

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

**Mapeamento simultâneo de QTLs para características de desempenho
e de carcaça no cromossomo 5 de populações recíprocas da galinha
doméstica**

Fernanda Eliza de Jesus Silva

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

**Piracicaba
2010**

Fernanda Eliza de Jesus Silva
Zootecnista

**Mapeamento simultâneo de QTLs para características de desempenho e de
carcaça no cromossomo 5 de populações recíprocas
da galinha doméstica**

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

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

**Piracicaba
2010**

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

Silva, Fernanda Eliza de Jesus

Mapeamento simultâneo de QTLs para características de desempenho e de carcaça no cromossomo 5 de populações recíprocas da galinha doméstica / Fernanda Eliza de Jesus Silva. - - Piracicaba, 2010.

115 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Carcaça 2. Cromossomos 3. Cruzamento animal 4. Galinhas 5. Genes 6. Mapeamento genético 7. Marcador molecular 8. Populações animais I. Título

CDD 636.50824
S586m

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

*Aos meus pais, Romulo e Sandra, às minhas irmãs,
Amanda e Luana, e ao meu amado, Alexandre, no quais
muitas vezes busquei a força que precisava
para continuar minha jornada.*

Dedico

*Ao Dr. Irineu Umberto Packer
(in memoriam) pela oportunidade*

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nas horas mais difíceis.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao meu querido amigo e orientador, Prof. Dr. Millor Fernandes do Rosário, pelo apoio, confiança e incentivo, pessoa exemplar em caráter e dedicação.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pelas oportunidades e contribuições durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Franco Garcia e ao Dr. Rodrigo Gazaffi, pelo imprescindível apoio durante as análises deste trabalho.

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

À Prof. Dra. Deborah Clea Ruy, por ceder os resultados de mapeamento de QTLs.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, Nirlei Aparecida Silva e Jorge Luis Ferreira de Andrade, pela ajuda com as genotipagens e demais orientações laboratoriais.

Aos queridos amigos e companheiros de laboratório, pela agradável convivência e aprendizado constate: Kerli, Andrezza, Clarissa, Fernanda, Priscilla, Lilian, Erika, Aurea, Gustavo, Minos e Marli.

*À minha amiga e estagiária **Luiza Guido**, pela ajuda nas etapas laboratoriais.*

*Às minhas grandes amigas de moradia **Ana Luiza Lopes e Marina Danês**, por todos os momentos de alegria e tristeza que passamos juntas durante esta etapa da minha vida.*

*Aos queridos amigos de Pós-graduação, **Aline, Cristine, Michele, Mary Ana, Leticia (Eva), Ellen, Adenilson**, pelo convívio e momentos de descontração.*

*Aos **docentes e funcionários** do Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, pelos ensinamentos e apoio me oferecidos.*

*À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de estudo.*

*E a **todos** que contribuíram de alguma forma ou em algum momento para a concretização deste trabalho: **MUITO OBRIGADA!***

*"Tudo tem seu tempo, há um momento oportuno para cada empreendimento
debaixo do céu. Tempo para plantar e tempo de colher a planta."*

Ecl. 3-1.2

*"O sucesso é a capacidade de enfrentar
o fracasso sem perder o entusiasmo."*

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 A Galinha doméstica	23
2.2 Caracterização genotípica.....	26
2.3 Mapas de ligação	28
2.4 Mapeamento de QTL	31
2.4.1 Métodos de mapeamento.....	33
2.4.2 Resultados do mapeamento de QTL.....	35
2.4.3 Mapeamento simultâneo de QTLs	37
2.5 Genes candidatos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Populações experimentais	43
3.2 Colheita dos dados fenotípicos e de sangue.....	44
3.3 Extração e quantificação de DNA.....	45
3.4 Seleção de marcadores microssatélites	46
3.5 Otimização da PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	47
3.6 Genotipagem.....	48
3.7 Estimação de parâmetros genotípicos	49

3.8 Análise de segregação	51
3.9 Mapas de ligação.....	51
3.10 Mapeamento de QTLs	52
3.10.1 Modelagem dos dados fenotípicos	52
3.10.2 Obtenção dos preditores genéticos	53
3.10.3 Mapeamento por intervalo	54
3.11 Genes candidatos	55
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1 Estimação de parâmetros genotípicos.....	57
4.2 Padrão de segregação.....	65
4.3 Mapas de ligação.....	68
4.4 Mapeamento de QTLs	71
4.4.1 Características fenotípicas.....	71
4.4.2 Mapeamento por intervalo (IM).....	73
4.5 Genes candidatos	84
5 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS.....	113

RESUMO

Mapeamento simultâneo de QTLs para características de desempenho e de carcaça no cromossomo 5 de populações recíprocas da galinha doméstica

Os objetivos foram definidos com base no cromossomo 5: 1) caracterizar genotipicamente as populações CTCT e TCTC, 2) construir o mapa consenso e 3) mapear simultaneamente QTLs associados às características de desempenho e carcaça. Foram obtidos dados fenotípicos para vinte e quatro características de desempenho e carcaça em 906 animais F_2 (356 CTCT e 550 TCTC) oriundos de cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de postura (CC) e outra de corte (TT). As quatro famílias CTCT e as seis famílias TCTC, que apresentaram maior grau de informatividade, tiveram seus F_2 genotipados para 11 e sete marcadores microssatélites, respectivamente. A caracterização das gerações parentais, F_1 e F_2 foi realizada através da estimação dos parâmetros genotípicos conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidades observada (Het_{obs}) e esperada (Het_{esp}) e número de alelos por loco (A) empregando o programa Cervus 3.0. Os cruzamentos recíprocos entre as duas linhagens (PIC = 0,07-0,78; Het_{obs} = 0,07-0,79; A = 2,0-7,0) possibilitaram um incremento no nível de informatividade dos locos tanto nas gerações F_1 (PIC = 0,43-0,76; Het_{obs} = 0,52-1,00; A = 3,0-6,0) quanto nas F_2 (PIC = 0,44-0,71; Het_{obs} = 0,48-1,00; A = 3,0-6,0). Portanto, as populações CTCT e TCTC são apropriadas para a construção do mapa de ligação e mapeamento de QTLs. Mapas de ligação para cada população e o consenso (CTCT/TCTC) foram obtidos através da estimação das ordens e distâncias entre os locos pelo programa CRI-MAP. Os mapas apresentaram (intervalo médio entre marcadores, em cM) 148,0 cM (24,6) em TCTC, 174,7 cM (17,4) em CTCT e 163,8 cM (16,3) no consenso. Os mapas CTCT e o consenso foram mais semelhantes devido ao maior número de locos avaliados na região alvo e não foram constatadas inversões. O mapeamento simultâneo de QTLs empregou o mapeamento por intervalo combinado à modelagem fenotípica através de modelo misto (efeito de incubação aleatório) e as análises foram implementadas pelos programas SAS, QTL Express e R. Foram mapeados 12 QTLs (11 sugestivos e 1 significativo), dos quais seis ainda não foram descritos (peso dos pés, asas, fígado, peso vivo 42 dias, eficiência alimentar 35-41 dias e colesterol). Foi constatado efeito da interação QTL x população para o peso da gordura abdominal, cujos alelos para incremento dessa característica tiveram origem em fêmeas da linhagem de corte da população CTCT. Quatro possíveis genes candidatos (*FGF4*, *FGF19*, *ALX4* e *FMN1*) foram selecionados através do mapeamento de QTLs. Futuramente, polimorfismos associados a estes genes poderão ser identificados e validados em populações comerciais. Dessa forma, a seleção assistida por marcadores em associação com a seleção fenotípica em programas de melhoramento genético poderá ser efetivamente implementada na galinha doméstica.

Palavras-chave: Avicultura; Gene candidato; Marcadores Microssatélites; Mapeamento por Intervalo; QTL

ABSTRACT

Joint mapping of QTL for performance and carcass traits on chromosome 5 of chicken reciprocal populations

The aims were defined based on the chromosome 5: 1) to describe genotypically CTCT and TCTC populations, 2) to construct consensus linkage map and 3) to map jointly QTL associated with performance and carcass traits. Phenotypic data were obtained for twenty-four performance and carcass traits from 906 F₂ animals (356 CTCT and 550 TCTC) generated from reciprocal crosses between a layer line (CC) and a broiler line (TT). The four families CTCT and the six families TCTC, which showed the highest degree of informativeness, had their F₂ offsprings genotyped using 11 and seven microsatellite markers, respectively. Parental, F₁ and F₂ generations were genotypically characterized by estimation of the genotypic parameters polymorphic information content (PIC), observed heterozygosity (Het_{obs}) and expected heterozygosity (Het_{esp}) and number of alleles per locus (A) using Cervus 3.0 software. Reciprocal crosses between two lines (PIC = 0.07 to 0.78; Het_{obs} = 0.07 to 0.79, A = 2.0 to 7.0) increased the level of informativeness of the loci in both generations F₁ (PIC = 0.43 to 0.76; Het_{obs} = 0.52 to 1.00, A = 3.0 to 6.0) and F₂ (PIC = 0.44 to 0.71; Het_{obs} = 0.48 to 1.00, A = 3.0 to 6.0). Therefore, CTCT and TCTC populations are suitable for constructing the linkage map and QTL mapping. Linkage maps for each population and the consensus (CTCT / TCTC) were obtained by estimation of orders and distances between loci using CRI-MAP software. The maps presented (average interval between markers in cM) 148.0 cM (24.6) in TCTC, 174.7 cM (17.4) in CTCT and 163.8 cM (16.3) in consensus. CTCT and consensus maps were more similar due to high number of loci evaluated in the target region. No inversion was detected. Joint mapping of QTL was accomplished using interval mapping combined with phenotypic modeling via mixed model (random effect of hatch) and analyses were implemented in SAS, QTL Express and R softwares. Twelve QTL were mapped (11 suggestive and one significant). Out of these, six were not previously described (weights of legs, wings and liver, body weight at 42 days, feed efficiency 35-41 days and cholesterol). QTL x population interaction was evidenced for abdominal fat weight, indicating that the alleles that increased this trait came from the female broiler line of the population CTCT. Four putative candidate genes (*FGF4*, *FGF19*, *ALX4* and *FMN1*) were selected by QTL mapping. In future, polymorphisms associated with these genes can be identified and validated in commercial populations. Thus, marker-assisted selection in combination with phenotypic selection in breeding programs will be effectively implemented in poultry.

Keywords: Poultry; Gene candidate; Microsatellite markers, Interval mapping, QTL

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Esquema simplificado do delineamento das duas populações F_2 , oriundas de cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de postura (CC) e uma linhagem de corte (TT), desenvolvidas para mapear QTLs associados ao desempenho e à carcaça (ROSÁRIO et al., 2009).....44
- Figura 2 - Médias + erros-padrão para conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (Het_{obs}), heterozigosidade esperada (Het_{esp}), em percentagens (escala da esquerda) e número de alelos, para todos os animais das linhagens CC e TT e seus cruzamentos recíprocos (F_1 CT e F_1 TC)58
- Figura 3 - Médias + erros-padrão para conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (Het_{obs}), heterozigosidade esperada (Het_{esp}), em porcentagens (escala da esquerda) e número de alelos, para os animais selecionados que geraram as quatro famílias F_2 CTCT para os 11 locos....62
- Figura 4 - Médias + erros-padrão para conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (Het_{obs}), heterozigosidade esperada (Het_{esp}), em porcentagens (escala da esquerda) e número de alelos, para os animais selecionados que geraram as seis famílias F_2 TCTC para os sete locos.....63
- Figura 5 - Representação dos mapas das populações TCTC (esquerda), consenso (centro) e CTCT (direita), em centiMorgans (cM).....68
- Figura 6 - Representação dos mapas Consenso-2005 (esquerda) e consenso (centro) em centiMorgans (cM), e posição no genoma (direita) em mega pares de bases (Mpb)70
- Figura 7 - Mapeamento de QTLs na população CTCT no cromossomo 5. O eixo X corresponde à posição no genoma (cM) dos marcadores microssatélites, representados pelos triângulos (\blacktriangle), sendo a posição 0 igual a 32 cM; eixo Y corresponde ao LOD score com níveis sugestivos ($1,5 < LOD < 3,0$) e significativo ($LOD \geq 3,0$) no genoma79
- Figura 8 - Mapeamento de QTLs na população TCTC no cromossomo 5. O eixo X corresponde à posição no genoma (cM) dos marcadores microssatélites, representados pelos triângulos (\blacktriangle), sendo a posição 0 igual a 32 cM; eixo Y corresponde ao LOD score com níveis sugestivos ($1,5 < LOD < 3,0$) e significativo ($LOD \geq 3,0$) no genoma80
- Figura 9 - Mapeamento simultâneo de QTLs no cromossomo 5. O eixo X corresponde à posição no genoma (cM) dos marcadores microssatélites, representados

pelos triângulos (▲), sendo a posição 0 igual a 32 cM; eixo Y corresponde ao LOD score com níveis sugestivos ($1,5 < LOD < 3,0$) e significativo ($LOD \geq 3,0$) no genoma..... 81

Figura 10 - Rotas de interação entre produtos dos genes candidatos. Linhas cheias e tracejadas representam interação direta e indireta, respectivamente. (A) sistema imune, desenvolvimento e manutenção celular, (B) ao metabolismo de carboidratos e de drogas e (C) organização, morfologia e manutenção celular 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos <i>primers</i> fluorescentes utilizados.....	47
Tabela 2 - Conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada e esperada e número de alelos por marcador nas gerações parental e F ₁ s ...	60
Tabela 3 – Descrição dos marcadores microssatélites do cromossomo 5 da galinha nas duas populações em estudo.....	67
Tabela 4 - Descrição fenotípica das características estudadas na população CTCT.....	72
Tabela 5 - Descrição fenotípica das características estudadas na população TCTC.....	73
Tabela 6 - QTLs mapeados no cromossomo 5 na população CTCT da galinha doméstica.....	74
Tabela 7 - QTLs mapeados no cromossomo 5 na população TCTC da galinha doméstica.....	76
Tabela 8 - QTLs mapeados simultaneamente no cromossomo 5 da galinha doméstica	77
Tabela 9 – Regiões contendo os QTLs mapeados simultaneamente utilizadas na busca por possíveis genes candidatos	84
Tabela 10 - Rotas de interação obtidas pelos genes contidos nas regiões dos QTLs mapeados simultaneamente	85

1 INTRODUÇÃO

A carne de frango, por apresentar excelente valor nutricional (2% de gordura, 24% de proteína e 112 kcal.100 gramas⁻¹) e competitividade econômica (preço por quilo no varejo ao redor de R\$ 3,00 - CEPEA, 2009) quando comparada a de outras espécies animais, como bovinos (7% de gordura, 20% de proteína e 157 kcal.100 gramas⁻¹) e suínos (25% de gordura, 23% de proteína e 319 kcal.100 gramas⁻¹), tem conquistado significativos incrementos em sua produção (FDA, 2009). O Brasil tem se destacado no cenário mundial avícola desde 2004, quando assumiu a primeira posição no *ranking* de exportações, tornando-se um exemplo de competitividade no mercado mundial devido à alta tecnologia e produtividade, ao baixo custo de produção e ao sistema de produção baseado na integração empresa-produtor. Em 2009, a produção de carne frango atingiu cerca de 11 mil de toneladas a um custo médio de R\$ 1,72 por quilo de frango (FNP, 2010). A carne de frango é a segunda mais consumida no mundo, depois da carne suína, e o Brasil apresenta um dos maiores índices de consumo médio mundial por habitante que se elevou de 13,0 para 39,0 kg, entre 1989 e 2009, destinando cerca de 70% da produção nacional ao consumo interno. Esse é o terceiro maior volume de consumo *per capita*, sendo superado somente pelos Estados Unidos (44,5 kg.(habitante.ano)⁻¹) e da Venezuela (39,5 kg.(habitante.ano)⁻¹) (FNP, 2010).

O aprimoramento nos índices produtivos da avicultura tem sido alcançado graças aos avanços nas áreas da genética, nutrição, ambiência, manejo, equipamentos e instalações (HUNTON, 1990). Os trabalhos de Havenstein et al. (2003a, b) ratificaram a 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 Rando bred Control*), alimentadas com dietas industriais representativas dos anos de 1957 e 2001 sobre o desempenho e carcaça. Concluíram que a seleção genética foi responsável por 85 a 90% dos ganhos e a nutrição correspondeu de 10 a 15% das mudanças ocorridas nestes 44 anos para as duas linhagens avaliadas.

Dentre os animais domésticos, a galinha é um modelo interessante para conduzir experimentos relacionados ao mapeamento de QTL quando comparada, por exemplo, aos bovinos e suínos devido ao curto intervalo de geração, da possibilidade de se obter um grande número de famílias de meio-irmãos e de irmãos-completos (CROOIJMANS

et al., 1996), além da facilidade de obtenção do DNA das células sanguíneas vermelhas que são nucleadas.

A partir da década de 1990, esforços internacionais foram iniciados a fim de construir mapas de ligação e mapear QTLs, seguindo os exemplos de outras espécies como humanos e camundongos. Na galinha, a partir da integração de três mapas de ligação oriundos das populações referência de *Compton* (BUMSTEAD; PALYGA, 1992), *East Lansing* (LEVIN et al., 1994) e *Wageningen* (GROENEN et al., 1998) foi desenvolvido o Mapa Consenso da Galinha (GROENEN et al., 2000).

De acordo com a base de dados *Chicken Quantitative Trait Loci database - ChickenQTLdb* (disponível em: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>> acessado em setembro de 2010), especificamente no cromossomo 5, que perfaz 5% de todo o genoma da galinha (SCHMID et al., 2005), já foram mapeados 177 QTLs associados, por exemplo, ao peso corporal (SEWALEN et al., 2002; KERJE et al., 2003; JACOBSSON et al., 2005; McELROY et al., 2006; ZHOU et al., 2006a; ROWE et al., 2009) e à gordura abdominal (IKEOBI et al., 2002; LAGARRIGUE et al., 2006; McELROY et al., 2006; ZHOU et al., 2006b; LE MIGNON et al., 2009; ANKRA-BADU et al., 2010), peso do peito (LI et al., 2003; ATZMON et al., 2008; LE MIGNON et al., 2009; NADAF et al., 2009), dentre outros.

Estes QTLs têm possibilitado uma melhor compreensão da arquitetura genética das características de interesse econômico para a avicultura, pois têm caracterizado regiões no genoma da galinha que controlam tais características, definindo as posições, efeitos (aditividade ou dominância) e a porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL (ROSÁRIO, 2007).

No Brasil, em 1999, a Embrapa Suínos e Aves em conjunto com a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) iniciaram estudos sobre o genoma da galinha, cujo objetivo principal tem sido mapear QTLs para características de desempenho e carcaça. Para isso, foram desenvolvidas duas populações F₂ (CTCT e TCTC) específicas a partir do cruzamento recíproco de linhagens fenotipicamente divergentes de corte (TT) e postura (CC). Destaca-se também que estas duas linhagens foram desenvolvidas em condições brasileiras de clima, manejo, sanidade e nutrição. Assim, diversos trabalhos têm sido conduzidos com a população TCTC (NONES, et al.,

2005, 2006; CAMPOS et al., 2009a, b; AMBO et al. 2007, 2009; BOSCHIERO et al. 2009; BARON et al. 2010) e alguns com a população CTCT (ROSÁRIO, 2007; ROSÁRIO et al., 2010).

Até o presente, os estudos de mapeamento de QTLs no Projeto Brasileiro do Genoma da Galinha foram desenvolvidos separadamente para as populações TCTC e CTCT. Entretanto, o mapa consenso para os cromossomos 1, 3 e 4, obtido a partir dos genótipos destas duas populações, foi publicado por Rosário et al. (2010). Este mapa foi o primeiro passo em direção ao mapeamento simultâneo de QTLs, possibilitando o estudo da interação QTL x população. Certamente, esta iniciativa brasileira é inédita para a ciência avícola. Neste contexto, o cromossomo 5 foi escolhido para desenvolver este estudo, que apresenta os seguintes objetivos: 1) caracterizar genotipicamente as populações CTCT e TCTC, 2) construir o mapa de ligação consenso e 3) mapear simultaneamente QTLs associados às características de desempenho e carcaça nas populações desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves utilizando marcadores do tipo microssatélite.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Galinha doméstica

A galinha doméstica (*Gallus gallus domesticus*) é uma das aves que tem acompanhado os seres humanos desde tempos remotos. Alguns estudos indicam que as várias linhagens e raças desta espécie são oriundas de um ancestral selvagem, o *Red Jungle Fowl*, do sudeste asiático (FUMIHITO et al., 1994; YAMADA, 1998). Por outro lado, Liu et al. (2006) apoiam a teoria de múltiplas origens da galinha doméstica entre o sul e sudeste asiático, envolvendo o sul e sudoeste da China e/ou arredores (isto é, Vietnã, Burma e Tailândia). Descobertas da arqueologia evidenciaram que a domesticação dessa espécie ocorreu por volta de 2.000 anos a.C. e, segundo as teorias de Darwin, teria acontecido na Índia, especificamente no Vale Hindu (COELHO; SAVINO; ROSÁRIO, 2008). Há evidências de que as galinhas já eram conhecidas na Suméria há 2.000 anos a.C. e a palavra galo no idioma sumério significava “rei das aves” (SALES, 2006).

Atualmente, a hipótese sobre múltiplas origens tem sido mais aceita. Quatro espécies de galos selvagens tenham contribuído para a composição genética da galinha doméstica e que essas espécies não são uma simples variação de apenas uma espécie, a *Red Jungle Fowl*, mas sim espécies distintas, entre as quais o cruzamento é quase impossível. São elas: Java (*Gallus varius* – Green Jungle Fowl), Ceilão (*Gallus lafayettii* – Ceylon Jungle Fowl), Bankiva (*Gallus gallus* – Red Jungle Fowl), distribuídas pela Índia oriental, Malásia, Camboja, Sumatra e Filipinas, e a de Sonnerat (*Gallus sonneratii* – Grey Jungle Fowl), na Índia ocidental e meridional (COELHO; SAVINO; ROSÁRIO, 2008).

Estudos de Eriksson et al. (2008) sugeriram que a galinha doméstica é um híbrido e pode ter se originado do cruzamento entre *Red Jungle Fowl* e *Grey Jungle Fowl*. Estes autores analisaram o gene responsável pela cor amarela da pele das pernas das aves (gene *yellow skin*) e verificaram que os alelos que conferem esta característica não têm como origem a *Red Jungle Fowl*, mas sim a *Grey Jungle Fowl*, espécie proveniente da Índia.

A produção e criação da galinha é muito difundida pelo mundo que a torna o animal de produção mais importante, independente da cultura ou religião (AL-NASSER

et al., 2007). Isso se deve ao rápido crescimento do animal, pequeno porte e valor nutricional dos produtos avícolas. Segundo Jorge et al. (2007), a carne de frango é uma das mais importantes fontes de proteína para o consumo humano, sem restrições dietéticas devido a questões religiosas, como é o caso da carne suína (não consumida pelos judeus e muçulmanos) e da carne bovina (não consumida pelos hindus).

A genética avícola tem uma longa história de realização. Com a domesticação da galinha no período Neolítico, o homem passou a realizar a seleção artificial a fim de obter materiais que produzissem mais carne e mais ovos. Assim, muito antes de Mendel apresentar seu trabalho à Sociedade de História Natural de Brunn, no qual enunciava as suas leis sobre a hereditariedade, deduzidas a partir de suas experiências com ervilhas, em 1865, a galinha já era utilizada no melhoramento genético na prática (SIEGEL et al., 2006).

Além de sua importância econômica, a galinha doméstica também tem sido uma espécie modelo para o desenvolvimento de estudos nas áreas da genômica, transcriptômica e proteômica animal, o que certamente tem contribuído como ferramenta complementar aos estudos já obtidos através do melhoramento genético, que é baseado exclusivamente no fenótipo (BURT, 2002; DEKKERS; HOSPITAL, 2002; DOERGE, 2002; ANDERSSON, 2004; GEORGES, 2007; JORGE et al., 2007). Segundo Burt (2004), nenhuma outra espécie animal tem sido selecionada tão intensamente para a produção como a galinha.

Siegel et al. (2006) relatou os méritos que a galinha apresenta como modelo para o entendimento biológico destacando-se 1) a diversidade genética, 2) a variedade fenotípica nas raças ou nas linhagens selecionadas para diferentes finalidades gerada ao longo de muitos anos de seleção, 3) o tamanho da população (a população mundial está em cerca de 11 bilhões e, considerando uma taxa média de mutação por nucleotídeo de 1×10^{-9} , isso implica em aproximadamente 20×10^9 novas mutações em cada geração da população mundial; a maioria destas mutações não será transmitida para a próxima geração, porém algumas irão permanecer através da seleção e contribuirão para a diversidade genética), 4) a facilidade de reprodução (obtenção de várias gerações, possibilitando um maior poder estatístico, principalmente para estudos genéticos de características complexas, 5) as gerações são obtidas em

pequenos intervalos de tempo (cerca de seis meses) em relação a outros animais de produção, como por exemplo, os bovinos), 6) a alta taxa de recombinação estimada em $2,8 \text{ cM.Mb}^{-1}$ para os macrocromossomos e $6,4 \text{ cM.Mb}^{-1}$ para os microcromossomos; estes são valores elevados se comparada aos dos mamíferos, que é de 1 cM.Mb^{-1} e $0,5 \text{ cM.Mb}^{-1}$ para humanos e camundongos, respectivamente e 7) a galinha demonstra ser o principal modelo para estudos genômicos comparativos entre as diversas espécies de aves. Uma análise genômica comparativa demonstrou que o número de genes, cerca de 60%, da galinha é similar ao dos mamíferos (revisado por ELLEGREN, 2005).

A galinha foi a primeira espécie animal em que a herança mendeliana foi demonstrada (SIEGEL et al., 2006). Um século depois, esta espécie foi a primeira entre os animais de produção a ter seu genoma completamente sequenciado (HILLIER et al., 2004), totalizando 1,25 giga pares de bases. Este genoma é constituído por 38 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais, Z e W, sendo a fêmea heterogamética (ZW) e o macho homogamético (ZZ). O genoma é bimodal, podendo ser dividido em oito macrocromossomos e 30 microcromossomos (CHENG, 1997).

Estudos demonstraram alto nível de sintonia entre o genoma de mamíferos e aves, como por exemplo, no cromossomo 1 da galinha os genes *IGF1*, *GAPD*, *CYP19*, *GH1* e *PGR* correspondem aos genes nos cromossomos humanos 11, 12, 15 e 17 (KLEIN et al., 1996) e alguns genes do cromossomo 7 da galinha são conservados no cromossomo 2 de humanos (HU, et al., 1995; GIRARD-SANTOSUOSSO et al., 1997). Isso torna a galinha um modelo de evolução intermediária entre os humanos e mamíferos, permitindo que a informação sobre os genes humanos possa ser empregada na localização de genes também na galinha (FILLON, 1998; GROENEN et al., 2000; McPHERSON et al., 2002).

Portanto, os experimentos que têm empregado a abordagem direta do genoma da galinha, tais como a obtenção de marcadores moleculares, construção de mapas de ligação, mapeamento de QTLs (*Quantitative Trait Loci*), estudos envolvendo expressão gênica e de proteínas, contribuem para uma melhor compreensão da arquitetura genética de características quantitativas (MACKAY, 2001) de interesse econômico para a avicultura.

2.2 Caracterização genotípica

A galinha se enquadra nas populações parcialmente endogâmicas (*outbred*) como consequência do sistema de reprodução sexuado, no qual há troca de alelos entre o macho e a fêmea. Dessa forma, nem todos os locos encontram-se em homozigose mesmo sob forte seleção a favor da endogamia. O que se verifica é que parte dos locos encontra-se em homozigose e outra parte em heterozigose. Este cenário torna ainda mais árduo o mapeamento de QTLs neste tipo de população.

Existem várias desvantagens no uso de populações *outbred* sob seleção a longo prazo para o mapeamento QTL (VAN DER BEEK et al, 1995;. LYNCH; WALSH, 1998). Primeiro, locos que afetam características de seleção podem apresentar frequências extremas ou estarem fixados dentro das populações, o que reduz o conteúdo de informação dos marcadores e QTLs. A seleção também diminui as diferenças entre fenótipos e genótipos, pois os alelos com efeitos indesejáveis provavelmente são reduzidos ou eliminados durante a seleção. Em segundo lugar, as fases de ligação entre QTL e marcadores de DNA podem variar entre as famílias e, portanto, a associação entre marcadores e QTL deve ser analisada separadamente para cada família. Terceiro, a análise estatística é mais complexa, pois até quatro alelos por loco podem segregar para cada QTL dentro de uma família. E por fim, os efeitos dos QTLs em populações *outbred* são estimados a partir das variações genéticas (ZHU et al., 2001). Assim, o poder para a detecção de QTLs é reduzido quando comparado às populações endogâmicas (*inbred*) (LYNCH; WALSH, 1998).

Projetos experimentais bem desenvolvidos podem superar estas desvantagens. Os fatores relacionados à população experimental, incluindo o tipo e o tamanho da amostra, podem ser artificialmente manipulados para aumentar o poder do mapeamento de QTLs, por exemplo, os experimentos com uma amostra maior podem detectar locos com menores efeitos genéticos do que aqueles com um menor tamanho de amostra (LANDER; BOTSTEIN, 1989).

Teoricamente, uma grande família de irmãos completos totalmente informativa, com todos os alelos parentais distinguíveis em todos os locos, é suficiente para o mapeamento de QTL (ZHU, et al., 2001). Entretanto, esta família provavelmente não exista em nenhuma população *outbred*. Um número maior de famílias aumentaria a

chance de ter pelo menos um irmão informativo em cada loco (LYNCH; WALSH, 1998). Infelizmente, na prática, o número de amostras que podem ser obtidas em um experimento é geralmente limitada. Van der Beek et al. (1995) relataram que o aumento do tamanho das famílias gera mais poder no mapeamento do que o aumento no número de famílias.

Alguns parâmetros genotípicos podem ser utilizados com o intuito de avaliar o grau de informatividade das famílias e dos marcadores de DNA. Baseado no PIC, ou seja, na probabilidade de um parental ser heterozigoto em um dado loco e o outro parental ter um genótipo diferente no mesmo loco (BOTSTEIN et al., 1980) e na heterozigosidade dos parentais, famílias e marcadores altamente informativos podem ser selecionados para gerarem progênes altamente informativas (HILLEL, 1997; ZHU et al., 2001). Conseqüentemente, os custos da etapa de genotipagem são reduzidos e um maior poder para a detecção de QTLs pode ser obtido.

Além disso, a informação dos genótipos dos parentais e de suas progênes é necessária para construir mapas de ligação nas famílias segregantes. Os mapas de ligação e as fases de ligação são componentes essenciais para o uso apropriado e eficiente dos métodos de mapeamento de QTLs, como, por exemplo, o mapeamento por intervalo.

A informação oriunda diretamente do DNA, a partir do emprego de marcadores microssatélites, vem sendo utilizada com o objetivo de caracterização genotípica de raças e linhagens de galinhas (KHATIB et al., 1993; CHENG, 1997), incluindo análise de segregação (KHATIB et al., 1994) e estimativa da relação genética de populações de aves nativas (RUYTER-SPIRA et al., 1997; TAKAHASHIM et al., 1998).

Algumas medidas de informatividade do marcador (PIC e heterozigosidade) aumentam em função do número de alelos por loco, considerando-se a mesma frequência alélica. Entretanto, diferenças nas frequências alélicas de oito materiais comerciais foram evidenciadas por Vanhala et al. (1998) como conseqüência da pressão de seleção utilizada nos programas de melhoramento.

Rosário et al. (2009) caracterizaram genotipicamente duas gerações F_1 recíprocas (CT e TC) e suas linhagens parentais (TT e CC) a partir de 34 marcadores microssatélites localizados nos cromossomos 1 (13), 3 (12) e 4 (9). Com base na

amostragem realizada, as duas linhagens exibiram um total de 163 alelos, dos quais 31 (31,1%) e 44 (33,0%) foram oriundos exclusivamente de CC e TT, respectivamente, com frequências alélicas que variaram de 0,03 a 0,82.

Embora a descrição genotípica das populações experimentais possa variar entre as populações, devido ao *background* genético, esta informação pode ajudar na seleção inicial de marcadores e de famílias mais informativas em novos estudos de QTLs (ROSÁRIO, 2007).

2.3 Mapas de ligação

O mapeamento genético teve início após os estudos relacionados ao fenômeno da ligação genética (MORGAN, 1910) e, rapidamente, tornou-se uma ferramenta para os geneticistas, embora a prova definitiva da associação entre mapas de ligação e cromossomos tenha sido elucidada mais tarde, através dos estudos realizados por B. McClintock em cromossomos de milho. Os primeiros mapas genéticos foram construídos com base em marcadores morfológicos e citológicos. Antes mesmo de o material genético ser denominado DNA, foram construídos alguns mapas genéticos de espécies cultivadas (MacARTHUR, 1934) originados a partir de estoques cromossômicos com aberrações (como aneuploidias, translocações, deleções e inversões), principalmente nas culturas do milho, tomate e ervilha (COE et al., 1988; RICK; YODER, 1988).

Com o advento dos marcadores de DNA, por volta da década de 1980, o mapeamento genético tornou-se, efetivamente, ilimitado a todas as espécies (BOTSTEIN et al., 1980). Mapas genéticos que levaram décadas para serem desenvolvidos, em virtude da restrita disponibilidade de marcadores morfológicos e isoenzimáticos, foram amplamente saturados com o uso dos marcadores moleculares baseados na sequência do DNA.

O mapa de ligação de um animal ou planta pode ser definido como um modelo abstrato do arranjo linear de um grupo de genes e marcadores que permite também estudar a arquitetura genética de características quantitativas, ou seja, mapear e medir a magnitude do efeito dos principais fatores genéticos envolvidos no controle destas características (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; LIU, 1998).

A ampla disponibilidade de marcadores neutros, altamente polimórficos, cuja herança não sofre influência ambiental, aliada a procedimentos estatísticos complexos, tem permitido a construção de mapas de ligação para a maioria das espécies de plantas e animais.

Premissas importantes devem ser consideradas na construção de um mapa genético. A primeira refere-se ao desenvolvimento da população que deve atender a duas condições básicas: 1) o máximo de polimorfismo entre os genitores e 2) que sejam produzidas gerações em que os locos estejam em desequilíbrio de ligação (PATERSON et al., 1991; TANKSLEY, 1993). A segunda destaca a seleção do tipo de marcador. Coelho (2000) ressalta a importância de se considerar o conteúdo informativo dos marcadores de natureza codominante (RFLPs e microssatélites/SSRs) em relação aos marcadores dominantes (RAPDs e AFLPs), além de aspectos como custo, tempo necessário para a realização das avaliações e dificuldades práticas inerentes à execução de cada técnica. O número de marcadores necessário para construir um mapa genético depende do tamanho do genoma, do número de cromossomos e da frequência de recombinação genética (BROGIN, 2005). Atualmente, os marcadores do tipo SNPs vêm sendo empregados na busca por mapas de ligação de alta resolução, devido ao fato de serem encontrados em maior número ao longo dos genomas e serem facilmente detectados (NIE et al., 2003; CAIXETA et al., 2006). Os marcadores SNPs podem ser utilizados como alternativa aos microssatélites ou em complementação (JALVING et al., 2004). A terceira premissa está relacionada com a importância da verificação da distorção da segregação mendeliana que pode ser causada, por exemplo, pelo efeito de amostragem ou viabilidade diferencial de gametas. Segundo Liu (1998), os locos que apresentam distorção mendeliana afetam os testes estatísticos usados para detectar a ligação podendo gerar falsos positivos. O cálculo da frequência de recombinação entre pares de marcadores e funções de mapeamento é a quarta premissa que deve ser avaliada. Diversas abordagens estatísticas podem ser usadas para estimar a frequência de recombinantes, entre elas, o método dos momentos, o método dos quadrados mínimos e o da máxima verossimilhança. As funções mais utilizadas no mapeamento genético são as funções de Haldane e Kosambi. A primeira supõe ausência de interferência, admitindo que as recombinações genéticas ocorram

ao acaso e são independentes; já a segunda função computa uma interferência moderada, ou seja, uma recombinação genética afeta a ocorrência de outras em regiões adjacentes, considerando a ocorrência de recombinações duplas. (LANZA et al., 2000; SCHUSTER; CRUZ, 2004). Para frequências de recombinação (inferior a 20%), ambas as funções de mapeamento apresentam valores similares aos da frequência de recombinação. No entanto, à medida que a distância entre dois locos aumenta, ou seja, com o aumento da frequência de recombinação, mais discrepantes tornam-se os valores obtidos pelas funções de Haldane e Kosambi entre si e em relação à frequência de recombinação (SCHUSTER; CRUZ, 2004). A quinta premissa estabelece os grupos de ligação, que do ponto de vista biológico, são definidos como grupos de genes (marcadores), cujos locos estão localizados no mesmo cromossomo. Estatisticamente, grupo de ligação pode ser definido como um conjunto de locos herdados juntos (LIU, 1998). A sexta e última premissa determina a ordem dos marcadores nos grupos de ligação. Uma vez conhecidas as frações de recombinação entre cada par de marcadores e já discriminados os grupos de ligação, deve-se determinar a ordem para os marcadores dentro de cada grupo. Weir (1996) e Ferreira e Grattapaglia (1998) destacaram duas limitações na determinação da ordem correta de um conjunto de genes ou marcadores: 1) como somente as estimativas dos coeficientes de recombinação destes locos são conhecidas, a melhor ordem por este critério pode não ser a mais provável, simplesmente por efeito de amostragem (amostra muito pequena), 2) quando a análise envolve um grande número de locos, o número de ordens possíveis pode tornar-se impraticável.

Na galinha, três populações referência foram desenvolvidas para realizar estudos relacionados à obtenção de marcadores microssatélites, construção de mapas de ligação e mapeamento de QTLs. A população *Compton* (BUMSTEAD; PALYGA, 1992) foi constituída por 56 animais derivados de um retrocruzamento entre duas linhagens *White Leghorn* endogâmicas que diferiam quanto à resistência à salmonela. A população de *East Lansing* (LEVIN et al., 1994) foi composta por 52 animais oriundos do retrocruzamento entre uma linhagem de galinha selvagem parcialmente endogâmica de *Jungle Fowl* com uma linhagem de *White Leghorn* altamente endogâmica, que diferiam quanto à resistência a doença de Marek. E a população de *Wageningen*

(GROENEN et al., 1998) compota por 456 animais F_2 derivados do cruzamento entre duas linhagens de fêmea de corte provenientes da raça *White Plymouth Rock*. Groenen et al. (2000) integraram os três mapas de ligação destas populações, definindo o Mapa Consenso da Galinha com 1.889 locos em 51 grupos de ligação que cobriram 3.800 cM. Schmid et al. (2005) atualizaram este mapa incluindo 372 locos, totalizando 4.200 cM distribuídos por 53 grupos de ligação. Groenen et al. (2009) utilizando 9.268 marcadores, sendo 669 marcadores do Mapa Consenso da Galinha (SCHMID et al., 2005) e 8.599 SNPs, produziram um mapa com melhor resolução e comprimento de 3.228 cM.

No Brasil, duas populações experimentais F_2 de galinha foram desenvolvidas, seguindo o exemplo internacional, a partir de cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de corte (TT) e outra de postura (CC) em condições brasileiras de clima e manejo. Este projeto intitulado como Projeto Brasileiro do Genoma da Galinha foi uma iniciativa entre Embrapa Suínos e Aves e ESALQ/USP. Assim, originaram-se as populações designadas TCTC e CTCT para mapear QTLs associados ao desempenho e à carcaça. Para a população TCTC, mapas de ligação já foram construídos nos cromossomos 1 (NONES, 2004; NONES et al., 2006), 2 e 4 (BARON, 2004), 3 e 5 (RUY, 2004), 11 e 13 (BOSCHIERO, 2006), 19, 23, 24, 26, 27 e 28 (AMBO, 2007), 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17, e 18 (CAMPOS, 2007). Entretanto, para a população CTCT apenas para os cromossomos 1, 3 e 4 foram construídos mapas de ligação (ROSÁRIO et al., 2010). Este autor ainda publicou o mapa consenso para os cromossomos 1, 3 e 4 obtido a partir dos genótipos destas duas populações.

2.4 Mapeamento de QTL

QTLs (*quantitative trait loci*) são definidos como associações estatísticas significativas entre os valores genotípicos e a variabilidade fenotípica da progênie segregante (WILLIAN, 1998). A maior parte da variação entre indivíduos é quantitativa, seja na morfologia, comportamento, fisiologia, suscetibilidade a doenças ou características reprodutivas. Essa variação pode ser atribuída à segregação de múltiplos locos com pequenos efeitos individuais, cuja expressão é condicionada ao meio ambiente (FALCONER; MACKAY, 1996). Portanto, mapear um QTL significa

identificar sua posição no genoma e estimar seus efeitos genéticos, tais como: o efeito aditivo e efeito de dominância.

As ideias iniciais sobre mapeamento de QTLs surgiram com a publicação do trabalho de Sax (1923), que permitiu a compreensão da herança do peso de sementes de feijão. Este autor estudou a associação entre peso das sementes (característica quantitativa) e a coloração delas (característica qualitativa) e concluiu que sementes brancas apresentavam menor peso de 100 sementes em relação às sementes vermelhas. Já naquela época, um marcador morfológico (coloração das sementes) foi utilizado para compreender a segregação e a herança de uma característica quantitativa (peso das sementes).

No entanto, os fundamentos da teoria do mapeamento de QTLs foram propagados a partir do trabalho de Thoday (1961), que sugeriu que se um ou mais genes responsáveis por uma característica estiverem ligados a um marcador, os efeitos destes genes podem ser indiretamente estudados com base nos genótipos dos marcadores.

Nos últimos quinze anos, o mapeamento de QTLs tornou-se uma estratégia para identificar regiões genômicas associadas às características quantitativas. Este fato foi alavancado pela descoberta de marcadores de DNA polimórficos em várias espécies e pelo desenvolvimento de métodos estatísticos apropriados (LANDER; BOTSTEIN, 1989; ZENG, 1993, 1994; HALEY; KNOTT, 1994).

A eficiência na detecção de QTL depende do número de QTLs, magnitude do seu efeito, herdabilidade da característica, tipo e tamanho da população segregante, interações entre os genes, tamanho do genoma, frequência de recombinação entre o QTL e o marcador e a saturação do mapa (TANKSLEY, 1993). Quanto maior o efeito, o tamanho da população e a herdabilidade e mais próximo o marcador do QTL mais fácil será esta detecção (FERREITA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O tamanho relativamente pequeno de amostras utilizadas na maioria dos experimentos, segundo Weller (2001), é o principal problema no mapeamento de QTLs. Em experimentos empregando menos de 300 animais haverá dificuldade para estimação dos efeitos do QTL. Na maioria dos casos em que o QTL não foi mapeado, o

poder de detecção foi muito pequeno para mapear um QTL com magnitude razoável segregando.

A identificação de QTLs em populações experimentais se torna mais complicada caso duas premissas iniciais não sejam atendidas, são elas: utilização de marcadores informativos e a escolha de uma estrutura populacional especialmente delineada em que haja variação genética suficiente para detectar ligação entre um QTL segregando e um marcador genético (DEEB; LAMONT, 2002).

Para gerar esta variação genética em uma população, o uso de delineamento experimental envolvendo o cruzamento de linhagens que diferem em relação às frequências alélicas nos locos dos marcadores e do QTL, ou seja, escolha de linhagens parentais divergentes genotípica ou fenotipicamente é o mais indicado. Assim, as associações existentes entre marcadores genéticos e a característica podem ser estudadas comparando-se o desempenho fenotípico de indivíduos F_2 ou daqueles obtidos por retrocruzamento (VAN DER BEEK et al., 1995; BOVENHUIS et al., 1997; LIU, 1998; YONASH et al., 2001).

Entretanto, utilizar uma geração F_2 , obtida do intercruzamento da F_1 é mais eficiente do que usar o retrocruzamento porque, segundo Andreson-Eklund (1998), na análise de ligação, um retrocruzamento só é mais eficiente do que um intercruzamento quando se trata de marcadores dominantes e como o mais usual é a utilização de marcadores de DNA codominantes, como é o caso dos microssatélites, um intercruzamento pode fornecer até duas vezes mais meioses informativas para os locos marcadores do que um retrocruzamento.

2.4.1 Métodos de mapeamento

Vários métodos têm sido propostos para a localização de QTLs, dentre os quais se encontram os modelos lineares (ANOVA e regressão linear), mapeamento por intervalo (LANDER; BOTSTEIN, 1989), mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1993, 1994; JANSEN; STAM, 1994) e o mapeamento de múltiplos intervalos (KAO; ZENG, 1997; KAO et al., 1999).

Os procedimentos mais simples para detecção de QTLs são os modelos lineares que analisam, separadamente, a diferença entre os valores fenotípicos médios para

cada marcador (EDWARDS et al., 1987), não sendo necessária a construção de mapas de ligação. Como limitação, há o fato de quanto maior for a distância entre o QTL e o marcador, menor será a probabilidade de detectá-lo devido à possibilidade de recombinação entre o gene marcador e o QTL. Além disso, a magnitude do QTL, pelo mesmo motivo, é normalmente subestimada. Outro inconveniente é que não é possível determinar a posição do QTL no genoma (LYNCH; WALSH, 1998).

O método de mapeamento por intervalo (IM) foi proposto por Lander e Botstein (1989) e tem sido uma alternativa para estimar o efeito e a posição dos QTLs. O mapeamento por intervalo, estendido para populações parcialmente endogâmicas (*outbred*) (HALEY et al., 1994) através de regressão por quadrados mínimos foi implementado pelo programa QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002). Este programa apresenta vantagens: 1) fácil utilização; 2) disponível através da internet; 3) implementa o teste de permutação para a obtenção dos níveis de significância (CHURCHILL; DOERGE, 1994); 4) implementa a reamostragem pelo método *bootstrap* para a determinação dos intervalos de confiança das distâncias (VISSCHER et al., 1996).

O número de QTLs encontrado é normalmente subestimado no mapeamento empregando o IM, pois dois QTLs muito próximos podem ser detectados como apenas um se eles estiverem em associação (ligação entre alelos favoráveis à característica nos dois locos) ou ainda não serem detectados se os QTLs estiverem ligados em repulsão (ligação entre alelo favorável em um loco e um desfavorável no outro loco), segundo Falconer e Mackay (1996). Outra desvantagem atribuída a este método é que outros QTLs fora do intervalo não são computados nas análises e, conseqüentemente, toda a variação genética devida a esses outros QTLs é residual, o que pode diminuir a precisão das estimativas. Além disso, eventuais QTLs que estejam ligados ao intervalo em questão interferem no processo de estimação, levando, em casos extremos, a declarar a existência de um QTL no intervalo quando na realidade não há nenhum (BEARZOTI, 2000).

A fim de sobrepor essas limitações Jansen e Stam (1994) e Zeng (1993, 1994) propuseram o mapeamento por intervalo composto (CIM), método em que se consideram marcadores fora do intervalo em questão através de um modelo de regressão linear múltipla. Além de proporcionar maior resolução no mapeamento,

permite o uso de dados obtidos em vários ambientes, para avaliar os efeitos da interação QTLs e ambientes.

Outra abordagem é o mapeamento por intervalo múltiplo (MIM), proposto por Kao et al. (1999), que trouxe considerável aprimoramento no mapeamento de QTLs, pois incorpora parâmetros de epistasia ao modelo. Em presença de epistasia, esse método apresenta algumas vantagens potenciais como maior eficiência e precisão na identificação de QTLs, seus efeitos são estimados sem viés e, ao contrário de outros modelos, pode aumentar a eficiência da seleção assistida, considerando os efeitos epistáticos (BEARZOTI, 2000).

Estes métodos (CIM e MIM) são amplamente usados em espécies vegetais (LI et al., 2007a, b, c; JIANG et al., 2008; MONTEROS et al., 2008; SENTHILVEL et al., 2008; LI et al., 2009; MEI et al., 2009; PRASANNA et al., 2009; WEI et al., 2009), mas ainda não foram implementados pelo programa QTL EXPRESS. Dessa forma, tais métodos não vêm sendo empregados rotineiramente para mapeamento de QTLs nas espécies de animais de produção (galinha, bovino, suíno, dentre outros), o que certamente, não tem permitido melhorar a precisão na localização e estimação dos efeitos de QTLs a serem mapeados.

2.4.2 Resultados do mapeamento de QTL

A pesquisa envolvendo genômica da galinha vai além dos trabalhos relacionados ao mapeamento de QTL, como pode ser observado em Burt (2005), Moore et al. (2005) e Smith e Pourquié (2005). Nestas revisões é possível obter uma breve descrição da ampla área de pesquisa molecular em galinhas, que vai desde o mapeamento genético, passando por estudos de expressão gênica, de genômica comparativa, de análise de RNA (transcriptômica), de proteômica, até a genômica funcional (em especial a imunogênica).

Hocking (2005) publicou uma revisão sobre experimentos de mapeamento de QTLs empregando a galinha como modelo experimental e comercial para diversas características. QTLs têm sido mapeados para crescimento (GROENEN et al., 1997; VAN KAAM et al., 1998; 1999a; TATSUDA; FUJINAKA, 2001; LI et al., 2005; PARK et al., 2006; WAHLBERG et al., 2009), conversão alimentar (VAN KAAM et al., 1999a),

características de carcaça (VAN KAAM et al., 1999b; LAGARRIGUE et al., 2006; NONES et al., 2006; NADAF et al., 2007; AMBO et al., 2009), resistência à doença de Marek (VALLEJO et al., 1998; XU et al., 1998; YONASH et al., 1999; LIPKIN et al., 2002; HEIFETZ et al., 2009), teor de gordura na carcaça (IKEOBI et al., 2002; LAGARRIGUE et al., 2006; CAMPOS et al., 2009b) e qualidade de ovo (TUISKULA-HAAVISTO et al., 2002; WARDECKA et al., 2002; HONKATUKIA et al., 2005).

Abasht et al. (2006), compilando resultados de 50 artigos científicos, relataram 697 QTLs mapeados para as características relacionadas ao peso corporal, composição corporal e consumo de ração (383), à produção e qualidade de ovos (83), à resistência a doenças (143), a parâmetros metabólicos (50) e ao comportamento (38). Atualizações podem ser obtidas em *Chicken Quantitative Trait Loci database - ChickenQTLdb* (disponível em: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>> acessado em junho de 2010).

Muitos destes QTLs foram mapeados em populações oriundas de cruzamentos entre linhagens divergentes, seja corte x corte, postura x postura, corte x postura e cruzamentos entre a galinha selvagem *Red Jungle Fowl* e *White Leghorn*. Entretanto, para que as informações destes QTLs sejam utilizadas em programas de seleção assistida por marcadores é necessário validar se esses QTLs estão segregando em populações comerciais. Com este objetivo, De Koning et al. (2003) estudaram uma população comercial de 50 mil aves e confirmaram QTLs para peso vivo e consumo de ração no cromossomo 4. Posteriormente, De Koning et al. (2004) encontraram 53 QTLs significativos, dentre eles QTLs para consumo de ração. Atzmon et al. (2006) observaram 12 QTLs para as características de peso do peito, peso da gordura abdominal, peso vivo aos 49 dias e para peso da carcaça, distribuídos ao longo dos cromossomos 1, 2, 5 e 13. Assim, os resultados de análise de populações comerciais comprovaram que é possível mapear QTLs mesmo depois de muitas gerações de seleção.

Pesquisas nacionais, utilizando populações em esquema F_2 , denominadas de CTCT e TCTC, originadas de cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de postura (CC) e outra de corte (TT), vêm mapeando QTLs para características de desempenho e carcaça. Para a população TCTC, QTLs já foram mapeados para características de

desempenho e de carcaça nos cromossomos 1 (NONES, 2004; NONES et al., 2006), 2 e 4 (BARON, 2004), 3 e 5 (RUY, 2004), 11 e 13 (BOSCHIERO, 2006; BOSCHIERO et al., 2009), 19, 23, 24, 26, 27 e 28 (AMBO, 2007), 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 (CAMPOS, 2007; CAMPOS et al., 2009a). A varredura do genoma com 129 marcadores microssatélites já foi concluída para a população TCTC, em 22 cromossomos, e os resultados foram publicados por Ambo et al. (2009) para características de desempenho, por Campos et al. (2009b) para características de deposição de gordura e para características de carcaça (Baron et al., 2010). Boschiero (2009) realizou o mapeamento fino de uma região no cromossomo 1 da população TCTC. Para a população CTCT os trabalhos iniciais envolveram o estudo dos cromossomos 1, 3 e 4 (ROSÁRIO, 2007).

2.4.3 Mapeamento simultâneo de QTLs

A estratégia de mapeamento simultâneo, a fim de estudar a interação QTL x população, ainda não foi contemplada pela literatura para uma espécie *outbred*. Deste modo, optou-se por discorrer sobre este tópico relacionando-o com os achados da literatura envolvendo o estudo das interações QTL e sexo, QTL e família, QTL e ambiente e QTL x QTL (epistasia). Esta decisão foi tomada devido ao fato de que o efeito de interação pode ser compreendido como um comportamento diferenciado entre o fator QTL e outro fator de interesse, como por exemplo, a população, a família, o ambiente, o sexo, ou, ainda, outro QTL (epistasia).

Nones (2004) evidenciou efeito da interação QTL e família no cromossomo 1 da população TCTC para peso aos 35, 41 e 42 dias, peso da carcaça (sem vísceras, pés e cabeça), gordura abdominal, carcaça residual (peso da carcaça menos o peso do peito, asas e coxas), consumo de ração, comprimento do intestino e coração. Este mesmo autor detectou esta interação provavelmente devido ao tamanho das famílias de F_2 utilizado (em torno de 95 animais), pois segundo Knott et al. (1998) para testar a interação QTL e família necessita-se de famílias de F_2 de tamanho razoável. Por lado, Sewalen et al. (2002) e Ikeobi et al. (2002) não detectaram interação QTL x família, pois utilizaram famílias de F_2 com, em média, 14 animais.

O estudo da interação QTL e sexo permite identificar efeitos específicos dos QTLs entre os sexos. Alguns trabalhos evidenciaram a interação QTL x sexo na galinha: Abasht et al. (2006) mapearam um QTL para gordura abdominal entre os marcadores *MCW0210* e *ADL0233* no GGA5 apenas quando utilizaram um modelo com interação QTL x sexo. Navarro et al. (2005) encontraram um QTL associado à peso do coração no GGA13 com efeito aditivo consideravelmente maior em fêmeas e um QTL para peso da moela no GGA2 com efeito aditivo específico para machos.

Outra interação de utilidade aos programas de melhoramento genético trata da epistasia, modelada como uma interação QTL x QTL. Neste caso é necessário estimar os efeitos de dois ou mais QTLs simultaneamente e observar possíveis interações entre eles. Carlborg et al. (2003) relataram importantes ganhos em poder de teste com o uso do modelo epistático em galinha, embora ressaltarem que são necessárias amostras maiores para explorar o modelo dessa complexidade. Carlborg et al. (2006) demonstraram que o efeito aditivo de um QTL para peso vivo aos 56 dias, no cromossomo 7, dependia do genótipo de outros três QTLs.

Outra interação que vem sendo investigada, principalmente em plantas, é a interação QTL e ambiente. Em ambientes tropicais e subtropicais, a interação QTL x ambiente é evidenciada mais facilmente, pois as culturas são afetadas por fortes variações climáticas como fotoperíodo, temperatura e índice pluviométrico (MUCHOW et al., 1990).

Um dos trabalhos pioneiros que estudou a interação QTL x ambiente foi conduzido por Paterson et al. (1991) em um cruzamento interespecífico de tomate (*Lycopersicon* spp.). Estes autores detectaram QTLs em um dos dois ambientes estudados, sugerindo que análises em ambientes únicos poderiam subestimar o número de QTLs detectados. Os trabalhos de Veldboom e Lee (1996 a,b) demonstraram que 50% dos QTLs para características morfológicas e de produção de grãos foram estáveis em ambientes de estresse (úmido e frio) e não estresse. Ribaut et al. (1997) confirmaram a estabilidade no número e localização dos QTLs para as características associadas à produção do milho tropical, detectados em três ambientes com diferentes regimes de água. Li et al. (2003) atribuíram a pouca estabilidade dos QTLs a

significativa interação QTL x ambiente, além de QTLs principais com efeitos opostos e pronunciada epistasia detectada.

Barbieri (2010) mapeou QTLs em testecrosses de milho doce para a produção de grãos e seus componentes. Dos 86 QTLs mapeados, 12% apresentaram interação QTL x ambiente e 23% apresentaram interação QTL x testador (linhagem elite). A interação QTL x testador tem sido reportada para características que apresentam efeito de dominância, variando de parcial a completa como é o caso da produção de grãos (AJMONE-MARSAN et al., 1994; SCHÖN et al., 1994; AUSTIN et al., 2000).

Por meio do mapeamento por intervalo expandido para múltiplos ambientes (mCIM) (JIANG; ZENG, 1995) é possível detectar a presença da interação QTL x ambiente para cada um dos QTLs mapeados. A vantagem deste método é o aumento do poder de mapeamento e de precisão das estimativas dos QTL permitindo a análise da interação QTL x ambiente. Desta forma, é possível efetuar uma avaliação mais precisa da interação. Utilizando esta metodologia, vários autores reportaram presença e ausência de interações QTL x ambiente (ZHU; KAEPLER; LYNCH, 2005; LIMA et al., 2006; RIBAUT et al., 2007).

Até o presente, os estudos de mapeamento de QTLs no Projeto Brasileiro do Genoma da Galinha foram desenvolvidos separadamente ou para a população TCTC ou CTCT. Entretanto, o mapa consenso para os cromossomos 1, 3 e 4, obtido a partir dos genótipos destas duas populações, foi recentemente publicado por Rosário et al. (2010). Este mapa foi o primeiro passo em direção ao mapeamento simultâneo de QTLs empregando-se estas duas populações.

2.5 Genes candidatos

Os genes candidatos são aqueles já sequenciados e de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com características do desenvolvimento ou da fisiologia. Estes genes podem ser estruturais ou de uma via bioquímica regulatória que afeta a expressão de uma característica que se tem interesse em estudar, como por exemplo, o desenvolvimento muscular (BRYNE; MCMULLEN, 1996).

O mapeamento de QTLs tem sido empregado para diversas características em populações experimentais, que incluem peso corporal, taxa de crescimento, obesidade,

dentre outras (FISLER; WARDEN, 1997). Segundo Andersson e Georges (2004), o principal desafio das características complexas não é detectar os QTLs, mas descobrir os genes que os explicam. Estes genes podem apresentar efeitos de epistasia e pleiotropia tornando o processo ainda mais demorado e difícil porque cada loco controla apenas uma fração da variância fenotípica (WONG et al., 2004).

Após o mapeamento de QTLs, pode-se lançar mão da estratégia de mapeamento fino (ARBILLY et al., 2006). A integração destas duas estratégias pode resultar na redução do número de potenciais genes candidatos na região genômica de interesse, com a diminuição do intervalo, onde o QTL foi mapeado. Portanto, o mapeamento de todo genoma deve ser seguido pelo mapeamento fino, baseado em métodos de associação, focado em regiões que sinalizaram ligação com características de interesse (PAPACHRISTOU; LIN, 2006).

A identificação de genes de interesse através de estudos de mapeamento é apenas um dos primeiros passos necessários para a implementação de técnicas moleculares em programas de melhoramento. Dessa forma, a seleção poderá ser realizada mais precocemente e com maior acurácia, já que a informação do genótipo do animal será utilizada na estimação de seu valor genético (ZHOU et al., 2006). Para tanto, será necessária a estimação dos efeitos dos QTLs em populações comerciais, estimação dos efeitos do marcador e QTL dentro de família, bem como a reestimação desses efeitos periodicamente. Mesmo quando o próprio gene for identificado, haverá a necessidade de reestimar seus efeitos regularmente para evitar possíveis associações negativas com outras características, com efeitos ambientais e com a própria composição genética do indivíduo. Até que se estabeleça a variante causal do gene responsável pelo efeito quantitativo sempre haverá a possibilidade de que o gene estudado não seja o que realmente esteja causando a diferença na característica, mas esteja somente ligado ao QTL (ROTHSCHILD; SOLLER, 1997).

Nos últimos vinte anos, muitos genes que controlam características mendelianas foram identificados, porém poucos que controlam características complexas, como exemplo, o gene *halotano*, responsável por maior predisposição à síndrome do estresse em suínos e que está associado à maior proporção de carne magra denominada PSE (do inglês: *pale, soft e exudative*) foram, de fato, relatados na literatura. Outro gene em

suínos que vem sendo estudado é o *receptor de estrógeno (ESR)* em características reprodutivas (REGITANO; COUTINHO, 2001). Short et al. (1995) encontraram associação entre a variação do tamanho da leitegada e um polimorfismo do gene *ESR* em diferentes raças de suínos. Em experimentos com linhagens da raça Chinesa *Meishan*, Short et al. (1997) demonstraram que o gene *ESR* aumenta em 0,8 a 1,0 leitão por leitegada para cada cópia desse alelo. Assim, animais homocigóticos apresentam um acréscimo foi de 1,6 a 2,0 leitões por leitegada. A ocorrência desse polimorfismo em linhagens comerciais foi posteriormente verificada e seu efeito nessas linhagens foi de aproximadamente 0,5 leitão por leitegada.

No caso particular de alguns bovinos da raça *Piedmontese*, o gene *miostatina* ou gene da musculatura dupla que controla uma característica de valor comercial, o desenvolvimento da massa muscular, vem sendo estudado como um possível gene candidato. Neste gene ocorre uma mutação no DNA com a substituição de uma tirosina por uma cisteína (McPHERON; LEE, 1997) gerando animais adultos com maior número de fibras musculares e maior deposição de músculo na carcaça. Essa mutação é possível de ser detectada, em que animais heterocigóticos são portadores da mutação no gene da musculatura dupla (REGITANO; COUTINHO, 2001).

Em ovinos, alguns genes principais e de interesse já foram descritos, como o *FecB*, associado à taxa de ovulação (DAVIS et al., 1982) e o gene *callipyge (CLPG)*, associado à massa muscular (COCKETT et al., 1994).

Na avicultura, estudos de mapeamento ainda não resultaram em genes ou marcadores que já estejam sendo utilizados em larga escala em programas de melhoramento, mas devido ao fato de os estudos genômicos encontrarem-se avançados, buscas *in silico* por genes de interesse serão facilitadas. Dessa forma, polimorfismos a serem detectados nestes genes e que estejam associados às características de interesse comercial poderão ser empregados em programas de melhoramento avícolas, após a validação em populações comerciais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Populações experimentais

CC é uma linhagem de postura, cujo programa de seleção se procedeu dentro da linhagem por oito gerações para melhorar produção de ovos, peso do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade, qualidade do ovo e redução do peso corporal. TT é uma linhagem de corte cujo programa de seleção também se procedeu dentro da linhagem só que por apenas seis gerações visando melhorar peso corporal, conversão alimentar, rendimentos da carcaça e do peito, viabilidade, fertilidade, eclodibilidade, redução da gordura abdominal e de síndromes metabólicas (ascite e morte súbita).

As linhagens diferiram em sua composição genética, pois a linhagem CC originou-se da raça *White Leghorn* enquanto que a linhagem TT originou-se das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*. Os detalhes do programa de melhoramento genético da Embrapa, onde estas linhagens foram desenvolvidas, encontram-se em Figueiredo et al. (2003 a, b).

As duas populações (CTCT e TCTC) foram desenvolvidas através de cruzamentos recíprocos entre a linhagem de postura (CC) e a linhagem de corte (TT). Assim, sete machos CC foram cruzados com sete fêmeas TT, gerando aproximadamente 50 animais F_1 CT. Reciprocamente, sete machos TT foram cruzados com sete fêmeas CC, gerando aproximadamente 50 animais F_1 TC. Um total de sete machos e 21 fêmeas, correspondendo à proporção de um macho para três fêmeas de cada família da geração F_1 foi selecionado para serem os parentais das populações F_2 , em que cada macho F_1 foi acasalado com três fêmeas F_1 não aparentadas. Cada fêmea F_1 produziu aproximadamente 100 animais F_2 por família de F_1 em 17 incubações, totalizando cerca de 4.000 aves F_2 . Salienta-se que uma fêmea F_1 CT morreu antes que seu sangue fosse coletado.

Na Figura 1 é apresentado um esquema da genealogia entre parentais, F_1 s e F_2 de acordo com Rosário et al. (2009).

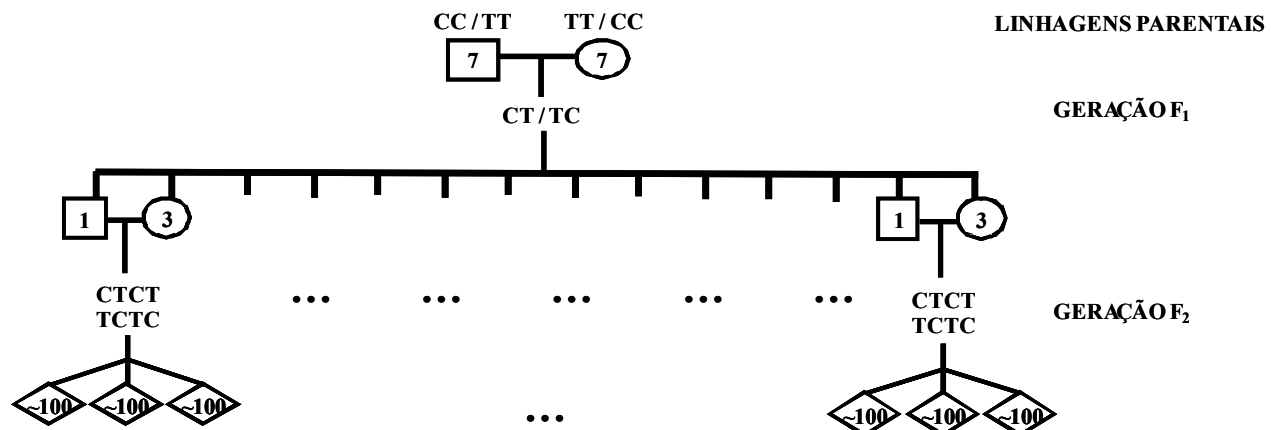


Figura 1 - Esquema simplificado do delineamento das duas populações F_2 , oriundas de cruzamentos recíprocos entre uma linhagem de postura (CC) e uma linhagem de corte (TT), desenvolvidas para mapear QTLs associados ao desempenho e à carcaça (ROSÁRIO et al., 2009)

A geração F_2 foi anelada para controle de pedigree individual e avaliada para várias características de desempenho e de carcaça. Os animais receberam ração inicial de 1 a 21 dias de idade (com 21% de proteína bruta - PB, e 3.150 kcal.kg⁻¹ de energia metabolizável - EM), de 22 a 35 dias de idade receberam ração de crescimento (com 20% de PB, e 3.500 kcal.kg⁻¹ de EM) e ração final de 36 a 41 dias (com 18,5% de PB e 3.200 kcal.kg⁻¹ de EM). Estas rações foram formuladas à base de milho e farelo de soja, a fim de atender as necessidades nutricionais das aves em cada período de criação. O manejo empregado foi da criação de frangos de corte.

As aves foram mantidas em galpões de criação até os 35 dias de idade, quando foram realizados a pesagem e alojamento em gaiolas individuais para a realização do teste de conversão alimentar dos 35 aos 41 dias. Aos 42 dias de idade realizou-se o abate, quando se coletou amostras de sangue de todas as aves para as análises moleculares.

3.2 Colheita dos dados fenotípicos e de sangue

Foram avaliadas as características: peso vivo (g) aos 35 (PV35), 41 (PV41) e 42 (PV42) dias de idade; ganho de peso (g) (GP35-41), consumo de ração (g) (CR35-41), eficiência alimentar (1.CA⁻¹) (EA35-41) e conversão alimentar (g.g⁻¹) (valor absoluto)

(CA35-41) dos 35 a 41 dias. Aos 42 dias de idade, as aves foram abatidas no Abatedouro Experimental de Suruvi, pertencente à Embrapa Suínos e Aves, Concórdia/SC, de acordo com as normas sanitárias e de bem-estar animal para a obtenção dos pesos das partes (g) e dos órgãos (g): cabeça (CAB), pés (PES), asas (ASA), pernas (coxas e sobrecoxas) (PER), peito (com pele e osso) (PEIT), dorso (DOR), gordura abdominal (GORD), fígado (FIG), coração (COR), moela (MOEL), pulmão (PULM) e intestino (INT). O peso da carcaça eviscerada (g) (PCAR) (sem pés, cabeça, pescoço e gordura abdominal) foi obtido através da soma das partes. Dados fenotípicos de características sanguíneas também foram avaliados: hematócrito (%) (HEMAT), colesterol (mg.dL^{-1}) (COL), triglicérido (mg.dL^{-1}) (TRIG) e triglicérido + colesterol (mg.dL^{-1}) (TRIGCOL).

Amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo EDTA 10% e armazenadas a -80°C para posterior extração de DNA. Foram colhidos 5 mL de sangue de todos os animais. Alíquotas destas amostras foram remetidas ao Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, para se extrair o DNA e realizar os estudos moleculares.

3.3 Extração e quantificação de DNA

Cerca de 400 animais F_2 da população CTCT, pertencentes às quatro famílias que apresentaram o maior grau de informatividade a partir de 34 marcadores moleculares localizados nos cromossomos 1, 3 e 4 tiveram seus DNAs extraídos, conforme descrito em Rosário (2007).

Utilizou-se o DNA de todos os parentais (14 CC e 14 TT), F_1 s (27 CT e 28 TC) que originaram as duas populações (CTCT e TCTC), e os F_2 s das famílias previamente selecionadas na população CTCT. Novas extrações foram realizadas quando as amostras finalizaram ou foi verificada má qualidade do DNA armazenado. Salienta-se que para os animais F_2 da população TCTC a extração de DNA e a genotipagem já foram realizadas por Ruy (2004) e que neste estudo empregou-se o banco de dados obtido por esta autora.

Para a extração do DNA dos parentais e F_1 s, em função de que algumas amostras apresentaram-se coaguladas, empregou-se o protocolo baseado na enzima

proteínase K, conforme protocolo modificado de Maniatis et al. (1982) (ANEXO A). Já para a extração do DNA dos animais F₂ foi empregado o reagente *DNAzol*[®] (*Invitrogen Technologies*) (ANEXO B) já que estas amostras não encontravam-se coaguladas.

Todas as amostras de DNA tiveram a concentração determinada através de espectrofotômetro (*Hitachi U-2000*) e, posteriormente, a concentração foi padronizada para 20 $\eta\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Após este procedimento, todas as amostras foram avaliadas em gel de agarose 1% para verificar a qualidade do DNA, quanto à quantidade e a integridade.

3.4 Seleção de marcadores microssatélites

Foram utilizados 11 marcadores moleculares microssatélites localizados no cromossomo 5, sendo sete (*LEI0082*, *MCW0193*, *MCW0090*, *LEI0145*, *LEI0149*, *ADL0233* e *ADL0298*) selecionados por Ruy (2004), que genotipou cerca de 600 animais F₂ da população TCTC, recíproca à população CTCT. Estes marcadores foram selecionados de acordo com a metodologia denominada genotipagem seletiva, descrita por Darvasi e Soller (1992), já que possuíam associação com a característica peso vivo aos 42 dias na população TCTC. Adicionalmente, quatro marcadores (*MCW0214*, *MCW0238*, *MCW0223* e *ADL0239*) foram escolhidos com base no Mapa Consenso da Galinha (SCHMID et al., 2005) e no ArkDB (disponível em: <<http://www.thearkdb.org>> acessado em outubro de 2008). A escolha destes marcadores foi em função da proximidade com os outros sete já mencionados, no intuito de saturar a região do genoma da galinha inicialmente proposta. Os 11 *primers*, ou seja, os 11 flanqueadores das regiões de microssatélites estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos *primers* fluorescentes utilizados

<i>Primer</i>	Tamanho (pb)	Marcação*	Temperatura de anelamento (°C)
<i>ADL0233</i>	95 - 111	FAM	57
<i>ADL0239</i>	168 - 172	HEX	57
<i>ADL0298</i>	99 - 115	FAM	57
<i>LEI0082</i>	249 - 277	HEX	57
<i>LEI0145</i>	296 - 326	HEX	57
<i>LEI0149</i>	212 - 234	HEX	57
<i>MCW0090</i>	100 - 122	FAM	50
<i>MCW0193</i>	302 - 316	HEX	57
<i>MCW0214</i>	270 - 288	FAM	55
<i>MCW0223</i>	176 - 186	FAM	59
<i>MCW0238</i>	184 - 208	FAM	59

*Marcação: HEX = cor verde; FAM = cor azul

3.5 Otimização da PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Os *primers* liofilizados foram solubilizados em TE (Tris-EDTA) para obter-se uma concentração de 25 $\mu\text{moles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Para utilização na reação de PCR a solução estoque foi dividida em alíquotas diluídas com água Milli-Q para uma concentração de 2,5 $\mu\text{moles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Os testes de otimização da PCR se basearam nas temperaturas de anelamento descritas por Ruy (2004). Estas temperaturas foram empregadas em quatro amostras aleatórias de DNA de galinha oriundas da população CTCT. A concentração e a qualidade do DNA utilizado eram conhecidas e adequadas para os testes preliminares de otimização dos *primers* selecionados.

Nos Procedimentos 1 e 2 são apresentados os programas e condições de PCR que foram utilizados para amplificação dos *primers*.

Procedimento 1: Programa de PCR utilizado nas amplificações: 1) desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos; 2) 94°C por 1 minuto; 3) 1 minuto à temperatura de anelamento (variação apresentada na Tabela 1); 4) 2 minuto a 72°C para extensão; 5) repetir passos 2 e 3 por 29 ciclos. Após os 30 ciclos, 10 minutos a

72°C e 4°C indefinidamente. A PCR foi realizada em termociclador *MJ Research*, modelo *DYAD*.

Procedimento 2: Componentes de cada reação de PCR (quantidades em μL para um volume final de 15 μL): água Milli-Q: q.s.p. 15,0; Tampão (10X): 1,5 (concentração final de 1X); MgCl_2 (50 mM): 1,2 (concentração final de 4,0 mM); dNTP (10 mM): 0,6 (concentração final de 0,4 mM); *primer R* e *primer F* (2,5 $\rho\text{moles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ cada): 2,4 (concentração final de 0,4 $\rho\text{moles} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); Taq DNA pol (5 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$): 0,3 (concentração final de 0,1 $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$); DNA (20 $\eta\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$): 3,0 (concentração final de 4 $\eta\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

No entanto, a maioria dos *primers* não amplificou conforme Ruy (2004). Posteriormente, foi realizado um gradiente de temperatura (variando de 45°C a 65°C) mantendo as quantidades de *primers* e cloreto de magnésio constantes. A partir do gradiente de temperatura, ficaram estabelecidas as temperaturas de anelamento para cada *primer* conforme apresentado na Tabela 1.

Após a amplificação, todas as amostras foram avaliadas em gel de agarose 2,0% antes de serem genotipadas em sequenciador automático. Foram aplicados 4 μL do produto amplificado juntamente com 2 μL de azul de bromofenol mais 0,5 μL de *Gel Red* (*Uniscience*) por canaleta e 4 μL do marcador de peso molecular $\phi X 174^{\text{®}}$ (*Promega*) mais 0,5 μL de *Gel Red* (*Uniscience*) na primeira canaleta. Esta etapa teve por objetivo verificar o tamanho dos fragmentos, intensidade das bandas bem como o aparecimento de bandas inespecíficas, evitando-se posteriores erros de genotipagem.

3.6 Genotipagem

Foram genotipados os parentais (14 TT e 14 CC), a geração F_1 (28 TC e 27 CT) que geraram todas as (41) famílias, (20) em TCTC e (21) em CTCT do Projeto Brasileiro do Genoma da Galinha e cerca de 400 animais F_2 da população CTCT. Todos estes animais tiveram seus genótipos determinados para 11 marcadores microssatélites.

As genotipagens foram realizadas no sequenciador *ABI 3100* (*Applied Biosystems*) em placas de 96 poços. Foi utilizado um conjunto de três ou quatro

marcadores por canaleta, agrupados conforme padrões distintos de tamanho e marcação (fluorescência) (Tabela 1), juntamente com o padrão interno *GS-500 ROX* (*Applied Biosystems*), que foi utilizado como referência no cálculo do tamanho dos fragmentos e a formamida deionizada. O programa utilizado para representação gráfica dos picos de fluorescência e determinação do tamanho dos fragmentos foi o *GeneScan Analysis 3.1* (*Applied Biosystems*). Já para indicar os alelos presentes nas amostras, utilizou-se o programa *Genotyper 3.11* (*Applied Biosystems*).

Ressalta-se que a genotipagem do cromossomo 5 para cerca de 600 animais F_2 provenientes das 6 famílias mais informativas da população TCTC já foi realizada por Ruy (2004), que utilizou os seguintes marcadores microssatélites: *LEI0082*, *MCW0193*, *MCW0090*, *LEI0145*, *LEI0149*, *ADL0233* e *ADL0298* e que a proposta do presente estudo foi genotipar animais da população CTCT das quatro famílias que apresentaram o maior grau de informatividade, conforme descrito em Rosário (2007) para os cromossomos 1, 3 e 4, com os mesmos marcadores microssatélites utilizados para TCTC.

3.7 Estimação de parâmetros genotípicos

A estimação dos parâmetros genotípicos baseou-se no cálculo do conteúdo de informação polimórfica (PIC), da heterozigosidade observada e esperada e do número de alelos. Este processo foi conduzido em duas etapas: Na primeira, foi realizada a análise empregando-se os genótipos de todos os animais parentais (14 TT e 14 CC) e F_1 s (28 TC e 27 CT), obtidos a partir da média de 11 marcadores (*ADL0233*, *ADL0239*, *ADL0298*, *LEI0082*, *LEI0145*, *LEI0149*, *MCW0090*, *MCW0193*, *MCW0214*, *MCW0223*, *MCW0238*). Estes animais geraram todas as 41 famílias do Projeto Brasileiro do Genoma da Galinha. Na segunda etapa, foram realizadas as análises apenas dos animais selecionados que geraram as quatro famílias de F_2 em CTCT e as seis famílias de F_2 em TCTC mais informativas, segundo Rosário (2007) e Ruy (2004), respectivamente, com o objetivo de avaliar o efeito da seleção destas famílias sobre os mesmos parâmetros genotípicos.

A população CTCT selecionada foi composta por: seis machos CC e seis fêmeas TT (parentais), dois machos e quatro fêmeas CT (F_1) e 356 animais da geração F_2 . Os

valores foram obtidos com base na média dos mesmos 11 marcadores utilizados na primeira etapa. Já para a população TCTC, 12 animais selecionados da linhagem parental (seis machos TT e seis fêmeas CC), 9 F₁ TC (três machos e seis fêmeas) e 550 animais F₂ foram avaliados. Nesta população, os parâmetros foram estimados com base na média de sete marcadores microssatélites (*ADL0233*, *ADL0298*, *LEI0082*, *LEI0145*, *LEI0149*, *MCW0090*, *MCW0193*).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado por:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^j P_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^j \sum_{j=1}^{i-1} P_i^2 P_j^2 \quad (1)$$

em que, P_i e P_j são as frequências do $i^{\text{ésimo}}$ e $j^{\text{ésimo}}$ alelos em um loco com l alelos na população, respectivamente (BOTSTEIN et al., 1980).

A heterozigosidade esperada para cada loco foi estimada por:

$$H_i = \frac{2N}{2N-1} \left(1 - \sum_{j=1}^l P_j^2 \right) \quad (2)$$

em que, P_j é a frequência do $j^{\text{ésimo}}$ alelo no $i^{\text{ésimo}}$ loco com l alelos na população e N é o número de indivíduos, assumindo que a população encontrava-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (NEI, 1987). A heterozigosidade média para todos os locos foi calculada por:

$$\bar{H} = \frac{1}{N} \left(\sum_{i=1}^N H_i \right) \quad (3)$$

em que, H_i é a probabilidade de heterozigosidade no $i^{\text{ésimo}}$ loco e N é o total de marcadores utilizados (NEI, 1987). A heterozigosidade também foi calculada baseando-se no número atual de marcadores heterozigóticos em um animal utilizando a seguinte equação:

$$H' = \left(\sum_{i=1}^N \frac{Z}{M} \right) / N \quad (4)$$

em que, Z é o número atual de marcadores heterozigóticos em um animal, M é o número total de marcadores usados e N é o número total de animais.

Para a estimação destes parâmetros foi empregado o programa CERVUS 2.0, no modo *Allele Frequency Analysis* (MARSHALL et al., 1998), assumindo a frequência mínima dos genótipos de 0%.

3.8 Análise de segregação

A análise de segregação foi realizada para cada loco dentro de cada família através do teste de χ^2 pelo PROC FREQ (SAS, 2007), empregando-se a correção de Bonferroni para um nível de 0,05 de probabilidade de erro tipo I. Os padrões de segregação foram classificados em quatro tipos: A (1:1:1:1), B (1:2:1), C (1:1) e D (não segrega) de acordo com Rosário et al. (2010). Esta análise teve utilidade tanto na construção dos mapas de ligação quanto no mapeamento de QTLs para detectar possíveis locos com distorção de segregação.

3.9 Mapas de ligação

Inicialmente, os mapas para ambos os sexos foram construídos para cada população (356 F₂ CTCT e 550 F₂ TCTC) e, posteriormente, o mapa consenso (TCTC/CTCT) foi obtido combinando-se os genótipos de ambas as populações, totalizando 906 F₂. Para isso, o posicionamento linear dos locos foi obtido de acordo com o número decrescente de meioses informativas de fase conhecida *a posteriori*. A ordem mais provável foi determinada a partir da comparação das verossimilhanças entre as diferentes ordens testadas. As distâncias entre os locos foram estimadas utilizando a análise multiponto das frações de recombinação, que foram convertidas em distâncias de mapa, em centiMorgans (cM), através da função de Kosambi (Kosambi, 1944).

Todas estas etapas foram realizadas com o auxílio do programa CRI-MAP (GREEN et al., 1990; disponível em: <<http://linkage.rockefeller.edu/soft/crimap/>> acessado em maio de 2010), empregando-se as seguintes opções: *Twopoint* (estima as frações de recombinação entre os marcadores, dois a dois), *Build* (constrói o mapa de ligação, ordenando os marcadores de acordo com a taxa de recombinação que ocorre entre eles), *Flips2* (permuta a posição dos marcadores dois a dois e gera valores de verossimilhança correspondentes) e *Chrompic* (fornece a fase de ligação dos marcadores para cada indivíduo F₂ e permite identificar duplas e triplas recombinações, auxiliando na identificação de possíveis erros). Os mapas foram representados pelo programa MapChart (VOORRIPS, 2002; disponível em: <<http://www.biometris.wur.nl/uk/Software/MapChart/>> acessado em maio de 2010).

Comparou-se o mapa de ligação consenso com o de cada população e, posteriormente, com o mapa consenso internacional (SCHMID et al., 2005) e com a posição dos locos descrita pelo UniSTS (disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>> acessado em: maio de 2010) na sequência do genoma da galinha (HILLIER et al., 2004) baseados nos critérios ordem dos locos, comprimento do mapa gerado e distância entre os locos adjacentes. Para comparar estes três mapas adotou-se a relação de 1:0,2828 cM:Mpb de acordo com ArkDB (disponível em: <<http://www.thearkdb.org>> acessado em agosto de 2010) e Schmid et al. (2005), Map Viewer (NCBI) (disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>> acessado em agosto de 2010) e Hillier et al. (2004).

3.10 Mapeamento de QTLs

3.10.1 Modelagem dos dados fenotípicos

Com a finalidade de selecionar o modelo linear que melhor se ajustava ao conjunto de dados fenotípicos, considerou-se, numa etapa inicial, o seguinte modelo misto no PROC MIXED do programa SAS[®] (SAS, 2007) para a análise:

$$y_{ijkm} = \mu + F_i + S_j + (F \times S)_{ij} + I_k + (F \times I)_{ik} + (S \times I)_{ik} + e_{ijkm} \quad (5)$$

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; S_j : efeito fixo do j -ésimo sexo; $(F \times S)_{ij}$: interação entre a i -ésima família de irmãos completos e o j -ésimo sexo; I_k : efeito aleatório da k -ésima incubação; $(F \times I)_{ik}$: interação entre a i -ésima família de irmãos completos e a k -ésima incubação; $(S \times I)_{ik}$: interação entre o j -ésimo sexo e a k -ésima incubação; e_{ijkm} : erro aleatório.

O efeito de incubação foi considerado aleatório não devido ao processo em si, já que este é totalmente controlado (temperatura, umidade e tempo de rotação dos ovos), mas sim por considerar o efeito da idade da mãe na época da postura. As fêmeas no decorrer de seu desenvolvimento apresentam uma curva de postura, na qual, pintos

nascidos no início desta curva são mais leves do que aqueles nascidos no pico da curva. Este fato é decorrente do tamanho dos ovos que no início da postura são mais leves e no pico atingem seu tamanho máximo.

Adicionalmente, como os animais F_2 foram gerados ao longo de 17 incubações quinzenais (aproximadamente 8 meses) e a mensuração das características fenotípicas foram tomadas em tempos adjacentes, existe uma correlação maior entre os animais obtidos no início, no pico e no final da curva de postura. Este cenário se ajusta dentro do conceito de medidas repetidas no tempo. Uma possibilidade de se minimizar o efeito desta correlação natural é modelar a estrutura da matriz de co(variância) para o efeito aleatório de incubação.

Para I_k e e_{ijkm} foram consideradas as matrizes de co(variância) $G\sigma^2$ e $R\sigma^2$, respectivamente, as quais foram modeladas de acordo com sete estruturas: componentes de variância (VC), auto-regressiva de primeira ordem (AR1), auto-regressiva heterogênea de primeira ordem (ARH1), simetria composta (CS), simetria composta heterogênea (CSH), toeplitz (TOEP) e toeplitz heterogênea (TOEPH). A melhor estrutura foi selecionada com base no Critério de Informação de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1974) e no Critério de Informação Bayesiana (BIC) (SCHWARZ, 1978).

As covariáveis empregadas foram PV35 para GP35-41, CA35-41, CR35-41 e EA35-41, e PV42 para os pesos de CAB, PES, FIG, COR, MOEL, INT, ASA, PER, PEIT, DOR, GORD, PULM e PCAR.

Após a avaliação do modelo com as diversas estruturas da matriz de co(variância), foi selecionado aquele contendo apenas os efeitos F_i , S_j e I_k , além da média e do erro. Para a matriz G a estrutura de co(variância) selecionada foi AR1 e para a matriz R foi VC.

3.10.2 Obtenção dos preditores genéticos

Tanto para cada população (CTCT e TCTC) quanto para a análise conjunta das duas populações, os procedimentos foram os mesmos, conforme a descrição a seguir. A diferença residiu no número total de animais, sendo que para o mapeamento de QTLs da população CTCT foram utilizados 356 animais F_2 de quatro famílias, na população

TCTC foram 550 F₂ de seis famílias e para o mapeamento simultâneo foram utilizados 906 animais provenientes de 10 famílias, sendo seis da população TCTC.

Inicialmente foram calculadas as combinações lineares das probabilidades condicionais dos diferentes genótipos dos QTLs (QQ, Qq, qQ e qq) dados os genótipos dos marcadores moleculares (HALEY et al., 1994). Estes coeficientes foram obtidos através do programa QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002), a cada centiMorgan do genoma estudado. Estas probabilidades permitiram a obtenção dos coeficientes preditos dos efeitos aditivo (*a*) e de dominância (*d*):

$$a = \text{prob}(\omega_{11}|P) - \text{prob}(\omega_{22}|P) \quad (6)$$

$$d = \text{prob}(\omega_{12}|P) + \text{prob}(\omega_{21}|P) \quad (7)$$

em que, $\text{prob}(\omega_i|P)$ é a probabilidade da combinação de origem da linhagem *i* (*i* é assumida ser 11 = TT, 12 = TC, 21 = CT e 22 = CC) para um QTL em uma dada posição, condicional aos genótipos observados nos marcadores moleculares, em um dado animal e em seus respectivos pais e avós.

3.10.3 Mapeamento por intervalo

O modelo do mapeamento por intervalo é estendido para populações *outbred* é dado por:

$$\hat{y}_j = \mu + \beta_a^* x_{aj}^* + \beta_d^* x_{dj}^* + e_j \quad (8)$$

em que, \hat{y}_j : resíduo após a modelagem fenotípica para cada característica fenotípica no $j^{\text{ésimo}}$ animal, considerando o efeito de incubação como aleatório, de acordo com o modelo 5; μ : intercepto; β_a^* : coeficiente de regressão do efeito aditivo; x_{aj}^* : preditor genético para o efeito aditivo; β_d^* : coeficiente de regressão do efeito de dominância; x_{dj}^* : preditor genético para o efeito de dominância; e_j : erro aleatório.

O modelo acima foi empregado no mapeamento de QTLs para cada população separadamente. Já para o mapeamento simultâneo, foi inserido neste modelo o efeito fixo de população (CTCT e TCTC). Dessa forma, possibilitou o estudo da interação

população x QTL, detectando possíveis efeitos diferenciados de QTLs entre as populações.

Assumiu-se como hipótese de nulidade a não existência de QTL associado a cada característica. O nível de significância foi determinado pelo teste de permutação (CHURCHILL; DOERGE, 1994) com uma modificação proposta por Chen e Storey (2006). Esta modificação nos critérios de significância é menos conservativa, permitindo a detecção de um maior número de QTLs. Assim, foi definido o LOD significativo de 3,0 e sugestivo de 1,5 tanto para o mapeamento em cada população quanto para o mapeamento simultâneo.

A proporção da variação fenotípica explicada pelo QTL empregou a seguinte fórmula:

$$R^2 = \frac{(QMR_r - QMR_c)}{QMR_r} \times 100 \quad (9)$$

em que, R^2 é a proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL, QMR_r é o quadrado médio residual do modelo reduzido (sem o QTL) e QMR_c é quadrado médio residual do modelo completo (com o QTL).

Todas as análises foram implementadas no programa R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2009), permitindo uma maior flexibilidade para o estudo da interação QTL x população e seu desmembramento.

Para a comparação dos QTLs mapeados neste estudo com os relatados na literatura transformou-se a posição dos marcadores flanqueadores de cM em Mpb através da relação de 1:0,2818 cM:Mpb, conforme descrito no item 3.9.

3.11 Genes candidatos

Com o intuito de identificar possíveis genes candidatos, realizou-se a busca por tais nas regiões genômicas onde foram mapeados QTL na análise simultânea, de acordo com a metodologia proposta por Pinard-van der Laan et al. (2009). Uma região de 10 cM, sendo 5 cM antes e 5 cM após a posição dos QTLs mapeados foi transformada de cM em Mpb através da relação de 1:0,2818 cM:Mpb. Utilizou-se o banco de dados do *Map Viewer* (NCBI) (disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>> acessado em agosto de 2010) para realizar tais

buscas. As descrições, interações e funções dos genes foram acessadas através do uso do programa *Ingenuity Pathway Analysis*[®] (disponível em: <<http://www.ingenuity.com>> acessado setembro de 2010) e *Gene Ontology* (disponível em: <<http://www.geneontology.org/>> acessado em setembro de 2010)

Com base no total de genes encontrados nas regiões alvo foi possível a obtenção de rotas metabólicas com diferentes funções através do programa *Ingenuity Pathway Analysis*[®] (disponível em: <<http://www.ingenuity.com>> acessado setembro de 2010). Os genes, cujas funções apresentaram-se diretamente associadas aos QTLs mapeados, foram selecionados como possíveis genes candidatos para estudos futuros.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estimação de parâmetros genotípicos

Quando todos os animais parentais e F_1 s foram considerados nas análises, as estimativas dos parâmetros foram similares entre as linhagens TT e CC, assim como entre F_1 (TC e CT) (Figura 2). Já na comparação entre as linhagens parentais e as gerações F_1 , verificou-se que as gerações F_1 apresentaram valores superiores de PIC, heterozigosidade observada e número de alelos. Portanto, os cruzamentos entre linhagens fenotipicamente divergentes produziram gerações F_1 que apresentaram maior diversidade genética em relação aos seus parentais. Ressalta-se que a composição genética das linhagens foi diferente, pois TT baseou-se nas raças *New Hampshire*, *White Cornish* e *White Plymouth Rock*, enquanto que CC baseou-se em *White Leghorn*. A semelhança constatada entre as gerações F_1 era esperada uma vez que elas foram obtidas a partir das mesmas linhagens fundadoras, diferindo apenas em cruzamentos recíprocos. É necessário delinear populações experimentais oriundas de cruzamentos entre linhagens divergentes (fenotípica e genotipicamente) para as características que se tem interesse em mapear QTLs. Isto maximiza o desequilíbrio de ligação, ou seja, maximiza as associações não aleatórias de alelos em dois ou mais locos, não sendo necessariamente no mesmo cromossomo.

Segundo Crooijmans et al. (1996), os marcadores podem ser altamente polimórficos em uma linhagem e monomórficos em outra, o que enfatiza a necessidade de análises preliminares baseadas no polimorfismo dentro das linhagens que serão utilizadas em estudos de ligação e associação. Portanto, baseado no PIC e na heterozigosidade dos parentais, famílias e marcadores informativos podem ser selecionados para gerar progênies altamente informativas (HILLEL, 1997; ZHU et al., 2001).

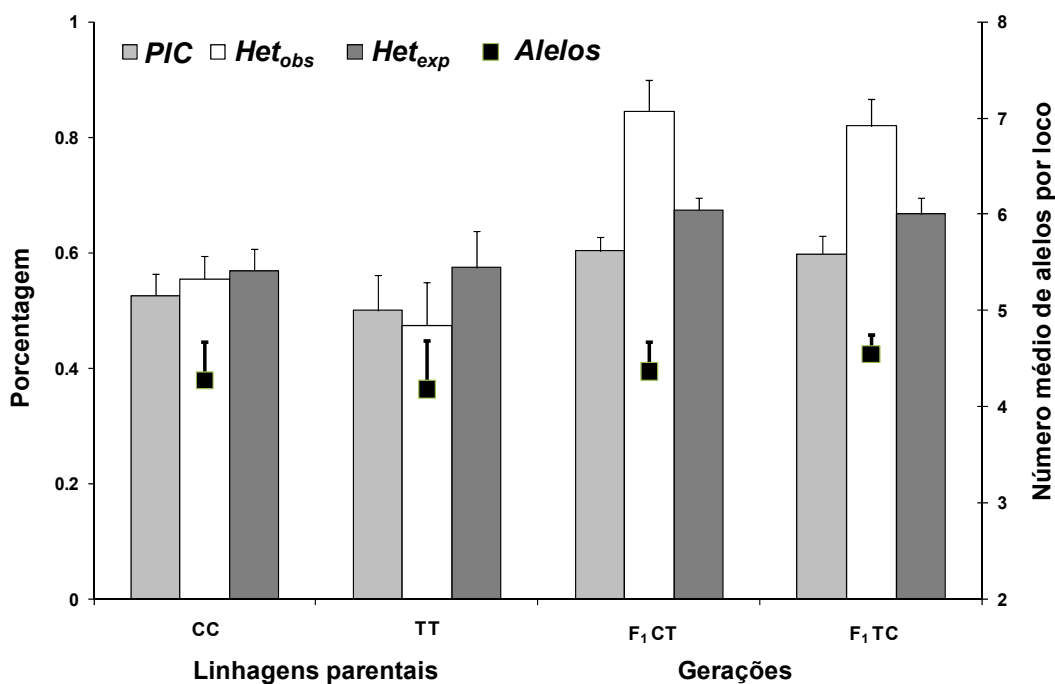


Figura 2 - Médias + erros-padrão para conteúdo de informação polimórfica (PIC), heteroziguidade observada (Het_{obs}), heteroziguidade esperada (Het_{esp}), em porcentagens (escala da esquerda) e número de alelos, para todos os animais das linhagens CC e TT e seus cruzamentos recíprocos (F₁ CT e F₁ TC)

Se o PIC, ou seja, a probabilidade de um parental ser heterozigoto em um dado loco e o outro parental ter um genótipo diferente no mesmo loco, fosse um critério de seleção dos marcadores empregados neste estudo, nem todos poderiam ser considerados apropriados, pois a informatividade dos marcadores possui relação direta com o grau de polimorfismo dos mesmos. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), os marcadores podem ser considerados como muito informativos ($PIC > 0,50$), mediantemente informativos ($0,25 < PIC < 0,50$) e pouco informativos ($PIC < 0,25$). Dessa forma, apenas um marcador na linhagem TT (*MCW0238*, $PIC = 0,07$) seria descartado e quatro marcadores seriam moderadamente polimórficos em CC (*ADL0233*, *ADL0298*, *LEI0149* e *MCW0223*). Na geração F₁, nove e dez marcadores seriam considerados altamente informativos em TC e CT, respectivamente (Tabela 2). Tuiskula-Haavisto et al. (2002) encontraram valores de PIC de 0,58 para linhagens de postura utilizando 99 marcadores microssatélites e Zhu et al. (2001), empregando linhagens de frango de corte, evidenciaram PIC médio para 27 marcadores microssatélites utilizados de 0,45.

Tanto Crooijmans et al. (1996) quanto Zhu et al. (2001) afirmaram que o polimorfismo reduzido observado em linhagens comerciais que produzem o frango de corte em relação a outras espécies de produção animal está relacionado à perda de diversidade genética devido ao longo tempo de seleção ocorrido nestas linhagens. Apesar de as linhagens TT e CC terem sofrido pressão de seleção para diversas características de desempenho e de postura, respectivamente, os parâmetros genotípicos estimados neste estudo não foram reduzidos e, assim, suportam que tais linhagens são apropriadas para a condução de trabalhos relacionados ao mapeamento de QTLs.

A média da heterozigosidade observada foi de 0,55 em CC e de 0,47 em TT, com valores entre 0,36 (*LEI0145*) e 0,71 (*ADL0233*, *ADL0298* e *MCW0193*) em CC e de 0,07 (*MCW0238*) e 0,79 (*LEI0149* e *MCW0214*) em TT (Tabela 2). A seleção de animais com maior heterozigosidade não somente aumenta o poder de detecção de QTLs, mas também melhora a precisão dos mapas de ligação e a determinação da fase de ligação (ZHU et al., 2001). Ott (1992) classifica um loco como polimórfico se a heterozigosidade (H) $\geq 0,10$ e altamente polimórfico se $H \geq 0,70$.

A heterozigosidade esperada foi 13% superior em F_1 (média de TC e CT) em relação às linhagens parentais (média de CC e TT) (Tabela 2). A diferença encontrada entre a heterozigosidade observada e esperada na geração F_1 (TC e CT) pode ser devida ao cruzamento entre duas linhagens fenotipicamente divergentes submetidas previamente à seleção, o que conduz à fixação de alelos diferentes em cada linhagem (ROSÁRIO et al., 2009). Assim, algumas combinações genotípicas estarão em maior ou menor proporção, desviando das proporções do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Os 11 marcadores exibiram um total de 93 alelos em ambas as linhagens e de 98 alelos nas gerações F_1 (Tabela 2). O número de alelos por loco variou de 2,0 (*MCW0090*, *MCW0223* e *MCW0238*) a 7,0 (*MCW0214*) para a linhagem TT e também de 2,0 (*LEI0149*) a 7,0 (*LEI0145*) para a linhagem CC. O número médio de alelos por loco nos F_1 CT foi 4,3 ($\pm 0,30$) foi igual ao encontrado por Rosário (2007), que ao analisar estes mesmos animais para os cromossomos 1, 3 e 4 com 34 marcadores, encontrou um número médio de alelos por loco de 4,2.

Tabela 2 - Conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada e esperada e número de alelos por marcador nas gerações parental e F₁s

Primers	PIC				Heterozigosidade observada				Heterozigosidade esperada				Alelos			
	Parentais		F ₁		Parentais		F ₁		Parentais		F ₁		Parentais		F ₁	
	CC	TT	TC	CT	CC	TT	TC	CT	CC	TT	TC	CT	CC	TT	TC	CT
<i>ADL0233</i>	0,44	0,49	0,69	0,76	0,71	0,50	0,96	1,00	0,54	0,55	0,75	0,81	3,0	5,0	5,0	6,0
<i>ADL0239</i>	0,57	0,68	0,72	0,67	0,57	0,36	1,00	1,00	0,64	0,75	0,78	0,73	5,0	5,0	5,0	4,0
<i>ADL298</i>	0,41	0,57	0,70	0,66	0,71	0,57	0,89	1,00	0,52	0,63	0,76	0,73	3,0	5,0	5,0	4,0
<i>LEI0082</i>	0,60	0,50	0,52	0,55	0,43	0,71	0,65	0,84	0,68	0,58	0,62	0,64	5,0	4,0	5,0	5,0
<i>LEI0145</i>	0,65	0,41	0,64	0,65	0,36	0,50	0,93	1,00	0,73	0,49	0,71	0,72	7,0	4,0	4,0	4,0
<i>LEI0149</i>	0,32	0,75	0,53	0,49	0,39	0,79	0,93	0,89	0,41	0,81	0,62	0,59	2,0	6,0	5,0	3,0
<i>MCW0090</i>	0,59	0,34	0,69	0,55	0,57	0,21	0,96	0,58	0,68	0,45	0,75	0,60	4,0	2,0	5,0	5,0
<i>MCW0193</i>	0,58	0,57	0,43	0,64	0,71	0,14	0,71	0,69	0,67	0,66	0,52	0,71	4,0	4,0	3,0	4,0
<i>MCW0214</i>	0,67	0,78	0,64	0,51	0,64	0,79	0,71	1,00	0,75	0,84	0,70	0,61	5,0	7,0	5,0	3,0
<i>MCW0223</i>	0,35	0,35	0,49	0,58	0,43	0,57	0,68	0,78	0,38	0,48	0,55	0,63	5,0	2,0	4,0	6,0
<i>MCW0238</i>	0,59	0,07	0,52	0,56	0,57	0,07	0,58	0,52	0,68	0,07	0,60	0,65	4,0	2,0	4,0	4,0
Média	0,53	0,50	0,60	0,60	0,55	0,47	0,82	0,85	0,61	0,57	0,67	0,67	4,3	4,2	4,5	4,4

Rosário et al. (2009) estudando os parentais (CC e TT) e os F_1 s (CT e TC) encontraram valores de heterozigidade observada maior (0,68-0,71) em ambas as gerações F_1 do que em suas linhagens fundadoras, elevados valores de PIC (0,50-0,52), de acordo com a classificação de Botstein et al. (1980), bem como um número satisfatório de alelos por locos (4,1 - 4,3) nas gerações recíprocas F_1 quando genotipou 34 marcadores microssatélites localizados nos cromossomos 1 (13), 3 (12) e 4 (9).

Embora a comparação dos resultados de diferentes estudos desta natureza seja difícil porque cada um utiliza populações específicas, geradas a partir de diversas linhagens que são genotipadas com diferentes tipos e números de marcadores de DNA, tentou-se comparar os resultados aqui apresentados com a literatura. Assim, os resultados (Figura 2) foram similares àqueles apresentados por Crooijmans et al. (1996) que relataram PIC médio de 0,45, heterozigidade média esperada de 0,52 e número médio de alelos por loco 3,6 em linhas de macho e de fêmea de uma linhagem de corte quando utilizaram 17 marcadores microssatélites. Vanhala et al. (1998) encontraram número médio de 5,7 alelos por loco em uma linhagem comercial de corte quando analisaram somente nove marcadores microssatélites, enquanto Kaiser et al. (2000), empregando 57 marcadores microssatélites, determinaram que o número médio de alelos por loco foi de 2,85 em duas populações de frango de corte de duas companhias de melhoramento genético.

Além da caracterização de toda a população experimental, foi realizada a caracterização apenas daqueles animais que geraram as famílias utilizadas nas análises subsequentes (mapa de ligação e mapeamento de QTLs). Uma das maiores desvantagens e que torna o mapeamento de QTLs mais difícil em populações não endogâmicas, como é o caso da galinha doméstica, é que algumas famílias não são completamente informativas para os locos em estudo, o que reduz o poder de detecção de QTL.

A Figura 3 ilustra os resultados provenientes dos 11 locos genotipados nas quatro famílias de F_2 da população CTCT mais informativas, segundo Rosário (2007).

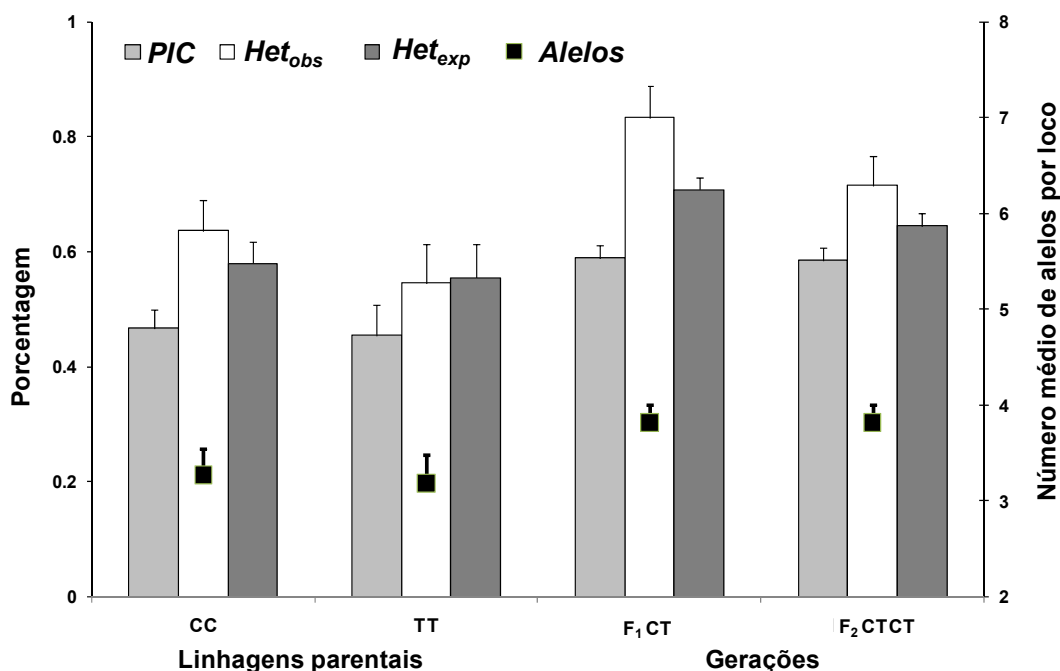


Figura 3 - Médias + erros-padrão para conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (Het_{obs}), heterozigosidade esperada (Het_{esp}), em porcentagens (escala da esquerda) e número de alelos, para os animais selecionados que geram as quatro famílias F₂ CTCT para os 11 locos

Na Figura 4 são apresentados os parâmetros genotípicos com média dos sete marcadores microssatélites avaliados na população TCTC composta pelas seis famílias de F₂ mais informativas, de acordo com Ruy (2004).

Quando foram analisados apenas os animais selecionados, verificou-se que a geração F₂ CTCT apresentou 26% e 18% acima de PIC e número de alelos em relação às linhagens parentais (seis machos CC e seis fêmeas TT), respectivamente (Figura 3); já nos F₂ TCTC essa superioridade ocorreu em todos os parâmetros (PIC, Het_{obs} , Het_{esp} e número de alelos) (Figura 4). A diferença entre a heterozigosidade observada e esperada entre os parentais e F₁, em ambas as populações, pode ser devida à deriva genética causada pelo erro de amostragem, resultado do pequeno número de animais, ou seja, seis machos CC e seis fêmeas TT selecionados para gerar os F₁s CT (dois machos e quatro fêmeas) e seis machos TT e seis fêmeas CC selecionados para gerar os F₁s TC (três machos e seis fêmeas). Estes fatos podem ter contribuído para que ambas as gerações recíprocas F₁ tenham apresentado maior heterozigosidade observada do que as linhagens fundadoras.

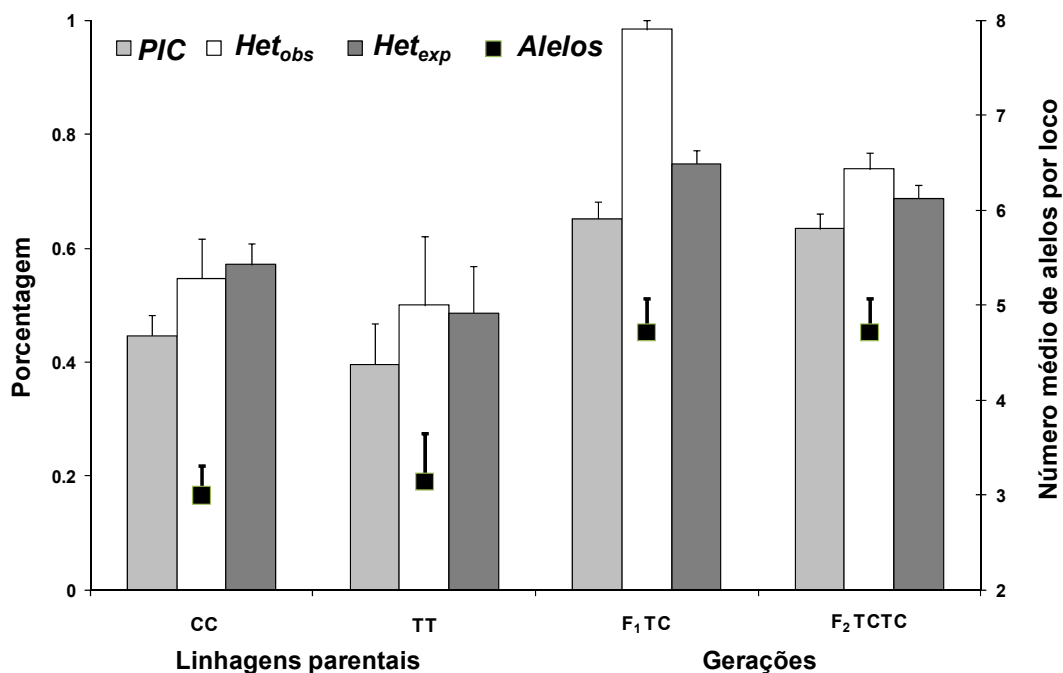


Figura 4 - Médias + erros-padrão para conteúdo de informação polimórfica (PIC), heteroziguidade observada (Het_{obs}), heteroziguidade esperada (Het_{exp}), em porcentagens (escala da esquerda) e número de alelos, para os animais selecionados que geraram as seis famílias F₂ TCTC para os sete locos

As gerações F₁ (CT e TC) apresentaram parâmetros genotípicos superiores aos F₂ (CTCT e TCTC), exceto para os valores de PIC e número de alelos que não diferiram de F₁ CT para a geração F₂ correspondente CTCT. Certamente, estes valores superiores já eram esperados, visto que em F₁ ocorre à maior diversidade genética como consequência do cruzamento entre linhagens fenotipicamente divergentes. Esta divergência fenotípica foi confirmada através da divergência genotípica exclusivamente para os cromossomos 1, 3 e 4 na população CTCT (ROSÁRIO, 2007).

A discrepância entre heteroziguidades observada e esperada com valores elevados de PIC em ambas as gerações F₁ é interessante, pois para mapear QTLs é requerida a detecção de recombinação entre locos do marcador para construir mapas de ligação e também entre alelos dos marcadores e alelos dos possíveis QTLs para mapear efetivamente os QTLs.

De acordo com as Figuras 3 e 4, os 11 marcadores de CT e os 7 em TC apresentaram 75 alelos na geração F₁. Nos F₁ CT 42 alelos (média $3,8 \pm 0,18$ por loco) foram encontrados, o número de alelos por loco variou de 3,0 (*ADL0239*, *LEI0082* e

MCW0223) a 5,0 (LEI0145), já nos F_1 TC 33 alelos (média $4,7 \pm 0,36$ por loco) foram encontrados e o número de alelos por loco variou de 3,0 (MCW0090) a 6,0 (LEI0149).

Ruy (2004) ao genotipar 20 casais F_1 da população TCTC no cromossomo 3, utilizando 17 marcadores microssatélites, e no cromossomo 5 nove marcadores, encontrou valores de heterozigosidade, PIC e número de alelos por marcador de 0,57, 0,51 e 4,7 no cromossomo 3 e de 0,72, 0,66 e 6,9 no cromossomo 5, respectivamente. Baron et al. (2001) evidenciaram valores de 0,51, 0,65, 0,67 de PIC e 0,59, 0,70, 0,73 de heterozigosidade, para os cromossomos 1, 2 e 4 respectivamente, calculados para 27 aves F_1 na mesma população TCTC utilizada por Ruy (2004).

Os resultados deste estudo demonstram que os valores de PIC ($0,59 \pm 0,02$, $0,63 \pm 0,03$), heterozigosidade observada ($0,72 \pm 0,05$, $0,73 \pm 0,03$), heterozigosidade esperada ($0,64 \pm 0,02$, $0,68 \pm 0,02$) não diferiram entre os animais F_2 das populações CTCT e TCTC, respectivamente. O número de alelos encontrados na geração F_2 TCTC ($4,7 \pm 0,36$) foi superior ao da geração F_2 CTCT ($3,8 \pm 0,18$), em média. Uma possível explicação para este fato é que na geração F_1 TC foi realizada uma análise prévia nos casais F_1 para a seleção dos marcadores mais informativos, segundo Ruy (2004). O critério de escolha desta autora baseou-se na quantidade de informação em um maior número de famílias dentre os 20 casais F_1 avaliados ou que possuísem melhor qualidade na amplificação.

Zhu et al. (2003), estudando QTLs para resistência à coccidiose em cruzamento não endogâmico entre linhagens de frango de corte, encontraram diferenças na análise de QTLs dependendo do grau de informação dos marcadores nas famílias utilizadas. Quando estes autores utilizaram 12 famílias na análise, sendo que em oito delas os marcadores não eram informativos, o LOD para o QTL foi de 1,5. Refazendo as análises com apenas quatro famílias em que os marcadores foram informativos, o LOD elevou-se para 3,46, identificando assim um QTL significativo para contagem de oocistos no cromossomo 1. Concluíram que o poder de detecção de QTLs pode ser significativamente aumentado se as famílias não informativas forem removidas da análise.

Estes resultados abrem a possibilidade de aumentar o poder de detecção de QTLs através da seleção de marcadores mais informativos (LYNCH; WALSH, 1998) e

de famílias informativas (ZHU et al., 2001). Verificou-se que as famílias selecionadas por Ruy (2004) no cromossomo 5 da população TCTC e Rosário (2007) nos cromossomos 1, 3 e 4 da população CTCT e que foram genotipadas para o cromossomo 5 neste estudo apresentaram parâmetros genotípicos apropriados para que a construção do mapa de ligação e o mapeamento de QTLs possam ser conduzidos nestas duas populações.

4.2 Padrão de segregação

O número médio de animais genotipados por loco foi de 508,7 (92,5%) exibindo, em média, 5,1 alelos em TCTC. O padrão de segregação nas seis famílias selecionadas mostrou que 78,5%, 12,0%, 9,5% e 0,0% dos locos exibiram tipo de segregação A, B, C e D, respectivamente (Tabela 3).

Na população CTCT, o número médio de animais genotipados por loco foi 341,9 (96,0%) que, em média, apresentaram 5,0 alelos. Nesta população, os padrões de segregação exibidos pelos locos nas quatro famílias foram A (54,5%), B (18,2%), C (22,8%) e D (4,5%).

A construção de um mapa genético na galinha doméstica é realizada com dados oriundos de populações segregantes (retrocruzamentos ou geração F_2) constituídas por várias famílias. Dessa forma, é esperado que cada loco marcador dentro de cada família segregue dentro de um padrão mendeliano típico que é pressuposto nos modelos probabilísticos (BEARZOTI, 2000). A ausência deste padrão é chamada distorção da segregação mendeliana, que apresenta como causas principais o efeito de amostragem, erros de genotipagem, viabilidade diferencial de gametas, dentre outras.

Hipoteticamente, um conjunto de dados moleculares no qual não ocorresse dados perdidos, erros de genotipagem e distorção de segregação seria o ideal para a construção de mapas de ligação. Entretanto, isto é praticamente impossível. Neste estudo, a média geral de dados perdidos foi de aproximadamente 7,5% em TCTC e de 4,0% em CTCT e apenas três locos apresentaram distorção de segregação de acordo com os padrões estabelecidos, dois na população TCTC: *ADL0233* (Família 4) e *MCW0090* e um na população CTCT: *MCW0193* (Família 1). Estes resultados não dificultaram a construção dos mapas, semelhante ao relatado por Hackett e Broadfoot

(2003). Estes autores, baseado em dados de simulação, demonstraram que dados perdidos e/ou erros de genotipagem reduzem a proporção da ordem correta dos locos e isto diminui as distâncias entre locos; também verificaram que a presença de dados perdidos conduz a um menor comprimento do mapa para locos mais espaçados.

Xu (2008) demonstrou que o poder de detecção de QTLs pode se beneficiar da distorção de segregação para QTLs que apresentam efeito aditivo. Este autor ainda constatou que se existem locos com distorção de segregação, mas eles são ignorados no mapeamento de QTLs, uma ligeira perda do poder de detecção é esperada, mas esta perda é insignificante se o genoma for densamente coberto por marcadores.

Tabela 3 – Descrição dos marcadores microssatélites do cromossomo 5 da galinha nas duas populações em estudo

Locos	Populações													
	TCTC						CTCT							
	Número efetivo de animais F ₂ genotipados (%) ¹	Número total de alelos	Padrão de segregação [§] nas famílias [†]						Número efetivo de animais F ₂ genotipados (%) ²	Número total de alelos	Padrão de segregação [§] nas famílias [†]			
1			2	3	4	5	6	1			2	3	4	
<i>ADL0233</i>	520 (94,5)	5,0	A	A	A	A*	A	A	342 (96,0)	5,0	C	C	A	A
<i>ADL0239</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	340 (95,5)	5,0	A	A	C	C
<i>ADL0298</i>	536 (97,4)	5,0	A	A	C	A	A	C	328 (92,1)	5,0	B	A	A	A
<i>LEI0082</i>	534 (97,1)	6,0	A	A	B	A	B	B	351 (98,6)	6,0	A	B	B	B
<i>LEI0145</i>	522 (94,9)	5,0	A	A	A	B	A	A	349 (98,0)	8,0	A	A	A	A
<i>LEI0149</i>	436 (79,2)	6,0	A	A	A	A	C	C	351 (98,0)	4,0	A	C	D	C
<i>MCW0090</i>	503 (91,4)	4,0	A*	B	A	A	A	A	340 (95,6)	4,0	A	B	A	A
<i>MCW0193</i>	510 (92,7)	5,0	A	A	A	A	A	A	339 (95,2)	4,0	B*	A	B	A
<i>MCW0214</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	342 (96,0)	5,0	C	A	A	A
<i>MCW0223</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	336 (94,3)	4,0	C	B	C	A
<i>MCW0238</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	343 (96,3)	5,0	A	A	C	D

¹número total de animais amostrados = 550

²número total de animais amostrados = 356

[§] A = 1:1:1:1; B = 1:2:1; C = 1:1 e D = não segrega

[†]Identificação de famílias por macho x fêmea. Para CTCT, 1- 797x674; 2- 797 685; 3- 703x721 e 4- 703x757; para a população TCTC, 1- 7797x7972; 2- 7797x7812; 3- 7822x7765; 4- 7822x7971; 5- 7716x7810 e 6- 7716x7978

*distorção pelo teste do χ^2 com correção de Bonferroni (p < 0,05)

4.3 Mapas de ligação

Este estudo apresenta o primeiro mapa consenso do cromossomo 5, cujo comprimento foi de 163,8 cM, construído a partir de cruzamentos recíprocos entre linhagens de corte e postura desenvolvidas em condições brasileiras de clima e manejo. Também foram construídos mapas de ligação para o cromossomo 5 das populações TCTC e CTCT (Figura 5).

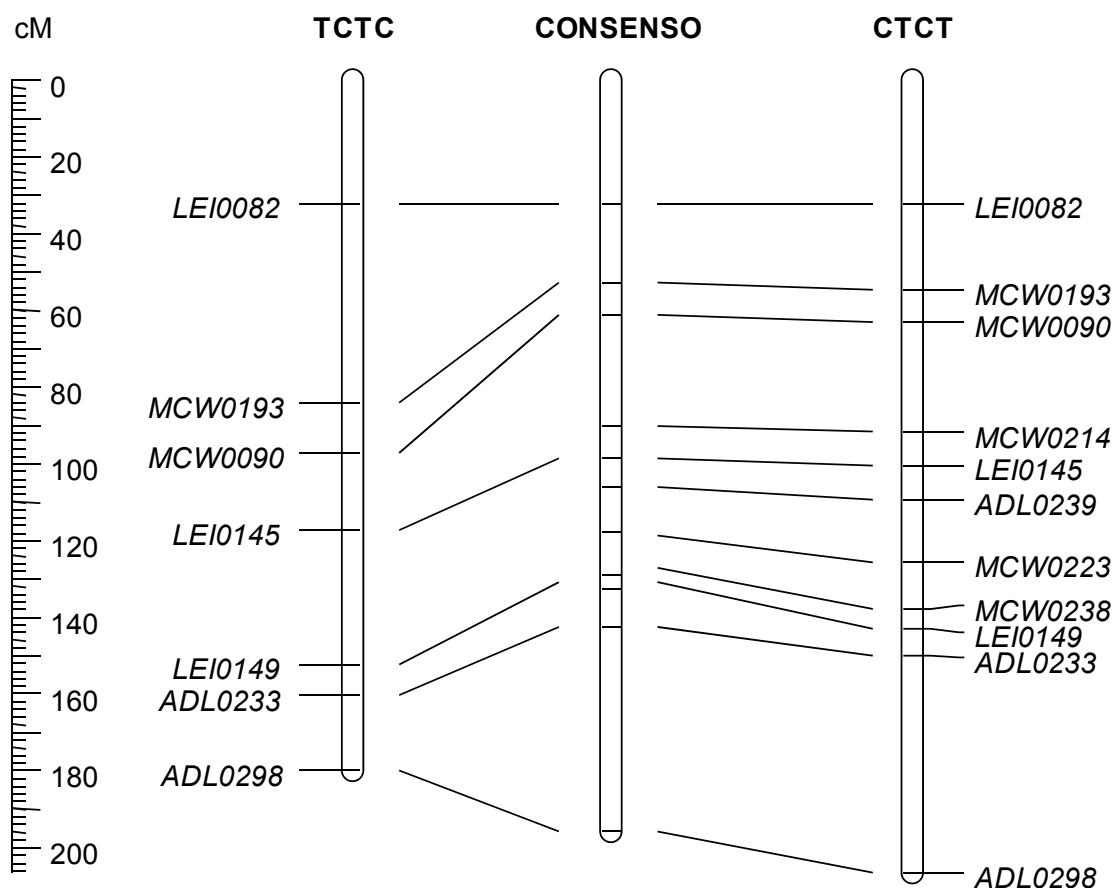


Figura 5 - Representação dos mapas das populações TCTC (esquerda), consenso (centro) e CTCT (direita), em centiMorgans (cM)

O número médio de meioses informativas de fase conhecida *a posteriori* foi 836,2 (variando de 657 (ADL0298) a 1037 (ADL0233)) em TCTC, 440 (variando de 174 (LEI0082) a 595 (MCW0214)) em CTCT, e 972 (variando de 331 (MCW0223) a 1545 (ADL0233)) para o consenso.

O intervalo médio entre os marcadores foi de 24,6 cM, 17,4 cM e 16,3 cM para TCTC, CTCT e consenso, respectivamente. A maior distância entre marcadores foi evidenciada entre *ADL0233* e *ADL0298* que foi de 19,7 cM em TCTC, 56,9 cM em CTCT e de 53,5 cM no consenso, o que acarretou um aumento no intervalo médio. Não foram constatadas inversões de marcadores entre os mapas obtidos. Os mapas apresentaram 148,0 cM e 174,7 cM para TCTC e CTCT, respectivamente, considerando como posição inicial para o primeiro marcador, *LEI0082*, aquela dada no mapa consenso de 32 cM (SCHMID et al., 2005).

De maneira geral, verificou-se maior semelhança entre CTCT e consenso, pois as linhas que unem os locos homólogos apresentaram-se mais paralelamente. Isto provavelmente seja devido ao maior número de locos que foram avaliados em CTCT (11 locos), enquanto que em TCTC apenas sete locos. No mapa consenso foram utilizados 11 locos, sendo que sete estavam simultaneamente posicionados nos mapas de TCTC e CTCT e os outros quatro exclusivamente em CTCT (*ADL0239*, *MCW0214*, *MCW0223* e *MCW0238*).

Quando o mapa consenso brasileiro foi comparado com o consenso internacional (SCHMID et al., 2005), os marcadores apresentaram a mesma ordem entre eles (Figura 6). O intervalo médio entre marcadores foi semelhante: 16,3 cM e 16,6 cM no consenso brasileiro e internacional, respectivamente. O comprimento total, considerando-se apenas entre os locos *LEI0082* a *ADL0298*, foi semelhante também com 163,8 cM e 166,0 cM para o brasileiro e o internacional, respectivamente, assumindo como posição inicial para o primeiro marcador 32 cM.

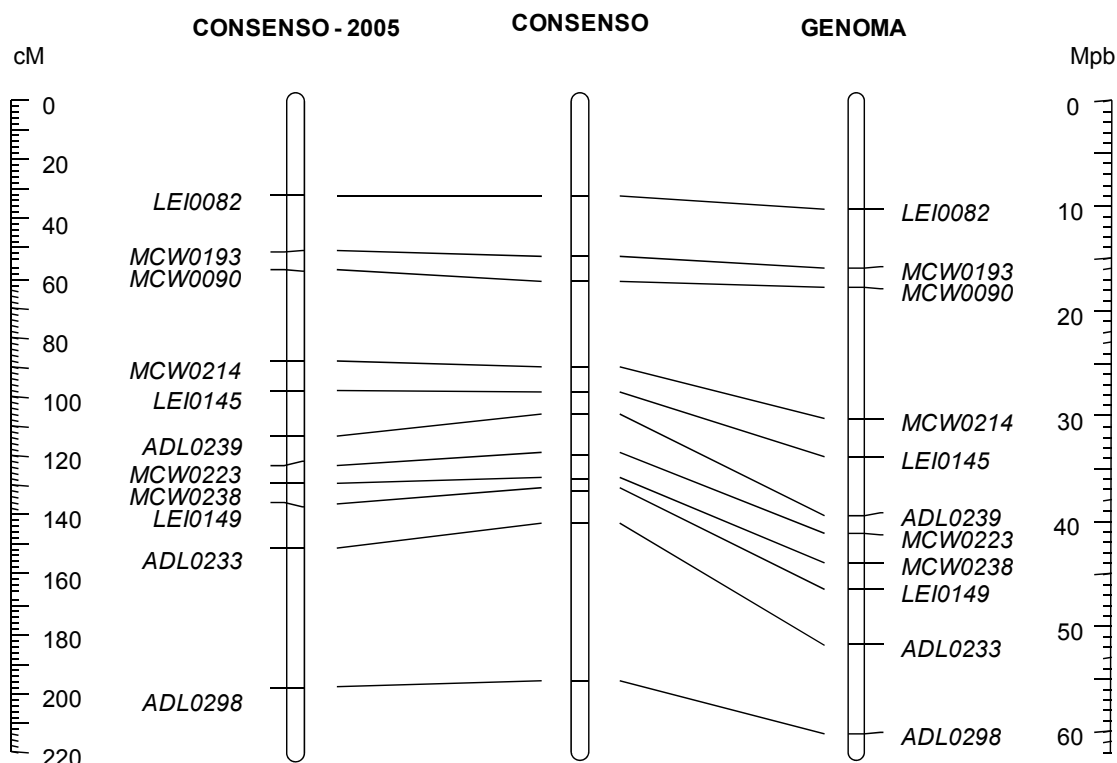


Figura 6 - Representação dos mapas Consenso-2005 (esquerda) e consenso (centro) em centiMorgans (cM), e posição no genoma (direita) em mega pares de bases (Mpb)

Já na comparação entre o mapa consenso brasileiro e o genoma (HILLIER et al., 2004), os marcadores apresentaram a mesma ordem, mas as posições dos locos, a partir do quarto marcador, foram maiores no genoma em relação ao consenso brasileiro devido as linhas que unem os locos homólogos apresentarem-se inclinadas para baixo. O intervalo médio entre marcadores e o comprimento total, considerando-se apenas entre os locos *LEI0082* a *ADL0298*, foi maior no genoma, 17,7 cM e 177,2 cM, do que no consenso brasileiro, 16,3 cM e 163,8, respectivamente, assumindo como posição inicial para o primeiro marcador 32 cM (Figura 6).

As diferenças verificadas entre o mapa consenso brasileiro e internacional e o genoma podem ser devidas à composição genética dos animais que foram genotipados em cada estudo. A população TT foi baseada nas raças *New Hampshire*, *White Cornish* e *White Plymouth Rock*, enquanto que CC foi baseada em *White Leghorn* (ROSÁRIO et al., 2009). Já o mapa consenso internacional foi composto por três populações: *East Lansing* (*Jungle Fowl* e *White Leghorn*), *Compton* (*White Leghorn*) e *Wageningen* (*White*

Plymouth Rock). Outros fatores também podem explicar estas diferenças, como por exemplo, delineamento experimental da população (F_2 ou retrocruzamento), tamanho da população, número de marcadores moleculares disponíveis, número de meioses informativas de fase conhecida, padrão de segregação dos locos, erros de genotipagem, número de genótipos perdidos e sexo (HACKETT; BROADFOOT, 2003). Esses fatores podem dificultar a comparação entre os mapas de ligação de diferentes estudos. Por isso, Rosário et al. (2010) sugeriram a adoção de medidas de precisão das estimativas, tais como intervalos de confiança para as distâncias genéticas em mapas. Esta abordagem pode ser útil para mensurar a precisão em cada mapa e facilitar comparações com mapas oriundos de outros estudos.

A obtenção de mapas de ligação estimados de maneira apropriada é um primeiro passo para que estudos detalhados, tais como mapeamento de QTLs (ABASHT; DEKKERPS; LAMONT, 2006) e de genes (SIEGEL et al., 2006) possam ser conduzidos. Então, a partir da construção deste mapa consenso brasileiro do cromossomo 5 foi possível implementar o mapeamento simultâneo de QTLs utilizando-se os dados fenotípicos e genotípicos das populações CTCT e TCTC.

4.4 Mapeamento de QTLs

4.4.1 Características fenotípicas

A variabilidade fenotípica verificada (Tabelas 4 e 5) é devido à divergência existente entre as linhagens (corte e postura) selecionadas para o cruzamento.

A média do peso vivo aos 42 dias em cada populações, é inferior às médias obtidas para linhagens comerciais (CHAPMAN; JOHNSON; McFARLAND, 2003; REDDISH; LIPBURN, 2004), mas por outro lado é similar à média de uma população experimental F_9 cujas linhagens fundadoras divergiam para peso vivo (ZEREHDARAN et al., 2004).

Tabela 4 - Descrição fenotípica das características estudadas na população CTCT

Característica ¹	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Peso vivo 35 dias	860,18	139,26	420,00	1360,00
Peso vivo 41 dias	1099,05	183,77	583,00	1736,00
Peso vivo 42 dias	1054,14	181,30	444,00	1696,00
Cabeça	36,29	6,88	23,00	58,00
Pés	40,96	8,91	22,00	71,00
Fígado	26,45	4,87	16,00	49,00
Coração	6,61	1,65	2,00	13,00
Moela	25,56	4,03	16,00	39,00
Intestino	162,25	14,84	119,00	212,00
Asas	85,63	14,14	19,00	146,00
Pernas	228,61	40,66	125,00	360,00
Peito	172,26	35,28	72,00	314,00
Dorso	204,29	38,59	87,00	359,00
Gordura	19,22	7,86	2,00	44,00
Pulmão	8,49	2,23	3,00	16,00
Ganho de peso 35-41 dias	238,87	63,02	59,00	420,00
Consumo de ração 35-41 dias	622,39	128,52	291,00	1056,00
Conversão alimentar 35-41 dias	2,70	0,65	1,24	9,61
Eficiência alimentar 35-41 dias	0,38	0,06	0,10	0,81
Colesterol	99,50	18,06	56,49	192,41
Triglicerídeos	34,57	18,61	6,73	134,43
Hematócrito	27,98	2,88	11,00	38,00
Triglicerídeo + colesterol	134,18	31,11	78,78	294,08
Peso da carcaça	690,80	122,80	303,00	1179,00

¹pesos vivos, peso dos órgãos e das partes da carcaça expressos em gramas; hematócrito expresso em porcentagem; colesterol, triglicerídeos e triglicerídeo + colesterol expressos em mg.dL⁻¹; conversão alimentar expressa em g.g⁻¹; eficiência alimentar expressa em 1.CA⁻¹.

Tabela 5 - Descrição fenotípica das características estudadas na população TCTC

Característica ¹	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Peso vivo 35 dias	804,04	137,47	490,00	1309,00
Peso vivo 41 dias	1027,37	184,10	578,00	1686,00
Peso vivo 42 dias	991,43	183,54	549,00	1631,00
Cabeça	34,94	5,98	21,00	55,00
Pés	40,52	9,04	23,00	73,00
Fígado	26,69	5,17	15,00	49,00
Coração	6,61	1,60	2,00	12,00
Moela	24,63	4,92	13,00	43,00
Intestino	153,87	15,22	112,00	212,00
Asas	81,02	14,22	31,00	127,00
Pernas	212,89	44,62	109,00	354,00
Peito	159,25	34,04	77,00	350,00
Dorso	189,40	39,48	104,00	334,00
Gordura	16,81	8,182	1,00	53,00
Pulmão	8,25	2,25	4,00	16,00
Ganho de peso 35-41 dias	223,33	70,47	-130,00	411,00
Consumo de ração 35-41 dias	606,15	136,40	124,00	1176,00
Conversão alimentar 35-41 dias	2,83	1,24	-9,28	19,17
Eficiência alimentar 35-41 dias	0,36	0,09	-381,00	1,20
Colesterol	105,92	19,23	44,28	298,81
Triglicerídeos	31,54	14,88	2,44	143,91
Hematócrito	28,21	3,11	16,00	44,00
Triglicerídeo + colesterol	137,24	27,86	74,87	396,06
Peso da carcaça	642,57	128,25	321,00	1165,00

¹pesos vivos, peso dos órgãos e das partes da carcaça expressos em gramas; hematócrito expresso em porcentagem; colesterol, triglicerídeos e triglicerídeo + colesterol expressos em mg.dL⁻¹; conversão alimentar expressa em g.g⁻¹; eficiência alimentar expressa em 1.CA⁻¹

4.4.2 Mapeamento por intervalo (IM)

Na análise realizada para cada população, foi mapeado um total de nove QTLs na população CTCT, sendo sete deles sugestivos e dois significativos. Os QTLs significativos foram associados à EA35-41 e GORD e os sugestivos associados ao peso de CAB, FIG, PER, PEIT, CA35-41, TRIG e TRIGCOL. O efeito aditivo foi positivo para GORD, indicando que os alelos favoráveis para incremento desta característica tiveram como origem a linhagem de corte (TT); já para CAB, FIG, PER, EA35-41, TRIG e TRIGCOL estes alelos tiveram origem na linhagem de postura (CC). Foram detectados

também efeitos de dominância para PEIT e CA35-41 (efeito negativo, ou seja, animais heterozigóticos apresentaram média inferior aos parentais), PER e EA35-41 (efeito positivo, ou seja, animais heterozigóticos apresentaram média superior aos parentais).

QTLs associados à PER, PEIT e EA35-41 apresentaram efeitos aditivo e de dominância. Assim, para a característica PEIT pode-se explorar o efeito de aditividade através da seleção dos alelos favoráveis oriundos de CC, obtendo-se um aumento médio de 2,64 g no peso do peito frente à redução de 6,39 g dos heterozigotos através de cruzamentos. Já para as demais características (PER e EA35-41), o efeito de dominância pode ser explorado pelo uso de cruzamentos. A porcentagem da variância fenotípica explicada pelos QTLs variou de 1,51 a 9,33% (Tabela 6).

Tabela 6 - QTLs mapeados no cromossomo 5 na população CTCT da galinha doméstica

Característica	Posição (cM) ^a	Marcadores flanqueadores	LOD ^b	A ^c	D ^d	R ^{2e}
CAB	79	MCW0090-MCW0214	1,69 [†]	-0,75 [†]	0,15	1,61
FIG	145	LEI0149-ADL0233	1,88 [†]	-0,55 [†]	-0,04	1,85
PER	179	ADL0233-ADL0298	1,61 [†]	-1,80 [†]	5,86 [†]	1,51
PEIT	187	ADL0233-ADL0298	1,68 [†]	-2,64 [†]	-6,39 [†]	1,59
GORD	105	LEI0145-ADL0239	8,01*	2,41*	-0,10	9,33
CA35-41	127	MCW0223-MCW0238	1,64 [†]	0,03	-0,18 [†]	1,55
EA35-41	125	ADL0239-MCW0223	3,08*	-0,01*	0,02*	3,36
TRIG	93	MCW0214-LEI0145	2,27 [†]	-4,31 [†]	0,84	2,34
TRIGCOL	93	MCW0214-LEI0145	2,02 [†]	-6,21 [†]	3,41	2,03

^aposição do primeiro loco dada a função do mapa Consenso (SCHMID et al., 2005), 32 cM

^bQTL sugestivo (†) e QTL significativo (*)

^cefeito aditivo: valores negativos e positivos correspondem à origem do alelo na linhagem de postura (CC) e linhagem de corte (TT), respectivamente

^defeito de dominância: valores negativos e positivos correspondem aos heterozigotos serem inferiores e superiores à média de seus parentais, respectivamente

^eporcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL

Os QTLs mapeados para PER e PEIT foram mapeados em regiões flanqueadas pelos mesmos marcadores. Isso sugere, possivelmente, a presença de somente um QTL com efeito pleiotrópico, ou seja, atuando no controle destas duas características; o mesmo ocorre para os QTLs mapeados para TRIG e TRIGCOL. (Tabela 6). Entretanto,

somente com o uso de modelos multivariados será possível elucidar se estes dois QTLs apresentam efeito pleiotrópico ou, então, de ligação.

A busca por QTLs na população CTCT concentrou-se em regiões já associadas a QTLs na etapa de genotipagem seletiva da população TCTC (RUY, 2004). Dessa forma, foi possível mapear QTLs nas mesmas regiões da população CTCT, mas não foi possível validar todos os QTLs mapeados em TCTC, sugerindo que outras características podem ser controladas por estas regiões, semelhante ao relatado por Rosário (2007).

O mapeamento na população TCTC foi realizado utilizando-se o mesmo banco de dados obtido por Ruy (2004), que mapeou QTLs sugestivos para CR35-41, COR, GORD e PGOR (porcentagem de gordura abdominal) através do programa QTL EXPRESS considerando o efeito de incubação como fixo. Portanto, devido à modelagem fenotípica realizada através de modelo misto para a população CTCT e de modelo fixo para a população TCTC, diferenças no número de QTLs mapeados entre Ruy (2004) e este trabalho, que mapeou um maior número de QTLs, foram evidenciadas. Na população TCTC foram identificados um total de 12 QTLs sugestivos associados ao PV42, CAB, COR, MOEL, DOR, GORD, PV35, PV41, CR35-41, COL, TRIG e TRIGCOL.

Os QTLs mapeados para PV42, GORD, PV35, PV41 e CR3541 apresentaram efeito aditivo positivo; já para DOR o efeito aditivo foi negativo indicando que os alelos favoráveis ao incremento destas características tiveram origem na linhagem de postura (CC). Efeitos de dominância negativos (CAB, COR e MOEL) e positivos (GOR, CR35-41, COL, TRIG e TRIGCOL) também foram detectados, ou seja, animais heterozigóticos apresentaram média inferior e superior à média dos parentais, respectivamente.

Os QTLs associados à GORD e CR35-41 apresentaram efeitos aditivo e de dominância. Neste caso, o efeito aditivo pode ser explorado já que para estas características animais que apresentem um menor peso de gordura abdominal e um menor consumo de ração devem ser selecionados. A porcentagem da variância fenotípica explicada por estes QTLs variou de 0,91 a 1,91% (Tabela 7).

Tabela 7 - QTLs mapeados no cromossomo 5 na população TCTC da galinha doméstica

Característica	Posição (cM) ^a	Marcadores flanqueadores	LOD ^b	A ^c	D ^d	R ^{2e}
PV42	57	MCW0193-MCW0090	1,79 [†]	24,05 [†]	-6,64	1,12
CAB	59	MCW0193-MCW0090	1,93 [†]	-0,09	-0,61 [†]	1,24
COR	70	MCW0090-LEI0145	2,48 [†]	-0,01	-0,42 [†]	1,69
MOEL	177	ADL0233-ADL0298	1,80 [†]	0,15	-1,11 [†]	1,14
DOR	61	MCW0090-LEI0145	1,53 [†]	-1,32 [†]	-0,91	0,91
GORD	171	ADL0233-ADL0298	2,02 [†]	0,94 [†]	1,04 [†]	1,31
PV35	71	MCW0090-LEI0145	2,02 [†]	23,24 [†]	-4,37	1,32
PV41	68	MCW0090-LEI0145	1,70 [†]	26,73 [†]	-4,89	1,05
CR35-41	180	ADL0233-ADL0298	2,74 [†]	15,87 [†]	20,24 [†]	1,91
COL	124	LEI0149-ADL0233	1,77 [†]	-0,54	4,93 [†]	1,11
TRIG	115	LEI0149-ADL0233	2,41 [†]	1,02	4,17 [†]	1,64
TRIGCOL	120	LEI0149-ADL0233	2,42 [†]	0,99	8,21 [†]	1,65

^aposição do primeiro loco dada a função do mapa Consenso (SCHMID et al., 2005), 32 cM

^bQTL sugestivo (†) e QTL significativo (*)

^cefeito aditivo: valores negativos e positivos correspondem à origem do alelo na linhagem de postura (CC) e linhagem de corte (TT), respectivamente

^defeito de dominância: valores negativos e positivos correspondem aos heterozigotos serem inferiores e superiores à média de seus parentais, respectivamente

^eporcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL

Os QTLs mapeados por Ruy (2004) e validados neste estudo associados com CR35-41, COR e GORD apresentaram os mesmos marcadores flanqueadores e seus efeitos de aditividade e dominância foram similares.

Campos et al. (2009), estudando a população TCTC no cromossomo 5, identificaram apenas um QTL associado ao triglicerídeo quando empregaram o delineamento de irmão completos e de meio irmãos. Os marcadores flanqueadores deste QTL foram *MCW0090-LEI0145*, diferentes dos encontrados neste estudo para esta mesma característica.

Quando foi realizado o mapeamento simultâneo, 12 QTLs foram mapeados (PV42, CAB, PES, FIG, COR, ASA, GORD, PV35, CR35-41, CA35-41, EA35-41, COL) (Tabela 8). Destes, 10 já haviam sido localizados nas populações separadamente: em CTCT associados à FIG, CA35-41 e EA35-41, em TCTC associados ao PV42, COR, PV35, CR35-41 e COL e em ambas as populações associados à CAB e GORD. Apenas

dois QTLs foram mapeados exclusivamente no mapeamento simultâneo (PES e ASA).

Onze QTLs foram sugestivos e apenas um (GORD) foi significativo (Tabela 8). Os efeitos aditivos foram positivos para PV42, GORD, PV35 e CA35-41, indicando que os alelos favoráveis para incremento destas características tiveram como origem a linhagem de corte (TT); já para CAB, PES e FIG estes alelos tiveram origem na linhagem de postura (CC). Foi detectado também efeito de dominância para COR, ASA, CR35-41, COL e EA35-41. A porcentagem da variação fenotípica explicada pelos QTLs variou de 0,55 a 2,22%. Em média, estes valores foram inferiores aos encontrados no mapeamento para cada população. Embora, não possam ser comparados, pois o modelo final de análise foi diferente.

Tabela 8 - QTLs mapeados simultaneamente no cromossomo 5 da galinha doméstica

Característica	Posição (cM) ^a	Marcadores flaqueadores	LOD ^b	A ^c	D ^d	R ^{2e}	LOD Pop x QTL
PV42	56	MCW0193-MCW0090	1,64 [†]	16,44 [†]	-6,06	0,61	0,14
CAB	79	MCW0090-MCW0214	2,15 [†]	-0,46 [†]	-0,33	0,86	0,94
PES	33	LEI0082-MCW0193	1,77 [†]	-0,39 [†]	0,09	0,68	0,26
FIG	105	LEI0145-ADL0239	1,63 [†]	-0,36 [†]	-0,22	0,60	0,40
COR	70	MCW0090-MCW0214	2,25 [†]	-0,01	-0,28 [†]	0,92	0,27
ASA	120	MCW0223-MCW0238	1,82 [†]	-0,03	-1,08 [†]	0,70	0,46
GORD	105	LEI0145-ADL0239	4,96*	1,36*	-0,03	2,22	4,55
PV35	76	MCW0090-MCW0214	1,53 [†]	14,73 [†]	3,77	0,55	0,42
CR35-41	118	ADL0239-MCW0223	1,67 [†]	8,32	-16,04 [†]	0,62	0,29
CA35-41	83	MCW0090-MCW0214	1,75 [†]	0,14 [†]	0,11	0,67	0,43
EA35-41	120	MCW0223-MCW0238	1,88 [†]	-0,01	0,01 [†]	0,73	0,45
COL	127	MCW0223-MCW0238	1,89 [†]	-1,82	2,86 [†]	0,73	0,52

^a posição do primeiro loco dada a função do mapa Consenso (SCHMID et al., 2005), 32 cM

^b QTL sugestivo (†) e QTL significativo (*)

^c efeito aditivo: valores negativos e positivos correspondem à origem do alelo na linhagem de postura (CC) e linhagem de corte (TT), respectivamente

^d efeito de dominância: valores negativos e positivos correspondem aos heterozigotos serem inferiores e superiores à média de seus parentais, respectivamente

^e porcentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL

Foi detectado efeito de interação entre QTL x população apenas para GOR, ou seja, existe um efeito diferenciado do QTL entre as populações CTCT e TCTC para esta

característica (Tabela 8). Quando a interação foi decomposta, verificou-se que os alelos favoráveis tiveram origem na população CTCT (macho postura e fêmea corte) e, especificamente, da linhagem TT (fêmea), com um efeito aditivo positivo (2,47 g), ou seja, a linhagem TT apresenta alelos favoráveis para o incremento no peso de gordura abdominal. Portanto, o cruzamento apropriado para o melhoramento da característica GORD é macho postura (CC) e fêmea corte (TT). Além disso, deve-se reduzir a frequência dos alelos oriundos de fêmeas TT deste cruzamento para que o peso médio de gordura abdominal seja diminuído. Estes resultados necessitam que análises complementares, como por exemplo, o mapeamento de QTLs empregando modelo de meios-irmãos, sejam conduzidas para evidenciar se os alelos dos QTLs estão ou não fixados nas linhagens parentais.

O mapeamento simultâneo permitiu o estudo da interação QTL x população. Mesmo para as características para as quais não foi evidenciada a interação QTL x população, ao empregar um número maior de animais (906, sendo que, 550 eram da população TCTC e 356 da população CTCT) houve uma melhora na precisão da posição dos QTLs. Isto foi constatado pela menor amplitude das curvas para a maioria dos QTLs mapeados.

Como o intuito maior deste estudo foi o mapeamento simultâneo, optou-se por discutir apenas os resultados desta abordagem. O mapeamento em cada população foi utilizado para a comparação com o simultâneo.

Os intervalos, onde a maior parte dos QTL foi mapeada na análise simultânea, foram reduzidos se comparados com cada população (Figuras 7, 8 e 9). Observa-se através da dos picos das curvas que estes foram melhores definidos (menor amplitude acima do nível de significância) no mapeamento simultâneo em relação às análises realizadas em cada população.

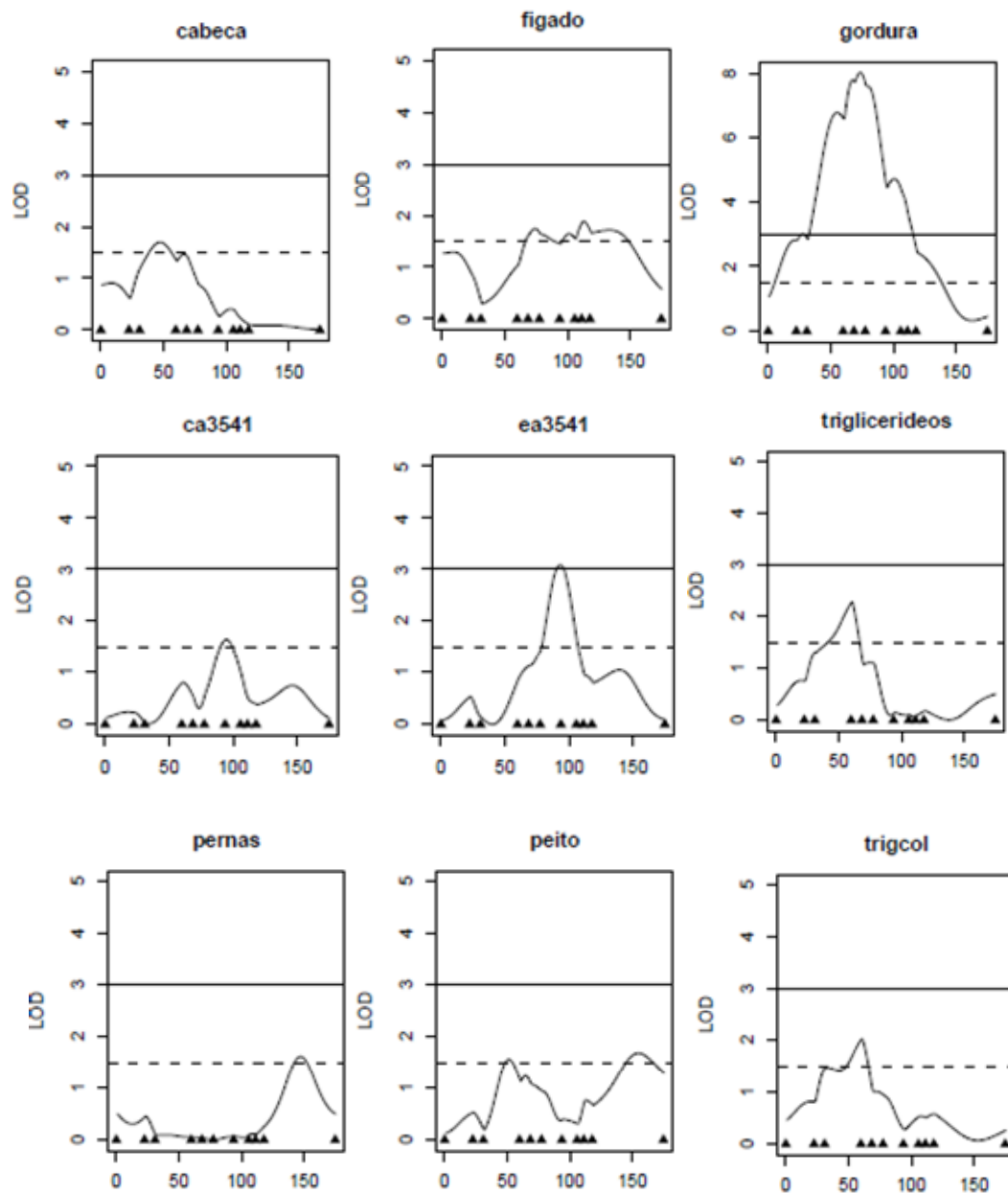


Figura 7 - Mapeamento de QTLs na população CTCT no cromossomo 5. O eixo X corresponde à posição no genoma (cM) dos marcadores microssatélites, representados pelos triângulos (▲), sendo a posição 0 igual a 32 cM; eixo Y corresponde ao LOD score com níveis sugestivos ($1,5 < \text{LOD} < 3,0$) e significativo ($\text{LOD} \geq 3,0$) no genoma

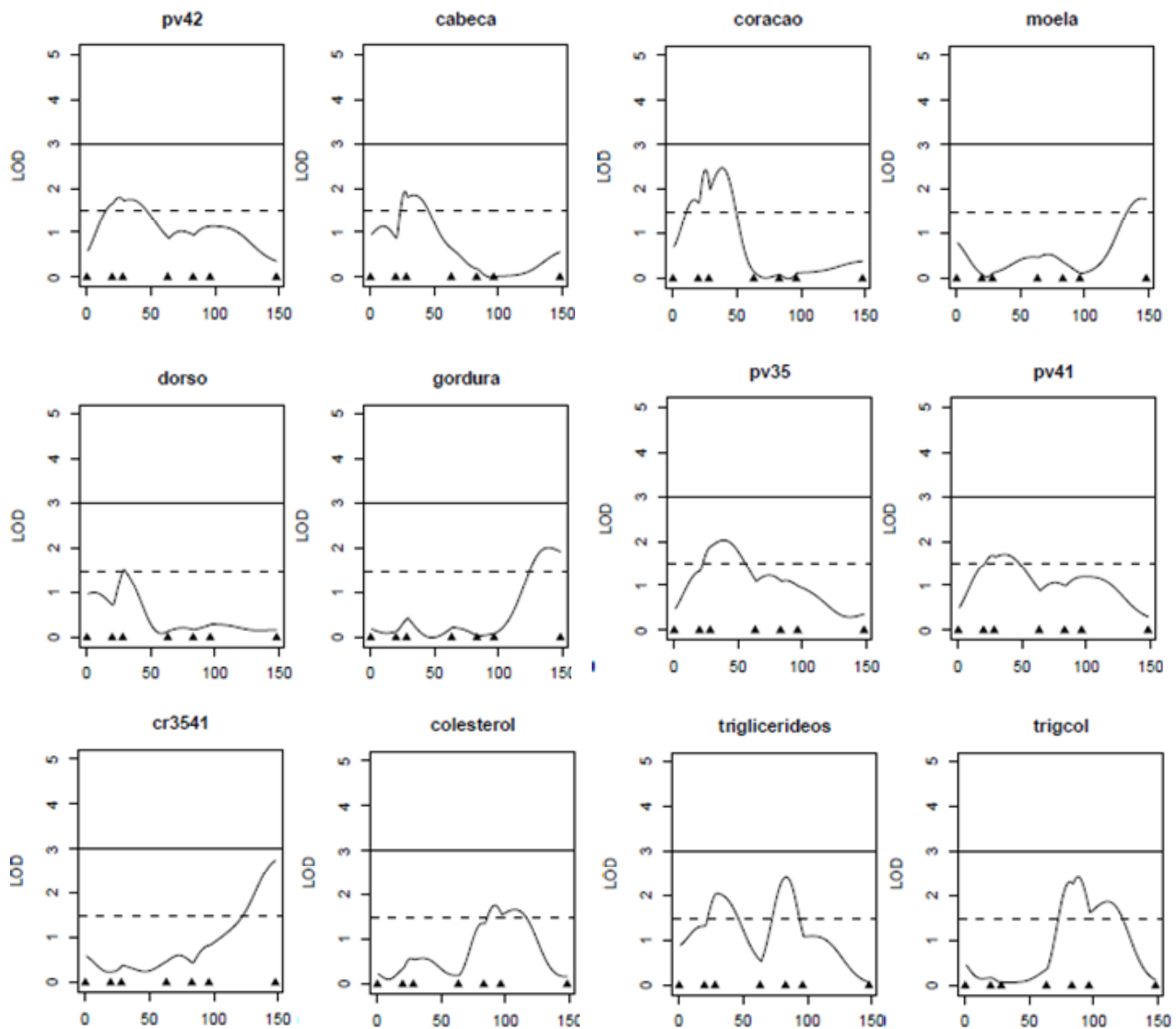


Figura 8 - Mapeamento de QTLs na população TCTC no cromossomo 5. O eixo X corresponde à posição no genoma (cM) dos marcadores microssatélites, representados pelos triângulos (▲), sendo a posição 0 igual a 32 cM; eixo Y corresponde ao LOD score com níveis sugestivos ($1,5 < \text{LOD} < 3,0$) e significativo ($\text{LOD} \geq 3,0$) no genoma

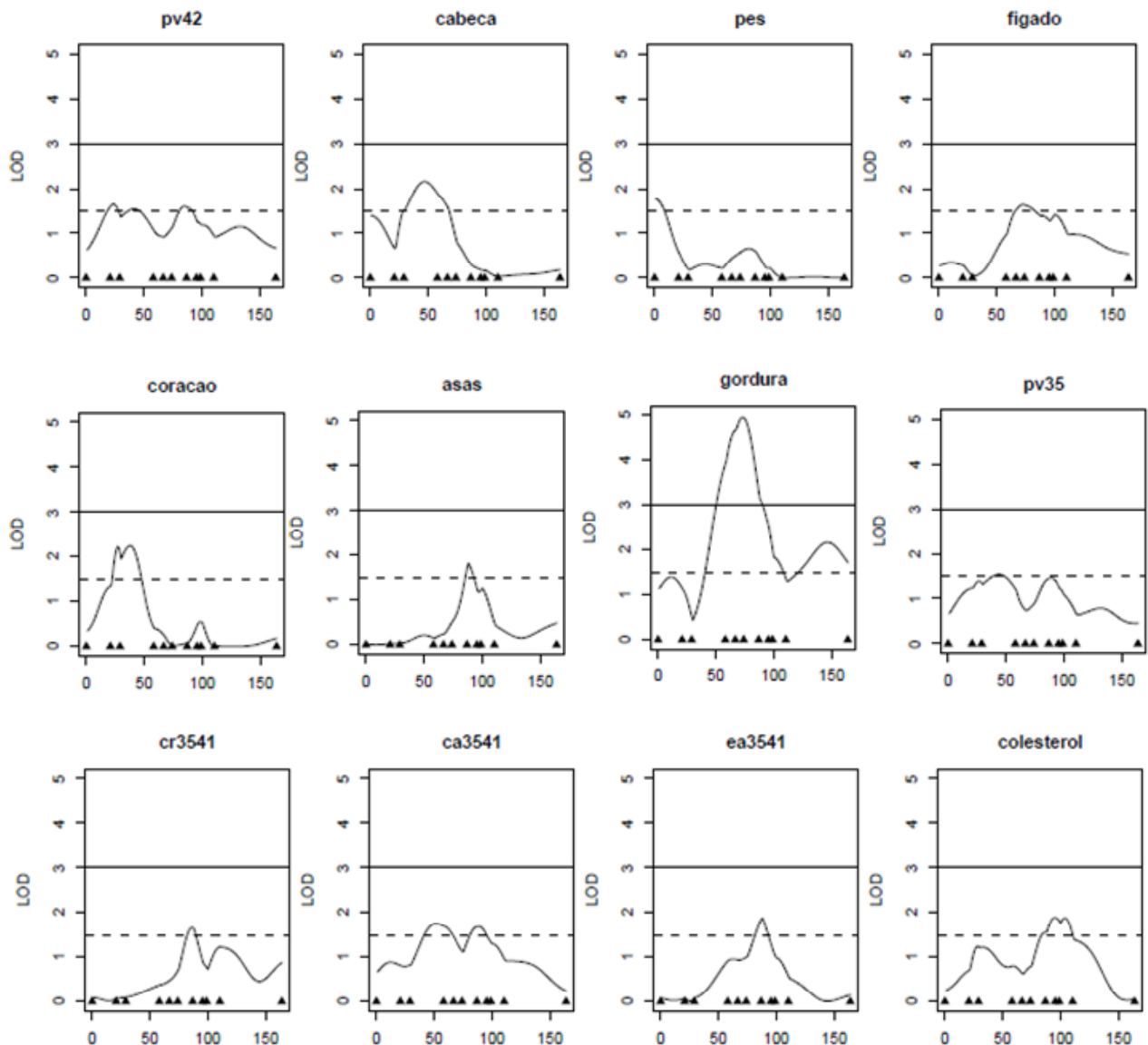


Figura 9 - Mapeamento simultâneo de QTLs no cromossomo 5. O eixo X corresponde à posição no genoma (cM) dos marcadores microssatélites, representados pelos triângulos (▲), sendo a posição 0 igual a 32 cM; eixo Y corresponde ao LOD score com níveis sugestivos ($1,5 < LOD < 3,0$) e significativo ($LOD \geq 3,0$) no genoma

Para delimitar a região onde os QTLs foram mapeados utilizou-se a estratégia dos marcadores flanqueadores, pois não foi estimado o intervalo de confiança através de reamostragem *bootstrap*, já que na maioria dos casos esta abordagem produz intervalos que cobrem praticamente todo o cromossomo. Assim, dos 11 marcadores microssatélites utilizados, 8 (72,7%) flanquearam pelo menos um QTL. Os intervalos entre os marcadores flanqueadores foram utilizados para comparar os resultados deste

estudo com os apresentados no banco de dados *Chicken Quantitative Trait Loci – ChickenQTLdb* (disponível em: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>> acessado em agosto de 2010) apenas para os QTLs associados às características avaliadas neste estudo no mapeamento simultâneo.

A comparação posicionando os marcadores flanqueadores no genoma é mais realista, pois os mapas genéticos apresentam diferenças na ordem e posição destes marcadores em diferentes estudos. Isso se deve, principalmente, ao tipo e à origem genética da população e ao número de marcadores utilizados (ROSÁRIO et al., 2010). Embora as posições dos marcadores em mapas de ligação diferentes não sejam comparáveis devido à falta de associação das medidas de variação, a sequência do genoma da galinha já está disponível e fornece a mais detalhada informação genômica.

Assim, foram detectados novos QTLs nas regiões entre *LEI0082-MCW0193* associada aos PES, entre *MCW193-MCW0090* associada ao PV42, entre *MCW0223-MCW0238* associada à ASA, EA35-41 e COL e entre *LEI0145-ADL0239* associada ao FIG. No entanto, outros QTLs para diversas características já foram relatados nestas regiões: Sasaki et al. (2004), McElroy et al. (2006) e Gao et al. (2009) mapearam entre *LEI0082-MCW0193* QTLs para peso do ovo, peso corporal e peso de pernas, respectivamente. QTLs associados à doença de Marek (McELROY et al., 2005), porcentagem e peso do músculo do peito (McELROY et al., 2006; UEMOTO et al., 2009) e de peso de gordura abdominal (McELROY et al., 2006) já foram descritos na região entre *MCW0193-MCW0090*. Um QTL para peso do osso da coxa foi mapeado por De Koning et al. (2004) no intervalo entre *MCW0223-MCW0238*. Características associadas ao peso corporal (ROWE et al., 2006; ZHOU et al., 2006 e ATZMON et al., 2008), produção de ovos (ATZMON et al., 2007), conversão alimentar (DE KONING et al., 2004), dentre outras, já foram relatadas no intervalo entre *LEI0145-ADL0239*.

Na região entre *MCW0090-MCW214* foram mapeados QTLs associados à CAB, COR, PV35 e CA35-41. Neste intervalo, De Koning et al. (2004), Sharman et al. (2007), Gao et al. (2009) e Nadaf et al. (2009) descreveram QTLs associados a características de conformação das pernas. Sewalem et al. (2002) e Jacobsson et al. (2005) mapearam QTLs para peso vivo, De Koning et al. (2004) e Rowe et al. (2009) para peso vivo aos 40 dias e Nadaf et al. (2009) para peso vivo aos 63 dias. Características relacionadas ao

escore corporal (DE KONING et al., 2004; ROWE et al., 2009), coloração do peito (RABIE et al., 2005), peso da moela (TERCIC et al., 2009) e gordura abdominal (LAGARRIGUE et al., 2006; LE MIGNON et al., 2009) também já foram descritas nesta região.

O QTL mapeado no intervalo entre *LEI0145-ADL0239* associado à GOR confirmou aqueles detectados por Ikeobi et al. (2002), Atzmon et al. (2008) e Nadaf et al. (2009). Esta característica é importante para a indústria avícola, pois o mercado consumidor vem exigindo alimentos com menores teores de gordura. Portanto, os programas de melhoramento genético têm focado na redução do teor de gordura nas carcaças de frangos de corte. Entretanto, por se tratar de uma característica que está correlacionada positivamente ao peso vivo, reduzi-la implicaria em resposta negativa em termos de ganho de peso ou crescimento. Desta forma, a identificação de QTLs que estão associados à deposição de gordura pode trazer informações adicionais ao processo de seleção e facilitar a identificação e multiplicação de matrizes com teores de gordura reduzidos.

Para a característica CR35-41 foi mapeado um QTL entre *ADL0239-MCW0233* confirmando aquele evidenciado por De Koning et al. (2004). QTLs associados ao peso de moela (NAVARRO et al., 2005), peso das asas (IKEOBI et al., 2004) e peso de peito (DE KONING et al., 2004) também já foram relatados neste intervalo.

Estes são os primeiros resultados do mapeamento de QTLs empregando a análise simultânea em populações recíprocas da galinha brasileira oriundas do cruzamento entre linhagens de corte (TT) e de postura (CC). Adicionalmente, as estimativas de posição e efeito dos QTLs mapeados apresentaram uma maior precisão na análise simultânea se comparado àqueles mapeados nas populações separadamente devido ao maior número de animais utilizados. As regiões onde estes QTLs foram mapeados na análise simultânea poderão ser utilizadas como referência para que estudos complementares por meio de outras abordagens genômicas, como por exemplo, a busca por genes candidatos, o mapeamento fino, testes de associação com SNPs em larga escala e o estudo do padrão de expressão de mRNA entre as linhagens TT e CC possam ser conduzidos. Entretanto, como a maior parte dos QTLs mapeados foi sugestiva, estudos adicionais podem ser conduzidos, como por exemplo, através do

maior número de famílias informativas genotipadas e da saturação dos maiores intervalos com marcadores microssatélites e/ou SNPs.

4.5 Genes candidatos

Nas regiões indicadas pelos QTLs mapeados simultaneamente foram detectados 119 genes, dos quais 97 foram únicos e 22 foram detectados em mais de uma região devido à sobreposição de alguns intervalos (Tabela 9). Não foram utilizados os genes definidos como LOC destas regiões, pois estes são locos com pouca informação sobre a função, sendo, normalmente, proteínas hipotéticas.

Tabela 9 – Regiões contendo os QTLs mapeados simultaneamente utilizadas na busca por possíveis genes candidatos

Características	Posição do QTL (intervalo) (cM) [§]	Posição do QTL (intervalo) (Mpb) [‡]	Número de genes*
PES	33 (28-38)	7,89-10,70	20
PV42	56 (51-61)	14,37-17,19	21
COR	70 (65-75)	18,31-21,13	16
PV35	76 (71-81)	20,00-22,82	6
CAB	79 (74-84)	20,85-23,67	5
CA35-41	83 (79-89)	21,98-24,79	8
FIG e GORD	105 (100-110)	28,18-30,99	12
CR35-41	118 (113-123)	31,84-34,66	14
ASA e EA35-41	120 (115-125)	32,40-35,22	11
COL	127 (122-132)	34,38-37,19	6
Total			119

[§]a busca por genes concentrou-se em uma região de 10 cM, sendo 5 cM antes e 5 cM após a posição dos QTLs mapeados

[‡]a relação utilizada foi 1:0,2818 cM:Mpb de acordo com ArkDB (disponível em: <<http://www.thearkdb.org>> acessado em agosto de 2010) e Schmid et al. (2005), Map Viewer (NCBI) (disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>> acessado em agosto de 2010) e Hillier et al. (2004)

*excluindo os genes definidos como LOC; 97 genes únicos e 22 genes detectados em mais de uma região

Dos 97 genes únicos, 86 foram utilizados pelo programa *Ingenuity Pathway Analysis*[®] (disponível em: <<http://www.ingenuity.com>> acessado setembro de 2010) para

a obtenção de nove rotas de interação (Tabela 10), relacionadas com: 1) sistema imune, desenvolvimento e manutenção celular, 2) ao metabolismo de carboidratos e ciclo celular, 3) à morte celular, desenvolvimento do organismo e doenças neurológicas, 4) à morte celular, expressão gênica e células sinalizadoras, 5) ao metabolismo de carboidratos e de drogas, 6) à modificação pós-tradução, sinalização e interação célula-célula e organização celular, 7) ao ciclo celular, expressão gênica e desenvolvimento celular, 8) à sinalização celular, função e desenvolvimento do sistema reprodutivo e movimento celular, e 9) organização, morfologia e manutenção celular.

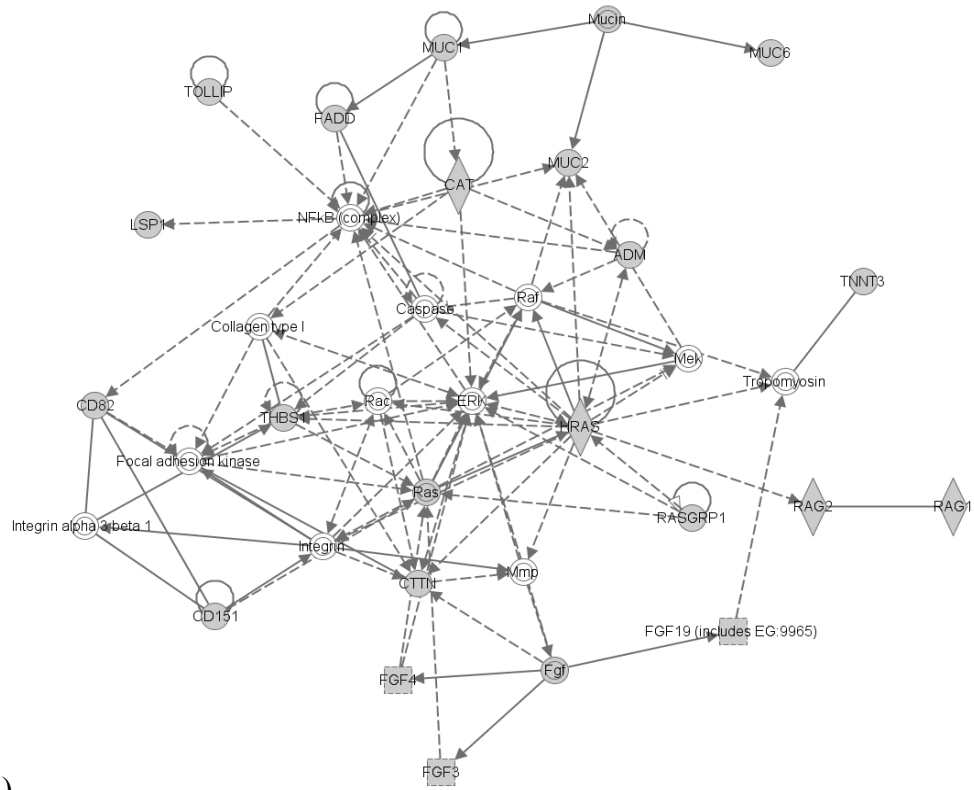
Tabela 10 - Rotas de interação obtidas pelos genes contidos nas regiões dos QTLs mapeados simultaneamente

Rotas de interação	Genes indicados pelos QTLs	Genes participantes da rota*
1) Sistema imune, desenvolvimento e manutenção celular	20	42
2) Metabolismo de carboidratos e ciclo celular	13	23
3) Morte celular, desenvolvimento do organismo e doenças neurológicas	11	19
4) Morte celular, expressão gênica e células sinalizadoras	11	19
5) Metabolismo de carboidratos e de drogas	10	17
6) Modificação pós-tradução, sinalização e interação célula-célula e organização celular	10	17
7) Ciclo celular, expressão gênica e desenvolvimento celular	9	15
8) Sinalização celular, função e desenvolvimento do sistema reprodutivo e movimento celular	1	2
9) Organização, morfologia e manutenção celular	1	2
Total	86	156

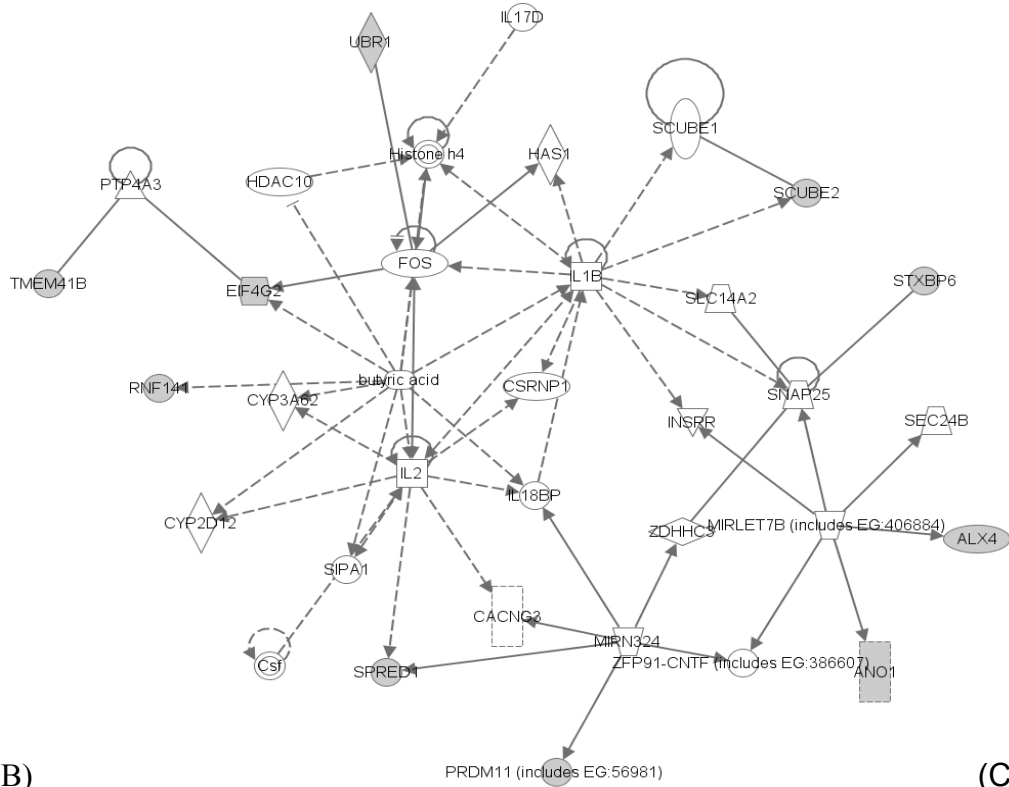
*inclui os genes da coluna anterior

Na avicultura industrial estima-se que cerca de 5-8% da produção mundial seja atingida pela manifestação de síndromes metabólicas, o que representa perdas anuais em torno de 2,0 bilhões de dólares (USDA, 2009). Estas síndromes são processos desencadeados por limitações na resposta fisiológica de determinados órgãos ou sistemas, relacionados ao sistema de produção. Portanto, não existe um patógeno primário envolvido na manifestação destas síndromes já que elas apresentam origem genética, especialmente nas linhagens selecionadas para maior crescimento corporal. Estas linhagens têm sido submetidas à forte pressão de seleção a fim de atingirem os elevados índices de produção vigentes. Dentre os distúrbios metabólicos, destacam-se a síndrome ascítica, a síndrome da morte súbita e a discondroplasia tibial (JULIAN, 1998) A nutrição e a digestão também têm sido alvos de aprimoramento da avicultura industrial com o objetivo de tornar eficiente o uso dos componentes das rações (carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas e sais minerais). Isto se deve ao fato de a alimentação corresponder em torno de 70-75% dos custos finais de produção (FAO, 2009).

Neste contexto, os genes *FGF4* e *FGF19* (Figura 10A), *ALX4* (Figura 10B) e *FMN1* (Figura 10C) podem ser indicados como possíveis genes candidatos, pois desempenham papéis fundamentais nos mecanismos moleculares que estabelecem a formação dos membros nos vertebrados (*FMN1* e *ALX4*) (TAKAHASHI et al., 1998; KATOH et al., 2004; DIMITROV et al., 2010), o desenvolvimento do sistema nervoso e do coração (*FGF19*) e de vasos sanguíneos (*FGF4*) (YOSHIDA et al., 1994), os quais estão diretamente relacionados aos QTLs mapeados neste estudo.



(A)



(B)

(Continua)

(Conclusão)

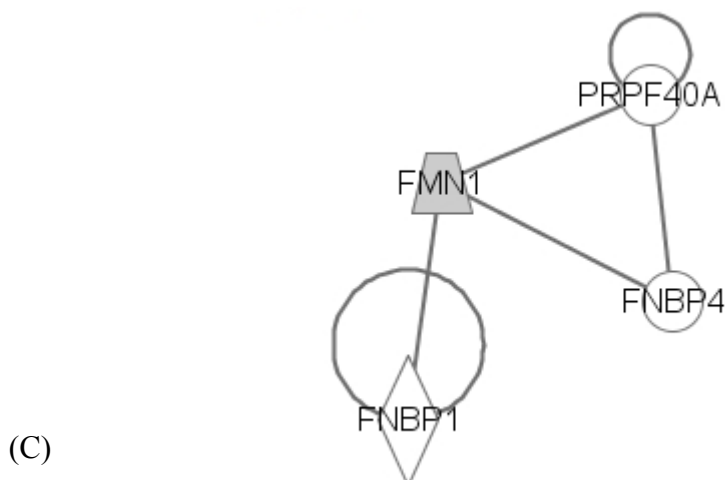


Figura 10 - Rotas de interação entre produtos dos genes candidatos. Linhas cheias e tracejadas representam interação direta e indireta, respectivamente. (A) sistema imune, desenvolvimento e manutenção celular, (B) ao metabolismo de carboidratos e de drogas e (C) organização, morfologia e manutenção celular

Em camundongos (QU et al., 1997) e em humanos (WU et al., 2000) tem sido evidenciada expressão restrita do gene *ALX4* nos ossos. Os genes *ALX4* e *FMN1* são fortes candidatos para a identificação de sindactilia em bovinos e ratos, respectivamente (WÖHLKE et al., 2006; DIMITROV et al., 2010). A sindactilia ('*mulefoot*') é caracterizada pela fusão ou não divisão dos dois dígitos do pé do animal (LEIPOLD et al., 1973). Estes genes podem ser candidatos ao estudo do distúrbio de discondroplasia tibial na galinha doméstica. O *FGF4* é um forte indutor da produção de plaquetas (SAKAMOTO et al., 1994; AVECILLA et al., 2004), podendo ser um gene candidato relacionado à ascite e à morte súbita. Jones (2007) relatou uma experiência com camundongos transgênicos administrados com *FGF19* exógeno e estes animais apresentaram resistência aos efeitos de uma dieta rica em gordura, sugerindo que o *FGF19* pode desempenhar um papel importante na via metabólica de sinalização de lipídeos. Este gene pode ser candidato a estudos relacionados ao metabolismo de lipídeos na galinha.

Portanto, esses possíveis genes candidatos são uma oportunidade para explorá-los nas populações CTCT e TCTC utilizando-se diferentes abordagens como o mapeamento fino, testes de associação com SNPs localizados nesses genes e estudo

do nível de expressão de mRNA. Um passo seguinte será a validação de polimorfismos detectados nestes genes em populações comerciais. Dessa forma, a seleção assistida por marcadores em associação com a seleção fenotípica em programas de melhoramento genético poderá ser efetivamente implementada na galinha doméstica.

5 CONCLUSÕES

A caracterização genotípica das populações CTCT e TCTC evidenciou que elas são apropriadas para que estudos relacionados à construção do mapa de ligação e ao mapeamento de QTLs no cromossomo 5 sejam conduzidos.

A integração dos mapas das populações CTCT e TCTC no mapa consenso brasileiro do cromossomo 5 demonstrou que eles são similares entre si e entre o mapa consenso internacional e o genoma, possibilitando o mapeamento simultâneo de QTLs.

A implementação do mapeamento simultâneo de QTLs no cromossomo 5 permitiu o estudo da interação QTL x população para o peso da gordura abdominal, cujos alelos para incremento dessa característica têm origem em fêmeas da linhagem de corte da população CTCT. QTLs para peso dos pés e das asas foram mapeados exclusivamente através desta abordagem. Quatro possíveis genes candidatos (*FGF4*, *FGF19*, *ALX4* e *FMN1*) foram selecionados para estudos futuros relacionados à identificação de polimorfismos e validação em populações comerciais.

REFERÊNCIAS

- ABASHT, B.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Review of quantitative trait loci identified in the chicken. **Poultry Science**, Savoy, v.85, p.2079-2096, 2006.
- AJMONE-MARSAN, P.; MONFREDINI, G.; LUDWIG, W.F. Identification of genomic regions affecting plant height and their relationship with grain yield in an elite maize. **Maydica**, Bergamo, v.39, p.133-139, 1994.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical-model identification. **IEEE Transaction on Automatic Control**, New York, v.19, p.716-723, 1974.
- AL-NASSER, A. Overview of chicken taxonomy and domestication. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.63, n.2, p.285-300, 2007.
- AMBO, M. **Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 de Gallus gallus**. 2007. 82p. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- AMBO, M.; MOURA, A.S.; LEDUR, M.C. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v.40, p.200-208, 2009.
- ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature Reviews Genetics**, London, v.5, p.202-212, 2004.
- ANDERSSON-EKLUND, L.; MARKLUND, L. LUNDSTRÖM, K. Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality in a Wild Boar x Large White intercross. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.76, p.694-700, 1998.
- ANKRA-BADU, G.A; SHRINER, D; LE BIHAN-DUVAL, 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, p.107, 2010.
- ARBILLY, M. An integrative approach for the identification of quantitative trait loci. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, p. 7-9, 2006.
- ATZMON G.; BLUM, S.; FELDMAN, M. Detecção de QTLs agronomicamente importantes para as galinhas e análise dos fatores que afetam a estratégia de genotipagem. **Cytogenetic Genome Research**, Würzburg, v.117, p.327-337, 2007.
- ATZMON, G.; BLUM, S.; FELDMAN, M. QTLs detected in a multigenerational resource chicken population. **Journal of Heredity**, Cary, v.99, p.528-538, 2008.
- ATZMON, G.; RONIN, Y.I.; KOROL, A. 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, p.352-358, 2006.

AUSTIN, D.F.; LEE, M.; VELDBOOM, L.R. et al. Genetic mapping in maize with hybrid progeny across testers and generations: Grain yield and grain moisture. **Crop Science**, Madison, v.40, p.30-39, 2000.

AVECILLA, S.T.; HATTORI, K.; HEISSIG, B. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. **Nature Medicine**, London, v.10, p.64-71, 2004.

BARBIERI, V.H.B. **Mapeamento de QTL em testecrosses de milho doce com diferentes testadores e ambientes**. 2010. 130p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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. QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02105.x.

BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K. Avaliação de marcadores microssatélites para mapeamento de QTL nos cromossomos 1, 2, 3, 4 e 5 de aves. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE GENÉTICA, 47., 2001. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2001.p.157

BEARZOTI, E. Mapeamento de QTL. In: PINHEIRO, J.B., CARNEIRO, I.F (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiania: FUNAPE, 2000. p.63-223.

BOSCHIERO, C. **Mapeamento de locos de características quantitativas associados a desempenho e carcaça nos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus***. 2006. 90p. Dissertação.(Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Botucatu, 2006.

BOSCHIERO, C. **Mapeamento fino de QTLs e polimorfismos de genes candidatos associados ao crescimento no cromossomo 1 da galinha**. 2009. 119p. Tese. (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2009.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v.32, p.314-331, 1980.

BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J.A.M.; DAVIS, G. Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. **Livestock production Science**, Oxford, v.52, p.135-144, 1997.

BROGIN, R.L. **Mapeamento de genes de resistência à ferrugem e de QTLs envolvidos na resistência à Septoriose em soja**. 2005. 93p. Tese. (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

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**, Cambridge, v.58, p.5-13, 2002.

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

BURT, D.W. Chicken genomics charts a path to the genome sequence. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, Oxford, v.3, p.60-67, 2004.

CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 374 p.

CAMPOS, R.L.R. **Mapeamento de QTL nos cromossomos 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 e 18 da galinha doméstica (*Gallus gallus*) que influenciam características de desempenho**. 2007. 80p. Dissertação.(Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

CAMPOS, R.L.R.; AMBO, M.; ROSÁRIO, M.F. Potential association between microsatellite markers on chicken chromosomes 6, 7 and 8 and body weight. **International Journal of Poultry Science**, Savoy, v.8, p.696-699, 2009a.

CAMPOS, R.L.R.; NONES, K.; LEDUR, M.C. Quantitative trait loci associated with fatness in a broiler-layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v.40, p.729-736, 2009b.

CARLBORG, Ö.; JACOBSSON, L.; AHGREN, P. Epistasis and the release of genetic variation during long-term selection. **Nature Genetics**, London, v.38, p.418-420, 2006.

CARLBORG, Ö.; KERJE, S.; SHÜTZ, K. A global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken. **Genome Research**, Woodburg, v.13, p.413-421, 2003.

CEPEA - **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada** (2009). Disponível em <<http://www.cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em: jan. 2009.

CHAPMAN, H.D.; JIHNSON, Z.B.; McFARLAND, J.L. Improvements in the performance of commercial broilers in the USA: analysis for the years 1997 to 2001. **Poultry Science**, Savoy, v.82, p.50-53, 2003.

CHEN, L.; STOREY, J.D. Relaxed significance criteria for linkage analysis. **Genetics**, Baltimore, v.173, p.2371-2381, 2006.

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

Chicken QTLdb - **Chicken Quantitative Trait Loci database** (2010). Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>>. Acesso em: set. 2010.

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

COCKETT, N.E.; JACKSON, S.P.; SHAY, T.L. Chromosomal localization of the callipygen gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. **Proceedings of the national Academy of Science**, Washington, v.91, p.3019-3023, 1994.

COE, H.E.; NEUFFER, M.G.; HOISINGTON, D.A. The genetics of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, J.W. (Ed.). **Corn and corn improvement**, Washington: American Society of Agronomy, 1988. p.81-237.

COELHO, A.A.D.; SAVINO, V.J.M.; ROSÁRIO, M.F. **Frango Feliz: caminhos para a avicultura**. Piracicaba: FEALQ, 2008. 88p.

COELHO, A.S.G. Considerações gerais sobre a análise de QTL's. In: PINHEIRO, J.B.; CARNEIRO, I.F. (Ed.). **Análise de QTL no melhoramento de plantas**. Goiânia: FUNAPE, 2000. p.1-36.

CROOIJMANS, R.P.M.A.; GROEN, A.F.; VAN KAMPEN, A.J.A. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines using pooled blood samples. **Poultry Science**, Savoy, v.75, p.904-909, 1996.

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

DAVIS, G.H.; MONTGOMERY, G.W.; ALLISON, A.J. Segregation of a major gene influencing fecundity in progeny of Booroola sheep. **New Zealand Journal of Agriculture Research**, New Zealand, v.25, p.525-529, 1982.

DE KONING, D.J.; HALEY, C.S.; WINDSOR, D. Segregation of QTL for production traits in commercial meat-type chickens. **Genetical Research**, New York, v.83, p.211-220, 2004.

DE KONING, D.J.; WINDSOR, D.; HOCKING, P M. Quantitative trait locus detection in commercial broiler lines using candidate regions. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.81, p.1158-1165, 2003.

DEEB, N.; LAMONT, S.J.; Genetic Architecture of growth and body composition in unique chicken populations. **The American Genetic Association**, Mayland, v.93, p.107-118, 2002.

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

DIMITROV, B.I.; VOET, T.; LUC DE SMET, Genomic rearrangements of the *GREM1-FMN1* locus cause oligosyndactyly, radio-ulnar synostosis, hearing loss, renal defects syndrome and Cenani -Lenz-like non-syndromic oligosyndactyly. **Journal Medicine Genetics**, London, v.47, p.569-574, 2010.

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

EDWARDS, M.D.; STUBER, C.W.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. **Genetics**, Baltimore, v.116, p.113-125, 1987.

ELLEGREN, H. The avian genome uncovered. **Trends in Ecology and Evolution**, v.20, p.180-186, 2005.

ERIKSSON, J. Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken. **PLoS Genetics**, San Franscisco, v.4, p.1-8, 2008.

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

FAO – **Food and Agriculture Organization of the United Nations** (2009). Disponível em: < <http://www.fao.org/>>. Acesso em set. 2010.

FDA - **Food and Drug Administration** (2009). Disponível em: <<http://www.fda.gov/>>. Acesso em: Nov. 2009.

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

FIGUEIREDO, E.A.P.; ROSA, P.S.; SCHEUERMANN, G.N. 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. 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.

FILLON, V. The chicken as a model to study microchromosomes in birds: a review. **Genetics, Selection and Evolution**, Les Ulis, v.30, p.209-219, 1998.

FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO. **Anualpec 2010**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo, 2010. 400p.

FUMIHITO, A. One subspecies of the Red Jungle Fowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, p.12505-12509, 1994.

GAO, Y.; DU, Z.Q.; WEI, W.H. Mapping quantitative trait loci regulating chicken body composition traits. **Animal Genetics**, Oxford, v.40, p.952-954, 2009.

Gene Ontology. Disponível em: <<http://www.geneontology.org/>>. Acesso em set 2010.

GEORGES, M. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v.8, p.131-162, 2007.

GIRARD-SANTOSUOSSO, O.; BUMSTEAD, N.; LANTIER, I. Partial conservation of the mammalian (NRAMP1) syntenic group on chicken chromosome 7, **Mammalian Genome**, Cambridge, v.8, p.614-616, 1997.

GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **Documentation for CRI-MAP**, Version 2.4. 1990. Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA. Disponível em: <<http://linkage.rockefeller.edu/soft/crimap/>> Acesso em: maio 2010.

GROENEN, M.A.M.; CHENG, H.H.; BUMSTEAD, N. A consensus linkage map of chicken genome. **Genome Research**, Cambridge, v.10, p.137-147, 2000.

GROENEN, M.A.M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VEENENDAAL, A. . QTL mapping in chicken using a three generation full sib family structure of an extreme broiler X broiler cross. **Animal Biotechnology**, Urbana, v.8, p.41-46, 1997.

GROENEN, M.A.M.; CROOIJMANS, R.P.M.A.; VEENENDAAL, A.. A comprehensive microsatellite linkage map of the chicken genome. **Genomics**, San Diego, v.49, p.265-274, 1998.

GROENEN, M.A.M.; WAHLBERG, PER; FOGGIO, M. 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.

HACKETT, C.A.; BROADFOOT, L.B. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. **Heredity**, London, v.90, p.33-38, 2003.

HALEY, C.S; KNOTT, S.A.; ELSEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, Baltimore, v.136, p.1195-1207, 1994.

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**, Savoy, v.82, p.1509–1518, 2003b.

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**, Savoy, v.82, p.1500–1508, 2003a.

HEIFETZ, E.M; FULTON, L.E.; O'SULLIVAN, N. P. Mapping QTL affecting resistance to Marek's disease in an F6 advanced intercross population of commercial layer chickens. **BMC Genomics**, London, v.10, p.20, 2009.

HILLEL, J. Map-based quantitative trait locus identification. **Poultry Science**, Savoy, v.76, p.1115-1120, 1997.

HILLIER; L.W. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, London, v.432, p.695-716, 2004.

HOCKING, P.M. Review of QTL mapping results in chickens. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v.61, p.215-226, 2005.

HONKATUKIA, M.; TUISKULA-HAAVISTO, M.; DE KONING, D.J. et al. A region on chicken chromosome 2 affects both egg white thinning and egg weight. **Genetics Selection Evolution**, Les Ulis, v.37, p.563-577, 2005.

HU, J.; BUMSTEAD, N.; BURKE, D. Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMPI) in chicken, **Mammalian Genome**, Cambridge, v.6, p.809-815, 1995.

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. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. **Animal Genetics**, Oxford, v.33, p.428-435, 2002.

IKEOBI, C.O.N.; WOOLLIAMS, J.A.; MORRICE, D.R. Quantitative trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Science**, Oxford, v.87, p.143-151, 2004.

Ingenuity Pathway Analysis[®]. Disponível em: <<http://www.ingenuity.com>>. Acesso em: set.2010.

JACOBSSON, L.; PARK, H.B.; WAHLBERG, P. Many QTLs with minor additive effects are associated with a large difference in growth between two selection lines in chickens. **Genetical Research**, New York, v.6, p.115-125, 2005.

JALVING, R.; VAN`t SLOT, R.; VAN OOST, B.A. Chicken single nucleotide polymorphism identification and selection for genetic mapping. **Poultry Science**, Savoy, v.83, p.1925-1931, 2004.

JANSEN, R.C.; STAM, P. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics**, Baltimore, v.136, p.1447-1455, 1994.

JIANG, L.; XUN, M.M.; WANG, H.K. QTL analysis of cold tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.) using recombination inbred lines. **Journal of Cereal Science**, Maryland Heights, v.48, p.173-179, 2008.

JIANG; C.; ZENG, Z.B. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.140, p.1111-1127, 1995.

JONES, S. Mini-Review: Endocrine Actions of Fibroblast Growth Factor 19. **Molecular Pharmaceutics**, Washington, v.5, p.42-48, 2007.

JORGE, E.C.; FIGUEIRA, A.; LEDUR, M.C. Contribution and perspectives of chicken genomics in Brazil: from biological model to export commodity. **Word's Poultry Science**, Cambridge, v.63, p.597-610, 2007.

JULIAN, R.J. Rapid Growth Problems: Ascites and Skeletal Deformities in Broilers. **Poultry Science**, Savoy, v.77, p.1773-1780, 1998.

KAISER, M.G; YONASH, N.; CAHANER, A. Microsatellite polymorphism between and within broiler population. **Poultry Science**, Savoy, v.79, p.626-628, 2000.

KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; General formulae for obtaining the MLEs and the asymptotic variance-covariance matrix in mapping quantitative trait loci when using the EM algorithm. **Biometrics**, Oxford, v.53, p.653-665, 1997.

KAO, C.H.; ZENG, Z.B.; TEASDALE, R. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.152, p.1023-1216, 1999.

KATOH, M.; KATOH, M. Identification and characterization of the human *FMN1* gene in silico. **International Journal of Molecular Medicine**, Boston, v.14, p.121-126, 2004.

KERJE, S.; CARLBORG, O.; JACOBSSON, L. The twofold difference in adult size between the Red jungle Fowl and White Leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. **Animal Genetics**, Oxford, v.34, p.264-274, 2003.

KHATIB, H.; DARVASI, A.; PLOTSKI, Y. Determining relative microsatellite allele frequencies in pooled DNAsamples. **PCR Method. Applied**, Totowa, v.4, p.13-18, 1994.

KHATIB, H.; GENISLAV, E.; CRITTENDEN, L.B. . Sequence-tagged microsatellite sites as markers in chicken reference and resource populations. **Animal Genetics**, Oxford, v.24, p.355–362, 1993.

KLEIN, S. Genetic and physical mapping of the chicken igf-i gene to chromosome 1 and conservation of synteny with other vertebrate genomes. **Journal of Heredity**, Cary, v.87, p.10-14, 1996.

KNOTT, S.A.; MARKLUND, L.; HALEY, C.A.S. Multiple marker of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and large white pigs. **Genetics**, Baltimore, v.149, p. 1069-1080, 1998.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distance from recombination values. **Annals of Eugenics**, New York, v.12, p.172-175, 1944.

KUROSE, H.; BITO, T.; ADACHI, T.. Expression of fibroblast growth factor 19 (*Fgf19*) during chicken embryogenesis and eye development, compared with *Fgf15* expression in the mouse. **Gene Expression Patterns**, London, v.4, p.687-693, 2004.

LAGARRIGUE, S.; PITEL, F.; ROY, P.L. Mapping quantitative trait loci affecting fatness and breast muscle weight in meat-type chicken lines divergently selected on abdominal fatness. **Genetics, Selection and Evolution**, Les Ulis, v.38, p.85-97, 2006.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, Baltimore, v.121, p.185-199, 1989.

LANZA, M.A.; GUIMARAES, C.T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.21, p.97-108, 2000.

LE MIGNON, G; PITEL, F; GILBERT, H. A comprehensive analysis of QTL for abdominal fat and breast muscle weights on chicken chromosome 5 using a multivariate approach. **Animal Genetics**, Oxford, v.40, p.157-164, 2009.

LEIPOLD, H.W.; DENNIS, S.M.; HUSTON, K. Syndactyly in cattle. **Veterinary Bulletin**, Purdue, v.43, p.399-403, 1973.

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

LI, H.; DEEB, N.; ZHOU, H. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with transforming growth factor-beta genes. **Poultry Science**, Savoy, v.82, p.347-356, 2003.

LI, H.; DEEB, N.; ZHOU, H. Chicken quantitative trait loci for growth and body composition associated with the very low density apolipoprotein-II gene. **Poultry Science**, Savoy, v.84, p.697-703, 2005.

LI, Y.L.; DONG, Y.B.; NIU, S.Z. QTL for popping characteristics in popcorn. **Plant Breeding**, Bonn, v.126, p.509-514, 2007a.

LI, Y.L.; DONG, Y.B.; NIU, S.Z. The genetic relationship among plant-height traits found using multiple-trait QTL mapping of a dent corn and popcorn cross. **Genome**, Cambridge, v.50, p.357-364, 2007b.

LI, Y.L.; NIU, S.Z.; DONG, Y.B. Identification of trait-improving quantitative trait loci for grain yield components from a dent corn inbred line in an advanced backcross BC₂F₂ population and comparison with its F_{2:3} population in popcorn. **Theoretical and Applied Genetics**, Ottawa, v.115, p.129-140, 2007c.

LI, Y.L.; WANG, Y.Z.; WEI, M.G. QTL identification of grain protein concentration and its genetic correlation with starch concentration and grain weight using two populations in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Genetics**, Baltimore, v.88, p.61-67, 2009.

LI, Z.K.; YU, S.B.; LAFITTE, H.R. QTL x environment interactions in rice. I. Heading date and plant height. **Theoretical and Applied Genetics**, Ottawa, v.108, p.141-153, 2003.

LIMA, M.D.A.; SOUZA JÚNIOR, C.L.; BENTO, D.A.V. Mapping QTL for grain yield and plant traits in a tropical maize population. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.17, p.227-239, 2006.

LIPKIN, E.; FULTON, J.; CHENG, H. Quantitative trait locus mapping in chickens by selective DNA pooling with dinucleotide microsatellite markers by using purified DNA and fresh or frozen red blood cells as applied to marker-assisted selection. **Poultry Science**, Savoy, v.81, p.283-292, 2002.

LIU, B.H. **Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998. 980p.

LIU, Y.P.; WU, G.S.; YAO, Y.G. Multiple maternal origins of chickens: out of Asian jungles. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Les Ulis, v.38, p.12-19, 2006.

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

MacARTHUR, J.D. Linkage groups in tomato. **Journal of Genetics**, Baltimore, v.29, p.123-133, 1934.

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

MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F.; SAMBROOK, J. **Molecular cloning**. New York; Cold Spring, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1982.p.110-240.

Map Viewer (NCBI). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview>>. Acesso em: ago.2010.

MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.E.B.. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, Malden, v.7, p.639-655, 1998.

McELROY, J.P.; DEKKERS, J.C.; FULTON, J.E. Microsatellite markers associated with resistance to Marek's disease in commercial layer chickens. **Poultry Science**, Savoy, v.84, p.1678-1688, 2005.

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**, Savoy, v.85, p.593-605, 2006.

McPHERSON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Baltimore, v.94, p.12457-12461, 1997.

McPHERSON, J.D. Proposal to sequence the genome of the chicken, 2002. Disponível em: <http://genomeold.wustl.edu/projects/chicken/Chicken_Genome.pdf>. Acesso em: ago. 2010.

MEI, D.S., WANG, H.Z., HU, Q. QTL analysis on plant height and flowering time in *Brassica napus*. **Plant Breeding**, Bonn, v.128, p.458-465, 2009.

MONTEROS, M.J.; BURTON, J.W.; BOERMA, H.R. Molecular mapping and confirmation of QTLs associated with oleic acid content in N00-3350 soybean. **Crop Science**, Madison, v.48, p.2223-2234, 2008.

MOORE, R.J.; DORAN, T.J.; WISE, T.G. Chicken functional genomics: an overview. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v.45, p.749-756, 2005.

MORGAN, T.H. Sex-linked inheritance in *Drosophila*. **Science**, Washington, v.32, p.120-122, 1910.

MUCHOW, R.C.; SINCLAIR, T.R.; BENNETT, J.M. Temperature and solar effect of high on grain-growth in field-grown maize. **Field Crops Research**, Warwick, v.23, p.145-158, 1990.

NADAF, J.; GILBERT, H.; PITEL, F. 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, p.155, 2007.

NADAF, J.; PITEL, F.; GILBERT, H. QTL for several metabolic traits map to loci controlling growth and body composition in an F2 intercross between high- and low-growth chicken lines. **Physiological Genomics**, Bethesda, v.38, p.241-249, 2009.

NAVARRO, P.; VISSCHER, P.M.; KNOTT, S.A. Mapping of quantitative trait loci affecting organ weights and blood variables in a broiler layer cross. **Poultry Science**, Savoy, v.46, p.430-442, 2005.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

NIE, Q.H. Single nucleotide polymorphism and its use in chicken QTL mapping. **Yi Chuan**, Tóquio, v. 25, p.729-734, 2003.

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. 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. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, Oxford, v.37, p.95-100, 2006.

OTT, J. Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. **The American Journal of Human genetics**, Boston, v.51, p.283-290, 1992.

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

PARK, H.B.; JACOBSSON, L.; WAHLBERG, P. QTL analysis of body composition and metabolic traits in an intercross between chicken lines divergently selected for growth. **Physiological Genomics**, Bethesda, v.25, p.216-223, 2006.

PATERSON, A.H.; TANKSLEY, S.D.; SORRELLS, M.E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.46, p.39-89, 1991.

PINARD-VAN DER LAAN, M.H., BED'HOM, B., COVILLE, J.L. Microsatellite mapping of QTLs affecting resistance to coccidiosis (*Eimeria tenella*) in a Fayoumi x White Leghorn cross. **BMC Genomics**, London, v10, p.55-79, 2009.

PRASANNA, B.M.; BEIKI, A.H.; SEKHAR, J.C. Mapping QTLs for component traits influencing drought stress tolerance of maize (*Zea mays* L.) in India. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v.18, p.151-160, 2009.

QU, S., NISWENDER KD, JI Q. Polydactyly and ectopic ZPA formation in *Alx-4* mutant mice. **Development**, Chicago, v.124, p.3999-4008, 1997.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. (2009) **R: a language and environment for statistical computing**. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em: maio 2009.

RABIE, T.S.; CROOIJMANS, R.P.; BOVENHUIS, H. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility in chicken to develop pulmonary hypertension syndrome. **Animal Genetics**, Oxford, v.36, p.468-476, 2005.

REDDISH, J.M.; LIPBURN, M.S. A comparison of growth and development patterns in diverse genotypes of broilers. 1. Male broiler growth. **Poultry Science**, Savy, v.83, p.1067-1071, 2004.

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

RIBAUT, J.M., JIANG, C.; GONZÁLEZ DE LÉON, D.. Identification of quantitative trait loci under drought condition in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. **Theoretical and Applied Genetics**, Ottawa, v.94, p.887-896, 1997.

RIBAUT, J.M.; FRACHEBOND, Y.; MONNEVEUX, P. Quantitative trait loci for yield and correlated traits under high and low soil nitrogen conditions in tropical maize. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v.20, p. 15-29, 2007.

RICK, C.M.; YODER, J.I. Classical and molecular genetics of tomato highlights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.22, p.281-300, 1988.

ROSÁRIO, M.F. **Arquitetura genética de características quantitativas associadas ao desempenho e ao rendimento de carcaça na galinha doméstica**. 2007. 98p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

ROSÁRIO, M.F.; MARGARIDO, G.R.A.; BOSCHIERO, C. . 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. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v.9, p.1357-1376, 2010.

ROTHSCHILD, M.F.; SOLLER, M. Candidate analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, Ontario, v.8, p.13-19, 1997.

ROWE, S.J.; PONG-WONG, R.; HALEY, C.S. Detecting parent of origin and dominant QTL in a two-generation commercial poultry pedigree using variance component methodology. **Genetic, Selection and Evolution**, Les Ulis, v.41, p.6, 2009.

ROWE, S.J.; WINDSOR, D.; HALEY, C.S. QTL analysis of body weight and conformation score in commercial broiler chickens using variance component and half-sib analyses. **Animal Genetics**, Oxford, v.37, p.269-272, 2006.

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.

RUYTER-SPIRA, C.P.; GU, Z.L.; VAN DER POEL, J.J. Bulked segregant analysis using microsatellites: Mapping of the dominant white locus in the chicken. **Poultry Science**, Savoy, v.76, p.386-391, 1997.

SAKAMOTO, H.; OCHIYA, T.; SATO, Y. Adenovirus-mediated transfer of the HST-1 (*FGF4*) gene induces increased levels of platelet count in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Seattle, v.91, p.12368-12372, 1994.

SALES, M.N.G. **As origens da galinha doméstica e a história de sua relação com as sociedades humanas**. 2006. Disponível em: <[HTTP://sistema.assesoar.org.br/arquivos/TAP000301.htm](http://sistema.assesoar.org.br/arquivos/TAP000301.htm)>. Acesso em: set.2010.

SAS Institute SAS/STAT User's Guide, Version 9.13, Cary:SAS Institute ,2007.

SASAKI, O.; ODAWARA, S.; TAKAHASHI, H. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting body weight, egg character and egg production in F2 intercross chickens. **Animal Genetics**, Oxford, v. 35, p. 188-194, 2004.

SAX, K. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. **Genetics**, Baltimore, v.8, p.552-560, 1923.

SCHMID, M.; NANDA, I.; HOEHN, H. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.109, p.415-479, 2005.

- SCHÖN, C.C.; MELCHINGER, A.E.; BOPPENMAIER, J. et al. Mapping in maize: Quantitative trait loci affecting testcross performance of elite European flint lines. **Crop Science**, Madison, v.34, p.378-389, 1994.
- SCHUSTER, I.; CRUZ, C.D. **Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados**. Viçosa: UFV. 2004. 568p.
- SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Annals of Statistics**, Hayward, v.6, p.461-464, 1978.
- SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **Ann Stat**, Savoy, v.6, p.461-464, 1978.
- SEATON, G.; HALEY, C.S.; KNOTT, S.A. . QTL EXPRESS: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, Oxford, v.18, p.339-340, 2002.
- SENTHILVEL, S.; VINOD, K.K.; MALARVIZHI, P. QTL and QTL x environment effects on agronomic and nitrogen acquisition traits in rice. **Journal of Integrative Plant Biology**, Oxford, v.50, p.1108-1117, 2008.
- SEWALEM, A.; MORRICE, D.M.; LAW, A. Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six, and nine weeks of age in a broiler layer cross. **Poultry Science**, Savoy, v.81, p.1775-1781, 2002.
- SHARMAN, P.W.A.; MORRICE, D.R.; LAW, A.S. Quantitative trait loci for bone traits segregating independently of those for growth in an F2 broiler x layer cross. **Cytogenetic and Genome Research**, Würzburg, v.117, p.296-304, 2007.
- SHORT, T.H.; ECKARDT, G.R.; SASAKI, S.. Marker assisted selection for litter size in pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.73, p.109 (abstr), 1995.
- SHORT, T.H.; ROTHSCHILD, M.F.; SOUTHWOOD, O.I. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.75, p.3138-3142, 1997.
- SIEGEL, P.B.; DODGSON, J.B.; ANDERSSON, L. Progress from chicken genetics to the chicken genome. **Poultry Science**, Savoy, v. 85, p. 2050-2060, 2006.
- SMITH, E.; POURQUIÉ, O.; BURT, D.W. Poultry genomics puts meat on the table. **Comparative and Functional Genomics**, New York, v.6, p.311-314, 2005.
- TAKAHASHI M, TAMURA K, BUSCHER D. . The role of *A/x-4* in the establishment of anteroposterior polarity during vertebrate limb development. **Development**, Boston, v.125, p.4417-4425, 1998.
- TANKSLEY, S.D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v.27, p.205-233, 1993.

TATSUDA, K.; FUJINAKA, K. Genetic mapping of the QTL: affecting body weight in chickens using a F₂ family. **British Poultry Science**, Hants, v. 42, p.333-337, 2001.

TERCIC, D.; HOLCMAN, A.; DOVC, P.. Identification of chromosomal regions associated with growth and carcass traits in an F(3) full sib intercross line originating from a cross of chicken lines divergently selected on body weight. **Animal Genetics**, Oxford, v.40, p.743-748, 2009.

THODAY, J.M. Location of polygenes. **Nature**, London, v.191, p.368-370, 1961.

TUISKULA-HAAVISTO, M.; HONKATUKIA, M.; VIKKI, J.. Mapping of quantitative trait loci affecting quality and production traits in eggs layers. **Poultry Science**, Savoy, v.81, p.919-927, 2002.

UEMOTO, Y; SATO, S; ODAWARA, S; Genetic mapping of quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in F₂ intercross chickens. **Poultry Science**, Savoy, v.88, p.477-482, 2009.

UniSTS. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists>>. Acesso em: maio 2010.

USDA – United States Department of Agriculture. **Meat, livestock, poultry, and eggs analysis**. Disponível em :<http://www.fas.usda.gov/dlp/livestock_poultry.asp> Acesso em: set, 2010.

VALLEJO, R.L.; BACON, L.D.; LIU, H.C.; Genetic mapping of quantitative trait loci affecting susceptibility to Marek's disease virus induced tumors in F₂ intercross chickens. **Genetics**, Baltimore, v.148, p.349-360, 1998.

VAN DER BEEK; VAN ARENDONK, J.A.M.; GROEN, A.F. Power of two and three-generation QTL, mapping experimental in an outbred population containing full-sib or half-sib families. **Theoretical and Applied Genetics**. Ottawa, v.91, p.1115-1124, 1995.

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

VAN KAAM, J.B.C.H.M.; GROENEN, M.A.M.; BOVENHUIS, H. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting carcass traits. **Poultry Science**, Savoy, v.78, p.1091-1099, 1999b.

VAN KAAM, J.B.C.H.M.; VAN ARENDONK, J.A.M.; GROENEN, M.A.M. Whole genome scan in chickens for quantitative trait loci affecting body weight in chickens using a three generation design. **Livestock Production Science**, Oxford, v.54, p.133-150, 1998.

VANHALA, T.; TUISKULA-HAAVISTO, M; ELO, K. Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. **Poultry Science**, Savoy, v.77, p.783-790, 1998.

- VELDBOOM, L.R.; LEE, M. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and non stress environments: I. Grain yield and yield components. **Crop Science**, Madson, v.36, p.1310-1319, 1996a.
- VELDBOOM, L.R.; LEE M. Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: II. Plant height and flowering. **Crop Science**, Madson, v.36, p.1320-1327, 1996b.
- VISSCHER, P.M.; THOMPSON, R.; HALLEY, C.S. Confidence intervals for QTL locations using bootstrapping. **Genetics**, Baltimore, v.143, p. 1013-1020, 1996.
- VOORRIPS, R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, Cary, v.93, p.77-78, 2002.
- WAHLBERG, PER; CARLBORG, O.; FOGGIO, M.; Genetic analysis of an F₂ intercross between two chicken lines divergently selected for body-weight. **BMC Genomics**, London, v.10, p.35-49, 2009.
- WARDECKA, B.; OLSZEWSKI, R.; JASZCZAK, K. et al. Relationship between microsatellite marker alleles on chromosome 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, p.319-329, 2002.
- WEI, M.G.; LI, X.H.; LI, J.Z. et al. QTL detection for stover yield and quality traits using two connected populations in high-oil maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.47, p.886-894, 2009.
- WEIR, B. **Genetic data analysis II**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 445p.
- WELLER, J.L. **Quantitative trait loci analysis in animals**. New York: CABI Publishing. 2001. 287p.
- WILLIAM, D.B. QTL analysis: power, precision and accuracy. In: PATERSON, A.H. **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press, 1998. p.145-162
- WÖHLKE, A.; KUIPER, H.; DISTL, O. The bovine aristaless-like homeobox 4 (*ALX4*) as a candidate gene for syndactyly. **Cytogenetic Genome Research**, Würzburg, v.115, p.123-128, 2006.
- WONG G.K.; LIU, B.; WANG, J.A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. **Nature**, London, v.432, p.717-722, 2004.
- WU, Y.Q.; BADANO, J.L; MCCASKILL, C. Haploinsufficiency of *ALX4* as a potential cause of parietal foramina in the 11p11.2 contiguous gene-deletion syndrome. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 67, p.1327-1332, 2000.

XU S. QTL mapping can benefit from segregation distortion. **Genetics**, Baltimore, v.180, 2201-2208, 2008.

XU, S.; YONASH, N.; VALLEJO, R.L. Mapping quantitative trait loci for binary traits using a heterogenous residual variance model: An application to Marek's disease susceptibility in chickens. **Genetics**, Baltimore, v.104, p.171-178, 1998.

YAMADA, Y. The contribution of poltry science to society. **Word`s Poultry Science**, Cambridge, v.44, p.172-178, 1998.

YONASH, N.; BACON, L.D.; WITTER, R.L. High resolution mapping and identification of new quantitative trait loci (QTL) affecting susceptibility to Marek's disease. **Animal Genetics**, Oxford, v.30, p.126-135, 1999.

YONASH, N.; CHENG, H.H.; HILLEL, J. . DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. **Poultry Science**, Savoy, v.80, p.22-28, 2001.

YOSHIDA, T.; ISHIMARU, K.; SAKAMOTO, H. Angiogenic activity of the recombinant hst-1 protein. **Cancer Letters**, Heidelberg, v.83, p.261–268, 1994.

ZENG, Z.B. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics**, Baltimore, v.136: p.1457-1468, 1994.

ZENG, Z.B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America**, New York, v.90, p.10972-10976, 1993.

ZEREHDARAN, S.; VEREIJKEN, A.L.J.; VAN ARENDONK, J.A.M. Estimation of genetic parameters for fat deposition and carcass traits in broiler. **Poultry Science**, Savoy, v.83, p.521-525, 2004.

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M. et al. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. I Growth and average daily gain. **Poultry Science**, Savoy, v.85, p.1700-1711, 2006a.

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

ZHU, J.; KAEPLER, S.M.; LYNCH, J.P. Mapping of QTLs for lateral root branching and length in maize (*Zea mays L.*) under differenetial phosphorus supply. **Theoretical and Applied genetics**, Berlin, v.111, p.688-695, 2005.

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

ZHU, J.J; LILLEHOJ, H.S.; ALLEN, P.C. Mapping quantitative trait loci associated with resistance to coccidiosis and growth. **Poultry Science**, Savoy, v.82, p.9-16, 2003.

ANEXOS

ANEXO A – Protocolo de extração de DNA usando Proteinase K

1. Aquecer as mostras a 37°C. Retirar alíquota de 50 µl do sangue total colhido com EDTA 10%, e adicionar 1 mL de tampão de lise de células vermelhas
2. Centrifugar por um minuto a 1300 rpm. Descartar o sobrenadante. Repetir o passo 1 e 2 uma ou mais vezes, até que o sobrenadante fique claro
3. Lavar o pélete uma vez com 500 µl de água destilada, centrifugar a 1300 rpm por 1 minutos, e depois retirar o sobrenadante
4. Em um *becker* de 50 mL adicionar 80 µl do tampão de proteinase K (5X), 7µl de proteinase K (20 mg/mL), 10 µl de SDS 20% e 283 µl de água destilada (volume total do *mix* de proteinase K = 380 µl). Este volume total é para cada amostra
5. Ressuspender o pélete em 380 µl do *mix* de proteinase K (vortexar ao invés de ressuspender com a ponteira)
6. Incubar a 55°C por uma hora numa placa aquecedora
7. Adicionar 120 µl de NaCl 5M e agitar no vórtex por 15 segundos. Centrifugar a 1300 rpm por 5 minutos
8. Transferir o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL e adicionar 1 mL de etanol absoluto. Homogeneizar e centrifugar por 5 min a 1300 rpm
9. Lavar o pélete com etanol (1 mL) a 95% a 1300 rpm por 5 minutos
10. Descartar o sobrenadante e deixar o pélete secar por uma hora a temperatura ambiente
11. Ressuspender o pélete em 50, 100 ou 150 µl de água ultrapura (dependendo do tamanho do pélete) e agitar no vórtex por 30 segundos
12. Colocar o DNA diluído no bloco aquecedor por 4 a 8 horas a 37°C. Armazenar o DNA no *freezer* a -20° C

Tampão de lise

0,32 M de sucrose

12 mM Tris – HCl pH 7,5

5 mM MgCl₂

1% de Triton X

Tampão de proteinase K (5x)

0,375 M de NaCl

0,12 M EDTA 10% (pH = 8)

ANEXO B – Protocolo de extração de DNA usando *DNAzol*[®] (*Invitrogen Technologies*)

1. Pipetar 5 µl de sangue em EDTA 10% em tubo de 1,5 mL
2. Adicionar 1 mL de *DNAzol*[®]
3. Adicionar mais 250 µl de etanol absoluto e inverter os tubos várias vezes
4. Capturar o DNA com a ponteira da pipeta
5. Descartar o líquido e o voltar o pélete de DNA no mesmo tubo
6. Lavar com 500 µl de etanol 95%, agitando bastante
7. Centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos
8. Descartar o sobrenadante
9. Repetir a lavagem com etanol 95% (passos 6 a 8)
10. Depois de descartar o sobrenadante, secar os tubos por 10 minutos em temperatura ambiente
11. Ressuspender o pélete com 150 µl de água ultrapura