P.; NARAYAN, J.; NGUYEN, D.T.; NI, P.; OH, S.J.; ONTERU, S.; PANITZ, F.; PARK, E.W.; PARK, H.S.; PASCAL, G.; PAUDEL, Y.; PEREZ-ENCISO, M.; RAMIREZ-GONZALEZ, R.; REECY, J.M.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; ROHRER, G.A.; RUND, L.; SANG, Y.; SCHACHTSCHNEIDER, K.; SCHRAIBER, J.G.; SCHWARTZ, J.; SCOBIE, L.; SCOTT, C.; SEARLE, S.; SERVIN, B.; SOUTHEY, B.R.; SPERBER, G.; STADLER, P.; SWEEDLER, J.V.; TAFER, H.; THOMSEN, B.; WALI, R.; WANG, J.; WANG, J.; WHITE, S.; XU, X.; YERLE, M.; ZHANG, G.; ZHANG, J.; ZHANG, J.; ZHAO, S.; ROGERS, J.; CHURCHER, C.; SCHOOK, L.B. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. **Nature**, London, v. 491, n. 7424, p. 393-398, 2012.

GROENEN, M.A.M.; CROOIJMAS, R.P.; VEENENDAAL, A.; CHENG, H.H.; SIWEK, M.; van der POEL, J.J. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. **Genomics**, San Diego, v. 49, p. 265-274, 1998.

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

GROENEN, M.A.M.; WAHLBERG, P.; FOGGIO, M.; CHENG, H.H.; MEGENS, H.J.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; BESNIER, F.; LATHROP, M.; MUIR, W.M.; WONG, G.K.S.; GUT, I.; ANDERSSON, L. A high-density SNP-based linkage map of the chicken genome reveals sequence features correlated with recombination rate. **Genome Research**, New York, v. 19, p. 510-519, 2009.

GROENEN, M.A.M.; MEGENS, H.; ZARE, Y.; WARREN, W.C.; HILLER, L.W.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VEREIJKEN, A.; OKIMOTO, R.; MUIR, W.M.; CHENG, H.H. The development and characterization of a 60k SNP chip for chicken. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 274, 2011.

GU, X.; FENG C.; MA, L.; SONG, C.; WANG, Y.; DA, Y.; LI, H.; CHEN, K.; YE, S.; GE, C.; HU, X.; LI, N. Genome-Wide Association Study of Body Weight in Chicken F₂ Resource Population. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 7, 2011.

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

HAMILTON, R.M.G. Methods and factors that affect the measurement of egg shell quality. **Poultry Science**, Ithaca, v. 61, p. 2022-2039, 1982.

HAVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Growth, livability, and feed conversion of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 1500–1508, 2003a.

HAVENSTEIN, G.B.; FERKET, P.R.; QURESHI, M.A. Carcass composition and yield of 1957 versus 2001 broilers when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. **Poultry Science**, Ithaca, v. 82, p. 1509–1518, 2003b.

HENIKOFF, S.; AHMAD, K.; MALIK, H.S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. **Science**, Landmark, v. 293, p. 1089-1102, 2001.

HEIFETZ, E.M.; FULTON, J.E.; O'SULLIVAN, N.; ZHAO, H.; DEKKERS, J.C.M.; SOLLER, M. Extent and consistency across generations of linkage disequilibrium in commercial layer chicken breeding populations. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 171, p. 1173–1181, 2005.

HILLIER, L.W.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R.C.; PONTING, C.P.; BORK, P.; BURT, D.W.; GROENEN, M.A.M.; DELANY, M.E.; DODGSON, J.B.; CHINWALLA, A.T.; CLIFTEN, P.F.; CLIFTON, S.W.; DELEHAUNTY, K.D.; FRONICK, C.; FULTON, R.S.; GRAVES, T.A.; KREMITZKI, C.; LAYMAN, D.; MAGRINI, V.; MCPHERSON, J.D.; MINER, T.L.; MINX, P.; NASH, W.E.; NHAN, M.N.; NELSON, J.O.; ODDY, L.G.; POHL, C.S.; RANDALL-MAHER, J.; SMITH, S.M.; WALLIS, J.W.; YANG, S.P.; ROMANOV, M.N.; RONDELLI, C.M.; PATON, B.; SMITH, J.; MORRICE, D.; DANIELS, L.; TEMPEST, H.G.; ROBERTSON, L.; MASABANDA, J.S.; GRIFFIN, D.K.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; JACOBBSOON, L.; KERJE, S.; ANDERSSON, L.; CROOIJMANS, R.P.M.; AERTS, J.; VAN DER POEL, J.J.; ELLEGREN, H.; CALDWELL, R.B.; HUBBARD, S.J.; GRAFHAM, D.V.; KIERZEK, A.M.; MCLAREN, S.R.; OVERTON, I.M.; ARAKAWA, H.; BEATTIE, K.J.; BEZZUBOV, Y.; BOARDMAN, P.E.; BONFIELD, J.K.; CRONING, M.D.R.; DAVIES, R.M.; FRANCIS, M.D.; HUMPHRAY, S.J.; SCOTT, C.E.; TAYLOR, R.G.; TICKLE, C.; BROWN, W.R.A.; ROGERS, J.; BUERSTEDDE, J.M.; WILSON, S.A.; STUBBS, L.; OVCHARENKO, I.; GORDON, L.; LUCAS, S.; MILLER, M.M.; INOKO, H.; SHIINA, T.; KAUFMAN, J.; SALOMONSEN, J.; SKJOEDT, K.; WONG, G.K.S.; WANG, J.; LIU, B.; WANG,

J.; YU, J.; YANG, H.M.; NEFEDOV, M.; KORIABINE, M.; DEJONG, P.J.; GOODSTADT, L.; WEBBER, C.; DICKENS, N.J.; LETUNIC, I.; SUYAMA, M.; TORRENTS, D.; VON MERING, C.; ZDOBNOV, E.M.; MAKOVA, K.; NEKRUTENKO, A.; ELNITSKI, L.; ESWARA, P.; KING, D.C.; YANG, S.; TYEKUCHEVA, S.; RADAKRISHNAN, A.; HARRIS, R.S.; CHIAROMONTE, F.; TAYLOR, J.; HE, J.B.; RIJNKELS, M.; GRIFFITHS-JONES, S.; URETA-VIDAL, A.; HOFFMAN, M.M.; SEVERIN, J.; SEARLE, S.M.J.; LAW, A.S.; SPEED, D.; WADDINGTON, D.; CHENG, Z.; TUZUN, E.; EICHLER, E.; BAO, Z.R.; FLICEK, P.; SHTEYNBERG, D.D.; BRENT, M.R.; BYE, J.M.; HUCKLE, E.J.; CHATTERJI, S.; DEWEY, C.; PACHTER, L.; KOURANOV, A.; MOURELATOS, Z.; HATZIGEORGIOU, A.G.; PATERSON, A.H.; IVARIE, R.; BRANDSTROM, M.; AXELSSON, E.; BACKSTROM, N.; BERLIN, S.; WEBSTER, M.T.; POURQUIE, O.; REYMOND, A.; UCLA, C.; ANTONARAKIS, S.E.; LONG, M.Y.; EMERSON, J.J.; BETRAN, E.; DUPANLOUP, I.; KAESMANN, H.; HINRICHS, A.S.; BEJERANO, G.; FUREY, T.S.; HARTE, R.A.; RANEY, B.; SIEPEL, A.; KENT, W.J.; HAUSSLER, D.; EYRAS, E.; CASTELO, R.; ABRIL, J.F.; CASTELLANO, S.; CAMARA, F.; PARRA, G.; GUIGO, R.; BOURQUE, G.; TESLER, G.; PEVZNER, P.A.; SMIT, A.; FULTON, L.A.; MARDIS, E.R.; WILSON, R.K. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, London, v. 432, n. 7018, p. 695-716, 2004.

HOCKING P.M.; MORRICE, D.M.; LAW, A.S.; BURT, D.W. Many quantitative trait loci for feather growth in an F(2) broiler × layer cross collocate with body weight loci. **British Poultry Science**, London, v. 53, n. 2, p.162-167, 2012.

HUNTON, P. Industrial breeding and selection. In: CRAWFORD, R.D. (Ed.). **Poultry Breeding and Genetics**. New York: Elsevier Science, 1990. p. 985-1028.

IKEOBI, C.O.N.; WOOLLIAMS, J.A.; MORRICE, D.R.; LAWA, A.; WINDSOR, D.; D.W. BURT, P.M HOCKING. Quantitative trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 87, p. 143–151, 2004.

ILLUMINA. BeadArray technology: A fundamentally different approach to high-density microarrays. Disponível em: <http://www.illumina.com/technology/beadarray_technology.ilmn>. Acesso em: 22 maio 2013.

ILLUMINA. Illumina BeadStudio data analysis programa modules. 2006. Disponível em: http://www.illumina.com/Documents/products/datasheets/datasheet_beadstudio.pdf. Acesso em: 19 de fev. de 2012.

ILLUMINA. Infinium HD Assay Ultra Protocol Guide. 2009a. Disponível em: http://supportres.illumina.com/documents/myillumina/67f59f89-51ee-44d6-b1bb-a53dcb5bd01e/infinium_hd_ultra_user_guide_11328087_revb.pdf. Acesso em: 29 ago. 2013.

ILLUMINA. GoldenGate Assay Overview. 2009b. Disponível em: <http://support.illumina.com/training/array_training.ilmn/goldengateassay>. Acesso em: 29 ago. 2013.

ILLUMINA. Designing custom GodenGate[®] genotyping. 2010. Disponível em: <www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_goldengate_design.pdf>. Acesso em: 20 maio 2013.

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

JIA, X.; CHEN, S.; ZHOU, H.; LI, D.; LIU, W.; YANG, N. Copy number variations identified in the chicken using a 60K SNP BeadChip. **Animal Genetics**, Oxford, v. 44, n. 3, p. 276–284, 2012.

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**, Rotterdam, v. 63, p. 597-610, 2007.

JORGE, E.C.; MELLO, C.M.R.; ROSÁRIO, M.F.; ROSSI, J.R.S.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; COUTINHO, L.L. Chicken skeletal muscle-associated macroarray for gene discovery. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 188-207, 2010.

KNOTT, S.A.; HALEY, C.S. Multitrait least squares for quantitative trait loci detection. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 156, p. 899–911, 2000.

KRANIS, A.; GHEYAS, A.A.; BOSCHIERO, C. TURNER, F.; YU, L.; SMITH, S.; TALBOT, R.; PIRANI, A.; BREW, F.; KAISER, P.; HOCKING, P.M.; FIFE, M.; SALMON, N.; FULTON, J.; STROM, T.M.; HABERER, G.; WEIGEND, S.; PREISINGER, R.; GHOLAMI, M.; QANBARI, S.; SIMIANER, H.; WATSON, K.A.; WOOLLIAMS, J.A.; BURT, D.W. Development of a high density 600k SNP genotyping array for chicken. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 59, 2013.

LEVIN I.; SANTAGELO, L.; CHENG, H.; CRITTENDEN L.B., DODGSON J.B. An autosomal genetic linkage map of the chicken. **Journal of Heredity**, Washington, v. 85, p. 79-85, 1994.

LEWIN, B. The content of the genome. In:_____. **Gene IX**. London: Jones & Bartlett, 2007, chap. 4, 2007. p. 55-75.

LIMA, A.A.; VIEIRA, S.L.; CORTELING, J. Eclodibilidade de ovos oriundos de matrizes com extremos em idade e de pesos diferentes. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 3, p. 86-94, 2001.

LIN, A., HOKUGO, A., CHOI, J., NISHIMURA, I. Small cytoskeleton-associated molecule, fibroblast growth factor receptor 1 oncogene partner 2/wound inducible transcript-3.0 (*FGFR1OP2/wit3.0*), facilitates fibroblast-driven wound closure. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 176, p. 108-121, 2010.

LIU, R.; SUN, Y.; ZHAO, G.; WANG, F.; WU, D.; ZHENG, M. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for body composition and meat quality traits in Beijing-you chickens. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2013.

LIU, W.; LI, D.; LIU, J.; CHEN, S.; QU, L.; ZHENG, J.; XU, G.; YANG, N. A genome-wide snp scan reveals novel loci for egg production and quality traits in white leghorn and brown-egg dwarf layers. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 12, 2011.

LIU, W.; YU, Y.; LI, G.; TANG, S.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, S.; ZHANG, Y. Single-nucleotide polymorphisms in the promoter of the growth hormone-releasing hormone receptor gene are associated with growth and reproduction traits in chickens. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, N. 5, p. 564-569, 2012.

LUO, C.; QU, H.; MA, J.; WANG, J.; LI, C.; YANG, C.; HU, X.; LI, N.; SHU, D. Genome-wide association study of antibody response to Newcastle disease virus in chicken. **BMC Genetics**, Lunger, v. 14, n. 42, 2013a.

LUO, C.; QU, H.; WANG, J.; WANG, Y.; MA, J.; LI, C.; YANG, C.; HU, X.; LI, N. e SHU, D. Genetic parameters and genome-wide association study of hyperpigmentation of the visceral peritoneum in chickens. **BMC Genomics**, London, v. 14, n. 334, 2013b.

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

MacGREGOR, S.; KNOTT, S.A.; WHITE, I.; VISSCHER, P.M. Quantitative trait locus analysis of longitudinal quantitative trait data in complex pedigrees. **Genetics Society of America**, Bethesda, v. 171, p. 1365–1376, 2005.

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

MACKAY, T.F.C.; STONE, E.A.; AYROLES, J.F. The genetics of quantitative traits: challenges and prospects. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 10, n. 8, p. 565-577, 2009.

MAP VIEWER. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>>. Acesso em: 9 jan. 2013.

MAPA – Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/milho>>. Acesso em: 24 maio 2013.

MARTINEZ-MORALES, P.L.; QUIROGA, A.C.; BARBAS, J.A.; MORALES, A.V. SOX5 controls cell cycle progression in neural progenitors by interfering with the WNT–b-catenin pathway. **European Molecular Biology Organization**, Heidelberg, v. 11, n. 6, p. 466-472, 2010.

McDANIEL, G.R.; ROLAND, D.A.; COLEMAN, M.A. The effect of egg shell quality on hatchability and embryonic mortality. **Poultry Science**, Ithaca, v.58, p.10-13, 1979.

McELROY, J.P.; KIM, J.J.; HARRY, D.E.; BROWN, S.R.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Identification of trait loci affecting white meat percentage and other growth and carcass traits in commercial broiler chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 85, p. 593–605, 2006.

MEGENS, H.J.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; BASTIAANSEN, J.W.M.; KERSTENS, H.H.D.; COSTER, A.; JALVING, R.; VEREIJKEN, A.; SILVA, P.; MUIR, W.M.; CHENG, H.H.; HANOTTE, O.; GROENEN, M.A.M. Comparison of linkage disequilibrium and haplotype diversity on macro- and microchromosomes in chicken. **BMC Genetics**, Lunger, v. 10, n. 86, 2009.

NADAF, J.; GILBERT, H.; PITEL, F.; BERRI, C.M.; FEVE, K.; BEAUMONT, C.; DUCLOS, M.J.; VIGNAL, A.; PORTER, T.E.; SIMON, J.; AGGREY, S.E.; COGBURN, L.A.; Le BIHAN-DUVAL, E. Identification of QTL controlling meat quality traits in an F₂ cross between two chicken lines selected for either low or high growth rate. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 155, 2007.

NASSAR, M.K.; GORAGA, Z.S.; BROCKMANN, G.A. Quantitative trait loci segregating in crosses between New Hampshire and White Leghorn chicken lines: II. Muscle weight and carcass composition. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 739–745, 2012.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=GALLUS%20GALLUS>. Acesso em: 22 maio 2013.

NIE, Q.; SUN, B.; ZHANG, D.; LUO, C.; ISHAG, N.A.; LEI, M.; YANG, G.; ZHANG X. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. **Journal of Heredity**, Washington, v. 96, p. 698-703, 2005.

NINOV, K.; LEDUR, M.C.; ALVES, H.J.; ROSÁRIO, M.F.; NONES, K.; COUTINHO, L.L. Investigation of *leptin* gene in broiler and layer chicken lines. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 214-219, 2008.

NINOV, K. **Expressão de genes envolvidos no controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética em galinhas**. 2010. 84p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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

NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MOURA, A.S.A.M.T.; COUTINHO, L.L. Genetic linkage map of chicken chromosome from a Brazilian resource population. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, p. 12-17, 2005.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MELO, C.M.R.; MOURA, A.S.A.M.T.; ZANELLA, E.L.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 95-100, 2006.

NONES, K.; LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; KLEIN, C.; PINTO, L.F.B.; MOURA, A.S.A.M.T.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; AMBO, M.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIEIRO, C. BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with chemical composition of the chicken carcass. **Animal Genetics**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 570–576, 2012.

PEIFFER, D.A. analyzing copy number variation with Infinium® whole-genome genotyping. Disponível em: <<http://www.illumina.com>>. Acesso em: 20 maio 2013.

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

PINARD-VAN DER LAAN, M.H.; BED'HOM, B.; COVILLE, J.L.; PITEL, F.; FEVE, K.; LEROUX, S.; LEGROS, H.; THOMAS, A.; GOURICHON, D.; REPÉRANT, J.M.; RAULT, P. Microsatellite mapping of QTLs affecting resistance to coccidiosis (*Eimeria tenella*) in a Fayoumi x White Leghorn cross. **BMC Genomics**, London, v. 10, n. 31, 2009.

PINTO, L.F.B. **Ocorrência de interações QTL x sexo, de epistasias e de QTLs pleiotrópicos em aves (*Gallus gallus*)**. 2007. 120p. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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.

QANBARI, S.; HANSEN, M.; WEIGEND, S.; PREISINGER, R.; SIMIANER, H. Linkage disequilibrium reveals different demographic history in egg laying chickens. **BMC Genetics**, Lunger, v. 11, n. 103, 2010.

RESCAN, P.Y., RALLIERE, C. A Sox5 gene is expressed in the myogenic lineage during trout embryonic development. **International Journal of Developmental Biology**, Bilbao, v. 54, p. 913–918, 2010.

RODRIGUEZ-ZAS, S.L.; SOUTHEY, B.R.; HEYEN, D.W.; LEWIN, H.A. Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, p. 2681–2691, 2002.

ROSÁRIO, M.F.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Descrição fenotípica das características de desempenho da população CTCT delineada para mapeamento de QTLs em galinha. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, SANTOS, 25., 2007. Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2007. 1 CD-ROM.

ROSÁRIO, M.F.; GAZAFFI, R.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Desvendando as causas da correlação entre características de desempenho e rendimento de carcaça na galinha: ligação x pleiotropia. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 26., 2008. Santos, **Anais...** Campinas: FACTA, 2008. 1 CD-ROM.

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 F_1 s. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 150-158, 2009.

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

ROSÁRIO, M.F.; GAZAFFI, R.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; GARCIA, A.A.F.; COUTINHO, L.L. Base genética da correlação entre características de desempenho e de rendimento de carcaça no cromossomo 1 da galinha. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 29., 2011. Santos, **Anais do Prêmio Lamas**. Campinas: FACTA, 2011. 1 CD-ROM.

ROSÁRIO, M.F.; GAZAFFI, R.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; NONES, K.; GARCIA, A.A.F.; COUTINHO, L.L. Multitrait composite interval mapping reveals pleiotropic QTL on chicken chromosome 1. In: CONFERENCE FOR THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR ANIMAL GENETICS, 33., 2012. Cairns. **Proceedings...** Cairns: ISAG, 2012. 1 CD-ROM.

ROSÁRIO, M.F.; GAZAFFI, R.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A. A. F. Composite interval mapping and mixed models reveal QTL associated with performance and carcass traits on chicken chromosomes 1, 3, and 4. **Journal of Applied Genetics**, Pozna, doi.10.1007/s13353-013-0185-6, 2013.

RUTZ, F.; ANCIUTI, M.A.; XAVIER, E.G.; ROLL, V.F.B.; ROSSI, P. Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 3, p. 307-317, 2007.

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

SAS – Statistical Analyses System. SAS onlinedoc[®], version 9.13, Cary: SAS Institute. 2007. 1 CD-ROM.

SASAKI, O.; ODAWARA, S.; TAKAHASHI, H.; NIRASAWA, K.; OYAMADA, Y.; YAMAMOTO, R.; ISHII, K.; NAGAMINE, Y.; TAKEDA, H.; KOBAYASHI, E.; FURUKAWA, T. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F₂ intercross chickens. **Animal Genetics**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 188–194, 2004.

SCHMID, M.; NANDA, I.; GUTTENBACH, M.; STEINLEIN, C.; HOEHN, M.; SCHARTL, M.; IIAAF, T.; WEIGEND, S.; FRIES, R.; BUERSTEDDE, J.-M.; WIMMERS, K.; BURT, D.W.; SMITH, J.; A'HARA, S.; LAW, A.; GRIFFIN, D.K.; BUMSTEAD, N.; KAUFMAN, J.; THOMSON, P.A.; BURKE, T.; GROENEN, M.A.M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VIGNAL, A.; FILLON, V.; MORISSON, M.; PITEL, F.; TIXIER-BOICHARD, M.; LADJALIMOHAMMEDI, K.; HILLEL, J.; MÄKI-TANILA, A.; CHENG, H.H.; DELANY, M.E.; BURNSIDE, J.; MIZUNO, S. First report on chicken genes and chromosomes 2000. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.90, p.169-218, 2000.

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

SCHOPEN, G.C.B.; BOVENHUIS, H.; VISKER, M.H.P.W.; VAN ARENDONK, J.A.M. Comparison of information content for microsatellites and SNPs in poultry and cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 451–453, 2008.

SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Hayward, v. 6, p. 461-464, 1978.

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

SEATON, G.; HERNANDEZ, J.; GRUNCHEC, J.A.; WHITE, I.; ALLEN, J.; DE KONING, D.J.; WEI, W.; BERRY, D.; HALEY, C.; KNOTT, S. GridQTL: a Grid portal for QTL mapping of compute intensive datasets. WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006. Belo Horizonte. **Proceedings...** Belo Horizonte: WGALP. 1 CD-ROM.

SEREBROVSKAY, S.; PETROV, S. A case of close autosomal linkage in the fowl. **Journal of Heredity**, Washington, v. 19, p. 305-306, 1930.

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

SHORT GENETIC VARIATIONS (dbSNP). Dados disponíveis em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>>. Acesso em: 22 maio 2013.

SIL, P.; MISONO, K.; SEN, S. Myotrophin in human cardiomyopathic heart. **Circulation Research**, Baltimore, v. 73, p. 98-108, 1993.

SILVA, H.D. **Aspectos biométricos da detecção de QTL's ("quantitative trait loci") em espécies cultivadas**. 2001. 166p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SILVA, M.A. Evolução do melhoramento genético de aves no Brasil. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 3, p. 437-445, 2009.

SOUZA, C.A. **Investigação de polimorfismos nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em *Gallus gallus***. 2004. 108p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SU, L.; WANG, S.H.; HAN, R.L.; SUN, G.R.; BAI, Y.C.; LV, S.J.; KANG, X.T. Polymorphisms of the *PNPLA3* gene and their associations with chicken growth and carcass traits. **British Poultry Science**, London, v. 53, n. 4, p. 453-459, 2012.

TABELA NUTRICIONAL DA UNICAMP. Disponível em:
<<http://www.exgordo.com.br/dicas/tabelaunicamp.htm>>. Acesso em: 22 maio 2013.

TAKATA, F.N.; BARATELLA-EVÊNCIO, L.; EVÊNCIONETO, J.; SIMÕES, M. Aspectos morfológicos do oviduto de galinha doméstica (*Gallus gallus*) antes e após a puberdade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 174-176, 2001.

TILQUIN, P.; BARROW, P.A.; MARLY, J.; PITEL, F.; PLISSON-PETIT, F.; VELGE, P.; VIGNAL, A.; BARET, P.V.; BUMSTEAD, N.; BEAUMONT, C. A genome scan for quantitative trait loci affecting the Salmonella carrier-state in the chicken. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 37, n. 5, p. 539-561, 2005.

TUISKULA-HAAVISTO, M.; DE KONING, D.J.; HONKATUKIA, M.; SCHULMAN, N.F.; MÄKI-TANILA, A.; VILKKI, J. Quantitative trait loci with parent-of-origin effects in chicken. **Genetics Research**, Cambridge, v. 84, n. 1, p. 57-66, 2004.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. História da avicultura no Brasil. Disponível em:
<http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil>. Acesso em: 06 dez. 2013.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. Relatório anual 2012/2013. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes?m=75>>. Acesso em: 06 de dez. de 2013.

USDA. United States Department of Agriculture. 2009. Disponível em:
<<http://www.usda.gov>>. Acesso em: 22 maio 2013.

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

WANG, J.; ADELSON, D.L.; YILMAZ, A.; SZE, S.H.; JIN, Y.; ZHU, J.J. Genomic organization, annotation, and ligand-receptor inferences of chicken chemokines and chemokine receptor genes based on comparative genomics. **BMC Genomics**, London, v. 6, n. 45, 2005.

WANG, L.; WANG, Y. Molecular characterization, expression patterns and subcellular localization of *Myotrophin* (*MTPN*) gene in porcine skeletal muscle. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, p. 2733–2738, 2012.

WANG, N.; AKEY, J.M.; ZHANG, K.; CHAKRABORTY, R.; JIN, L. Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. **American Society of Human Genetics**, Bethesda v. 71, p. 1227-1234, 2002.

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

WARBURG, O.; CHRISTIAN, W. Isolation and crystallization of enolase. **Biochemische Zeitschrift**, Wachsmuth, v. 310, p. 384-421, 1942.

WARDÊCKA, B.; OLSZEWSKI, R.; JASZCZAK, K.; ZIĘBA, G.; PIERZCHAŁA, M.; WICIŃSKA, K. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosomes 1-5 originating from the Rhode Island Red and Green-legged Partridge breeds and egg production and quality traits in F₂ mapping population. **Journal of Applied Genetics**, Poznan, v. 43, n. 3, p. 319-329, 2002.

WASYLYK, C.; ZAMBRANO, A.; ZHAO, C.; BRANTS, J.; ABECASSIS, J.; SCHALKEN, J.A.; ROGATSCH, H.; SCHAEFER, G.; PYCHA, A.; KLOCKER, H.; WASYLYK, B. Tubulin tyrosine ligase like 12 links to prostate cancer through tubulin posttranslational modification and chromosome ploidy. **International Journal of Cancer**, New York, v. 127, p. 2542-2553, 2010.

WEISS, K.M.; CLARK, A.G. Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. **Trends in Genetics**, London, v. 18, n. 1, p. 19–24, 2002.

WONG, G.K.S.; LIU, B.; WANG, J.; ZHANG, Y.; YANG, X.; ZHANG, Z.J.; MENG, Q.S.; ZHOU, J.; LI, D.W.; ZHANG, J.J.; NI, P.X.; LI, S.G.; RAN, L.H.; LI, H.; ZHANG, J.G.; LI, R.Q.; LI, S.T.; ZHENG, H.K.; LIN, W.; LI, G.Y.; WANG, X.L.; ZHAO, W.M.; LI, J.; YE, C.; DAI, M.T.; RUAN, J.; ZHOU, Y.; LI, Y.Z.; HE, X.M.; ZHANG, Y.Z.; WANG, J.; HUANG, X.G.; TONG, W.; CHEN, J.; YE, J.; CHEN, C.; WEI, N.; LI, G.Q.; DONG, L.; LAN, F.D.; SUN, Y.Q.; ZHANG, Z.P.; YANG, Z.; YU, Y.P.; HUANG, Y.Q.; HE, D.D.; XI, Y.; WEI, D.; QI, Q.H.; LI, W.J.; SHI, J.P.; WANG, M.H.; XIE, F.; WANG, J.J.; ZHANG, X.W.; WANG, P.; ZHAO, Y.Q.; LI, N.; YANG, N.; DONG, W.; HU, S.N.; ZENG, C.Q.; ZHENG, W.M.; HAO, B.L.; HILLIER, L.W.; YANG, S.P.; WARREN, W.C.; WILSON, R.K.; BRANDSTROM, M.;

ELLEGREN, H.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VAN DER POEL, J.J.; BOVENHUIS, H.; GROENEN, M.A.M.; OVCHARENKO, I.; GORDON, L.; STUBBS, L.; LUCAS, S.; GLAVINA, T.; AERTS, A.; KAISER, P.; ROTHWELL, L.; YOUNG, J.R.; ROGERS, S.; WALKER, B.A.; VAN HATEREN, A.; KAUFMAN, J.; BUMSTEAD, N.; LAMONT, S.J.; ZHOU, H.J.; HOCKING, P.M.; MORRICE, D.; DE KONING, D.J.; LAW, A.; BARTLEY, N.; BURT, D.W.; HUNT, H.; CHENG, H.H.; GUNNARSSON, U.; WAHLBERG, P.; ANDERSSON, L.; KINDLUND, E.; TAMMI, M.T.; ANDERSSON, B.; WEBBER, C.; PONTING, C.P.; OVERTON, I.M.; BOARDMAN, P.E.; TANG, H.Z.; HUBBARD, S.J.; WILSON, S.A.; YU, J.; WANG, J.; YANG, H.M. 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**, Ithaca, v. 85, p. 1896-1899, 2006.

XIE, L.; LUO, C.; ZHANG, C.; ZHANG, R.; TANG, J.; Nie, Q.; Ma, L.; Hu, X.; Li, N.; Da, Y.; Zhang, X. Genome-wide association study identified a narrow chromosome 1 region associated with chicken growth traits. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 2, 2012.

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

YONASH, N.; LEITNER, G.; WAIMAN, R.; HELLER, E.D.; CAHANER, A. Genetic differences and heritability of antibody response to *Escherichia coli* vaccination in young meat-type chicks. **Poultry Science**, Ithaca, v. 75, p. 683-690, 1996.

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

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

ZHOU, H.; MITCHELL, A.D.; MCMURTRY, J.P.; ASHWELL, C.M.; LAMONT, S.J. *Insulin-like growth factor-I* gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. **Poultry Science**, Ithaca, v. 4, p. 212- 221, 2005.

ZLOTINA, A.; GALKINA, S.; KRASIKOVA, A.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; GROENEN, M.A.M.; GAGINSKAYA, E.; DERYUSHEVA, S. Centromere positions in chicken and japanese quail chromosomes: de novo centromere formation versus pericentric inversions. **Chromosome Research**, Oxford, v. 20, p. 1017–1032, 2012.