

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**MAPEAMENTO FINO DE QTLS E POLIMORFISMOS DE GENES
CANDIDATOS ASSOCIADOS AO CRESCIMENTO NO
CROMOSSOMO 1 DA GALINHA**

CLARISSA BOSCHIERO

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP
Setembro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**MAPEAMENTO FINO DE QTLS E POLIMORFISMOS DE GENES
CANDIDATOS ASSOCIADOS AO CRESCIMENTO NO
CROMOSSOMO 1 DA GALINHA**

CLARISSA BOSCHIERO

Zootecnista

Orientadora: Profa. Dra. Ana Silvia Alves Meira
Tavares Moura

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia
como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor.

BOTUCATU – SP
Setembro – 2009

**“Quem de três milênios,
Não é capaz de se dar conta
Vive na ignorância, na sombra,
À mercê dos dias, do tempo”**
Johann Wolfgang von Goethe

***"Pensávamos que o nosso futuro estava nas estrelas,
hoje acreditamos que está nos nossos genes"***
James Watson

Dedico

*À minha mãe Célia por todo apoio e por ter me ensinado a lutar sempre,
nunca desanimar e a confiar numa força maior que me orienta
constantemente na minha caminhada terrestre*

Aos animais utilizados nas pesquisas científicas

*A todos os cientistas que, com muita paciência e persistência, acreditam
que podem melhorar o mundo com suas pequenas contribuições*

AGRADECIMENTOS

Especialmente para Profa. Dra. **Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura** pela excelente orientação, paciência, incentivo e pelos valiosos aprendizados.

Prof. Dr. **Luiz Lehmann Coutinho** pelo apoio, confiança e grande aprendizado.

Pesquisadora Dra. **Mônica Corrêa Ledur** pelo constante incentivo e importantes contribuições.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu/UNESP pela oportunidade de realização do doutorado.

Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP) pela oportunidade de realização da parte prática do estudo.

EMBRAPA Suínos e Aves pela participação no projeto Genômica da Galinha e utilização da população experimental de galinhas.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro ao projeto.

Prof. Dra. **Monica Regina Vendrame Amarante** pelas sugestões importantes no Exame de Qualificação.

Especialmente ao Dr. **Millor Fernandes do Rosário** pelas inúmeras contribuições: mapeamento de QTLs, suporte estatístico, redação de artigos, sugestões no Exame de Qualificação, incentivo e amizade.

Dra. **Kátia Nones** por ceder os resultados de mapeamento de QTLs e sugestões.

Kerli Ninov pela ajuda com os seqüenciamentos, análise de polimorfismos, utilização do equipamento PCR em Tempo Real e amizade nestes anos.

Dra. **Erika Cristina Jorge** pelas orientações com o desenho dos *primers*, escolha dos genes, bioinformática e valiosas contribuições.

Nirlei Aparecida Silva pela ajuda com os seqüenciamentos, purificações e demais orientações laboratoriais.

Dra. **Priscilla Marqui Schmidt Villela** pela ajuda com os protocolos de purificação.

Carla dos Anjos de Souza e Minos Esperandio Carvalho pelas contribuições sobre as sondas.

Jorge Luis Ferreira de Andrade pelo apoio computacional e laboratorial.

Andrezza Maria Felício pelos inúmeros artigos e amizade.

Aos demais amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ/USP), pela agradável convivência e aprendizado constante: **Ana Paula, Aurea, Fernandas, Helena, Gustavo, Heloíse, Karina, Lilian, Marcelo, Marli e Taiane**.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação (FMVZ/UNESP): **Seila Cristina Cassineli Viera e Danilo Juarez Teodoro Dias** pelos auxílios prestados.

Especialmente ao meu pai, queridas irmãs, André, Maria do Carmo, Giuliana, Gabriela, Mônica e demais amigos que contribuíram de alguma forma ou em algum momento para realização deste doutorado e qualquer agradecimento aqui seria pouco.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	2
Galinha doméstica: importância produtiva e biológica.....	2
Produção avícola: contexto mundial e nacional.....	4
Genoma da galinha.....	6
Genética molecular: do QTL ao gene	7
Locos de características quantitativas (QTLs)	8
Mapeamento fino de QTLs	13
Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP).....	16
Genes candidatos.....	19
Gene do <i>fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1)</i>	21
Gene <i>Jumonji, Domínio interativo 1A rico em AT (JARID1A)</i>	24
População experimental da EMBRAPA	25
Referências Bibliográficas	28
CAPÍTULO 2.....	40
Mapeamento fino de uma região associada a QTLs no cromossomo 1 da galinha	41
Resumo.....	42
Abstract	43
Introdução	44
Material e Métodos	46
Resultados	55
Discussão	64
Referências Bibliográficas	71
CAPÍTULO 3.....	76
Polimorfismos nos genes <i>IGF1</i> e <i>JARID1A</i> e associação com características de crescimento da galinha.....	77
RESUMO	77
ABSTRACT	78
Introdução	79
Material e Métodos	80
Resultados e Discussão	86
Conclusões	102
Referências Bibliográficas	103
CAPÍTULO 4.....	106
IMPLICAÇÕES	107
ANEXOS	108

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Galinha doméstica: importância produtiva e biológica

A galinha doméstica tem uma notável importância na produção de alimentos, sendo considerada por muitos cientistas, como o mais importante animal de produção do mundo. É também um modelo biológico útil para estudos científicos, além de ser o primeiro animal de produção a ter seu genoma seqüenciado.

A maioria dos cientistas concorda que as galinhas comerciais atuais descenderam da espécie *Red Junglefowl*, origem de todas as raças domésticas (Fumihito et al., 1994). Existem quatro espécies de *Junglefowl*: *Red Junglefowl* (*Gallus gallus*), *Grey Junglefowl* (*Gallus sonneratii*), *Green Junglefowl* (*Gallus varius*) e *Ceylon Junglefowl* (*Gallus lafayetii*). Estudos de Eriksson et al. (2008), sugerem que a galinha doméstica é um híbrido e pode ter se originado do cruzamento da *Red Junglefowl* com a *Grey Junglefowl*. Estes autores analisaram o gene responsável pela cor amarelada da pele das pernas das aves (gene *yellow skin*) e verificaram que este não se origina da *Red Junglefowl*, mas está mais relacionado com a *Grey Junglefowl*, espécie originária da Índia.

Segundo Al-Nasser et al. (2007), as galinhas são as aves mais populares do mundo, independente da cultura ou religião. Isso porque os produtos avícolas têm alto valor nutricional, sendo a carne e os ovos destes animais, de grande importância como fonte protéica para consumidores em todos os países. Segundo Jorge et al. (2007), a carne de frango é uma das mais importantes fontes de proteínas 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). Além disso, está associada ao conceito de carne saudável, branca e magra, quando comparada com as carnes vermelhas.

Características simples ou monogênicas já foram bem estudadas, porém muitas das características complexas, determinadas por um desconhecido número de genes, ainda necessitam de maior compreensão (Wong et al., 2004). Na produção animal, as pesquisas têm focado estas características complexas, como crescimento, qualidade da carne e produção de ovos. Programas de melhoramento têm selecionado estas

características, resultando no frango moderno (linhagens de corte) ou nas poedeiras (linhagens de postura). Mais recentemente, outras características, como resistência a doenças e comportamento têm recebido maior atenção (Burt, 2004).

Segundo Burt (2004), nenhuma outra espécie animal tem sido selecionada tão intensamente para produção como a galinha. São também ideais para estudos de embriologia e filogenética, com aplicações na agricultura, biologia fundamental e medicina (Burt, 2007). A galinha é um importante modelo biológico para estudos de desenvolvimento, fisiologia, virologia, oncogênese, imunologia, evolução, genética e biologia celular (Wolpert, 2004; Ellegren, 2005; Stern, 2005).

Segundo Siegel et al. (2006) a galinha tem muitos méritos como modelo para o entendimento biológico: (1) Rica diversidade genética; (2) Muitos anos de seleção geraram uma variedade fenotípica nas raças ou nas linhagens, selecionadas para diferentes finalidades; (3) Grande tamanho da população: a população mundial é 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 nunca será transmitida para a próxima geração, porém algumas irão permanecer através da seleção e contribuirão para a diversidade genética; (4) Fácil reprodução: um fator crucial em estudos genéticos das características complexas é ter acesso aos dados de várias gerações para gerar maior poder estatístico; no caso das galinhas, as gerações são obtidas em curto espaço de tempo em relação a outros animais de produção, como por exemplo, os bovinos; (5) Alta taxa de recombinação: as galinhas apresentam alta taxa de recombinação comparadas com mamíferos, é estimada em 2,8 cM/Mb para os macrocromossomos e 6,4 cM/Mb para os microcromossomos. Em humanos, esta taxa é cerca de 1 cM/Mb e 0,5 cM/Mb em camundongos. Esta alta taxa traz vantagens nos estudos de mapeamento, porque a precisão de localização de um gene é determinada pela observação de eventos de recombinação; (6) É o principal modelo para todas as espécies de aves e muito útil em estudos genômicos comparativos com outras espécies.

Produção avícola: contexto mundial e nacional

O desenvolvimento da indústria avícola tem menos de um século e se deve ao progresso científico alcançado no melhoramento genético, nutrição, controle de doenças, instalações, manejo e, mais recentemente, da genética molecular. A seleção artificial, dentre outras tecnologias, foi utilizada para melhorar o desempenho nas características de produção (Al-Nasser et al., 2007).

A agroindústria do frango no Brasil é um exemplo de competitividade no mercado mundial pela alta tecnologia e produtividade, baixo custo de produção e uma estratégia de integração com os produtores. Nas últimas décadas, o avanço tecnológico em diversas áreas permitiu melhorar significativamente os principais índices zootécnicos como o peso vivo, conversão alimentar, idade de abate e mortalidade. A soja e o milho, principais matérias-primas das rações avícolas, também tiveram incrementos de produtividade (Avisite, 2008). Além disso, estima-se a geração de 3,8 milhões de empregos na cadeia produtiva no país (ABEF, 2008).

Desde 2004, o Brasil tornou-se o maior exportador mundial de carne de frango, permanecendo na liderança até os dias atuais (Avisite, 2008). Em 2008, a carne de frango *in natura* tornou-se o sexto principal produto exportado pelo Brasil (Avicultura Industrial, 2009). As exportações brasileiras renderam, até maio de 2009, 1,793 bilhão de dólares. O valor considera apenas o produto *in natura*. O resultado obtido correspondeu a uma redução de 20,5% sobre o mesmo período de 2008, o que não impediu que a participação da carne de frango *in natura* na pauta exportadora apresentasse ligeiro acréscimo de 3,1% para 3,2%. Porém, a redução na receita não se restringe à carne de frango, é um fato generalizado por conta dos efeitos da crise financeira internacional. Tanto que, nos cinco meses avaliados, a receita brasileira com as exportações recuou 23%, índice superior ao retrocesso observado com as vendas externas de carne de frango (Avisite, 2009).

A avicultura brasileira oferece aos consumidores grande diversidade de produtos que atendem às necessidades de praticidade e conveniência. A carne de frango é a segunda mais consumida no mundo e o Brasil apresenta um dos maiores índices de consumo médio por habitante, que se elevou de 13 para 34 kg entre 1989 e 2004 (AveWorld, 2008). Apesar do aumento de 161% no preço da ave nos últimos 14 anos, o

consumo per capita do produto dobrou no país no mesmo período. Em 2008, o consumo foi de 38,5 kg por habitante. Esse é o quarto maior volume de consumo per capita do mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos (45,1 kg), da Venezuela (39,4 kg) e da Malásia (com 38,7 kg) (UBA, 2009).

No segundo trimestre de 2008 foram abatidos cerca de 1,2 bilhões de frangos no Brasil. O volume aumentou 11,3% em relação ao segundo trimestre de 2007 e 0,4% em relação ao primeiro trimestre de 2008. O abate de frangos, em 2008, foi 11,9% superior ao observado no mesmo período de 2007 (IBGE, 2008). Segundo previsões de Safras & Mercado, o Brasil deve finalizar o ano de 2009 com produção de 10,738 milhões de toneladas de frango, recuando em 2,6% o volume registrado no ano passado, de 11,021 milhões de toneladas (AveWorld, 2009).

Mesmo com a crise financeira mundial, a produção de frango deverá manter a liderança de consumo no mercado interno, conquistada desde 2006, quando comparada com as outras carnes. Entretanto, o setor está preocupado, já que necessita de crédito e pode contar com uma diminuição significativa nas exportações. Embora a crise ainda não tenha afetado diretamente a avicultura, a União Brasileira de Avicultura (UBA) recomendou uma redução no nível de alojamento de pintos de corte, evitando a sobra de produtos e a queda nos preços (UBA, 2009).

O futuro da avicultura no Brasil é promissor porque é o país que possui maior potencial para expandir suas fronteiras agrícolas. Existem 200 milhões de hectares de terras agricultáveis fora de áreas de preservação ou com relevo acidentado (Avicultura Industrial, 2009). Mas muitos serão os desafios da avicultura nacional, como a falta de recursos para o bom funcionamento da estrutura de defesa agropecuária e a deterioração de rodovias, estrutura portuária saturada e falta de crédito, devido a atual crise financeira. A perpetuação da influenza aviária em diversos países ou regiões é praticamente inevitável e deve merecer atenção e cuidados permanentes por parte dos países não afetados (Avisite, 2009). Mesmo reconhecendo a existência de problemas e barreiras de várias naturezas, que impedem o perfeito funcionamento da produção e do mercado, o futuro da avicultura nacional é favorável devido às condições de recursos naturais e humanos disponíveis que devem manter a competitividade internacional do Brasil (AveWorld, 2008).

Genoma da galinha

O termo genoma é utilizado para designar toda a informação genética de um organismo. O estudo do genoma visa ao conhecimento amplo da estrutura e função dos genes. Este estudo em animais é incentivado pela possibilidade de aplicação do conhecimento em finalidades econômicas e também pode ser de grande utilidade em outras áreas das ciências (Ledur et al., 2004). O genoma nuclear contém a maioria das informações genéticas de uma célula num conjunto de cromossomos, cada um composto de uma molécula única de DNA. Genomas de diferentes espécies variam quanto ao tamanho, número de cromossomos, nível de ploidia, taxa de recombinação total e número de genes funcionais (Liu, 1998).

O genoma da galinha tem um conteúdo haplóide de $1,2 \times 10^9$ pares de bases divididos entre 38 cromossomos autossomos e os sexuais W e Z, sendo a fêmea o sexo heterogamético (ZW). É de duas a três vezes menor que o genoma humano e cerca de 40% do tamanho dos mamíferos. Este genoma compacto pode ser explicado parcialmente pelo baixo conteúdo de seqüências repetitivas e também pelos pequenos introns (Dequéant e Pourquié, 2005).

Numa análise genômica comparativa (revisado por Ellegren, 2005), observou-se que o número de genes da galinha é similar ao dos mamíferos. Portanto, a complexidade gênica parece não ser a resposta completa para o tamanho reduzido do genoma. A mais provável explicação é a escassez de elementos repetitivos, apenas 10% do genoma consiste de repetições intercaladas, em contraste com 40 a 50% do genoma de mamíferos. Porém, Davey e Tickle (2007) afirmaram que a galinha tem menor número de genes e pseudogenes que o peixe-zebra, camundongo e homem. Isso não faz dele apenas um bom modelo para a análise, mas também mais simples que o de outras espécies para detectar homologias de desenvolvimento em genes importantes e manipular sua expressão.

A galinha foi o primeiro animal em que a herança mendeliana foi demonstrada (Siegel et al., 2006) e também o primeiro animal doméstico e o primeiro dos não mamíferos a ter seu genoma seqüenciado, finalizado em 2004 pelo *International Chicken Genome Sequencing Consortium* (Hillier et al., 2004), o que representou um ganho monumental para os pesquisadores. Para o seqüenciamento foi escolhida uma

fêmea *Red Junglefowl* de uma linhagem altamente homozigótica, ou seja, com pouca variabilidade genética e conteúdo de polimorfismos. A galinha tem uma crucial posição na árvore filogenética, e o seqüenciamento de seu genoma resultou em novas perspectivas em estudos de evolução e arquitetura genética dos vertebrados (Ellegren, 2005).

Porém, Cogburn et al. (2003) afirmaram que os mecanismos genéticos que governam o crescimento, diferenciação e funções dos sistemas metabólico, somático e reprodutivo nas galinhas são ainda amplamente desconhecidos. A genômica da galinha tem se transformado com a caracterização de grandes coleções de ESTs (etiquetas de seqüências expressas) e, recentemente, com a montagem das seqüências genômicas. O uso de ferramentas genômicas tem auxiliado na descoberta de muitos QTLs (locos controladores de características quantitativas). A galinha é um excelente modelo para investigações da arquitetura genética destes QTLs.

A genética avícola tem uma longa história de realização, tanto na geração de novos conhecimentos, como na demanda global por alimento. O desafio é conseguir a incorporação e implementação destes novos conhecimentos gerados pelas pesquisas genômicas em programas de melhoramento destas aves (Siegel et al., 2006).

Genética molecular: do QTL ao gene

A maioria das características de interesse econômico nas espécies animais é complexa, como as características reprodutivas, de carcaça e desempenho. Nos últimos vinte anos, muitos genes que controlam características mendelianas foram identificados, porém poucos que controlam características complexas, como exemplo, o gene do 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*). Genes que contribuem para as características complexas são mais difíceis de serem identificados, devido aos efeitos de epistasia e pleiotropia, além do limitado poder estatístico. As variações das características complexas podem resultar, mais freqüentemente, de variações nas regiões não-codificadoras do que nas codificadoras. Por isso, não se deve restringir a busca por mutações responsáveis por características complexas apenas às regiões codificadoras. Porém, interpretar o resultado destas

variações nas regiões não-codificadoras é mais complicado porque não existe a relação direta da sequência de DNA e a função da proteína (Glazier et al., 2002).

O melhoramento das características produtivas tem sido feito tradicionalmente pela seleção de fenótipos favoráveis e pode ser facilitado pelos novos conhecimentos genéticos, permitindo a introgressão de alelos favoráveis (Mackay, 2001b). Segundo Glazier et al. (2002), alguns fenótipos são produtos da variação de um único nucleotídeo, outros são causados por múltiplos nucleotídeos em um único gene ou, ainda, por múltiplos nucleotídeos ligados a genes próximos.

O desenvolvimento de técnicas de genética molecular propiciou a utilização de novas ferramentas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização, enzimas de restrição, clonagem, entre outras que contribuíram para a compreensão da variação genética das espécies baseada em informações obtidas diretamente do DNA. Através das técnicas moleculares está sendo possível descobrir mecanismos de expressão gênica, localização de genes ou de regiões cromossômicas responsáveis por características quantitativas. Dessa forma, a seleção poderá ser mais precoce e precisa, fundamentada no genótipo do animal (Zhou et al., 2006).

Locos de características quantitativas (QTLs)

Locos de características quantitativas (QTLs) são segmentos dos cromossomos que controlam uma característica quantitativa, mas não são necessariamente um único loco. A maioria da variação entre indivíduos é quantitativa, seja ela no comportamento, fisiologia, morfologia, susceptibilidade 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 e Mackay, 1996).

O mapeamento de QTLs tornou-se um método rotineiro nos últimos quinze anos, facilitado pela descoberta de marcadores moleculares altamente polimórficos em várias espécies, além do desenvolvimento de métodos estatísticos sofisticados de análises (Mackay, 2004). A identificação de QTLs é o primeiro passo para a caracterização de variações genéticas que ocorrem no DNA. Existem diversos métodos estatísticos disponíveis para mapear QTLs, que são: mapeamento por intervalo,

mapeamento por intervalo composto, mapeamento de múltiplos intervalos e métodos baseados em inferência bayesiana. O mais utilizado é o método por intervalo, desenvolvido por Lander e Botstein (1989), que analisa dois marcadores adjacentes na forma de um intervalo.

Para mapear QTLs é necessária a construção de mapas genéticos e a procura por uma relação entre características quantitativas e marcadores polimórficos (Liu, 1998). Uma associação significativa entre a característica e o marcador pode ser uma evidência de QTL ligado ao marcador. O mapeamento de regiões contendo QTLs envolve a genotipagem de marcadores cobrindo todo o genoma, que podem ser escolhidos a partir de um mapa referência, quando disponível. Os marcadores ideais são os microssatélites, desde que altamente informativos e em intervalos regulares. Outra opção, quando as informações dos mapas são escassas, é a associação de outros marcadores, como os SNPs (polimorfismos de base única) e AFLPs (polimorfismos de comprimento de fragmento amplificado). Quando os microssatélites estão muito distantes um do outro, a única alternativa é a utilização de SNPs (Vignal et al., 2002).

É necessário existir variação fenotípica e genotípica na característica quantitativa de interesse dentro ou entre as linhagens ou populações estudadas (Falconer e Mackay, 1996). Quanto maior a amostra, maiores as chances de mapear QTLs, pois se aumenta o número de eventos de recombinação e mais QTLs são detectáveis. As posições dos QTLs mapeados, bem como seus efeitos, podem variar dependendo da metodologia de análise. Os QTLs podem ter efeitos do meio ambiente, sexo, pleiotropia e as interações epistáticas são também frequentemente encontradas (Mackay, 2001b).

Para o mapeamento de QTLs, geralmente são utilizados animais provenientes de cruzamentos entre linhagens ou raças endogâmicas ou de populações chamadas de segregantes ou exogâmicas, como ocorre na maioria dos animais domésticos. A utilização de linhagens endogâmicas apresenta a vantagem do conhecimento dos genótipos dos parentais, da fase de ligação e do número de alelos do suposto QTL (Silva et al., 2005). Em galinhas, segundo Hocking (2005), o delineamento experimental utilizado é normalmente uma população F_2 , oriunda do cruzamento de duas linhagens com 250 a 700 animais. Os modelos de análise mais utilizados para populações exogâmicas são o F_2 (*line cross*) (Haley et al., 1994) e o de meios-irmãos (*half-sib*) (Knott et al., 1996). A análise de meios-irmãos não faz suposição de fixação

dos alelos do QTL nas linhagens parentais, diferente do modelo de F_2 , em que os alelos estão supostamente fixados. Mas, por outro lado, o modelo de meios-irmãos pressupõe que o pai (para meios-irmãos paternos) ou a mãe (para meios-irmãos maternos) foram acasalados com indivíduos ao acaso da população, o que não é verdadeiro quando se tem grandes famílias de irmãos completos.

Normalmente, um QTL é mapeado num intervalo de cerca de 20 cM, ou seja, com baixa resolução, pois 1 cM equivale a cerca de 1 milhão de pares de bases ou 30 genes em humanos (Liu, 1998), ou 360.000 pares de bases (macro cromossomos) ou 160.000 pb (micro cromossomos) em galinhas (Siegel et al., 2006). Segundo Georges (2007), os intervalos de confiança dos QTLs mapeados são da ordem de 20 a 40 cM, correspondendo, em mamíferos, a aproximadamente 20 a 40 milhões de pares de bases ou 200 a 400 genes.

Existem três problemas principais na resolução do mapeamento de QTLs: (1) Um grande número de eventos de recombinação em cada intervalo de marcadores é necessário para mapear os QTLs e diminuir os intervalos onde eles foram mapeados; (2) QTLs individuais têm pequenos efeitos e são afetados pelo meio ambiente sendo, portanto, o fenótipo de um único indivíduo a não indicação confiável do genótipo de um QTL; (3) Mesmo depois de determinar um intervalo do QTL, a região pode conter muitos genes (Mackay, 2004).

Segundo Weller (2001), o principal problema do mapeamento de QTLs é o tamanho relativamente pequeno das amostras da maioria dos experimentos. Em experimentos empregando menos de 300 animais haverá dificuldade para estimação dos efeitos do QTL, mas, quanto maior o número de animais, melhor será a detecção de QTLs. Na maioria dos casos em que os efeitos do QTL não foram encontrados, o poder de detecção foi muito pequeno para encontrar um QTL com magnitude razoável segregando.

A partir dos mapas de ligação de três populações (*Compton*, *East Lasing* e *Wageningen*), Groenen et al. (2000) construíram o mapa Consenso do genoma da galinha, contendo 1.889 locos distribuídos em 3.800 cM, que foi posteriormente atualizado por Schmid et al. (2000 e 2005), totalizando 4.200 cM com 2.261 locos. Este mapa contendo grande número de informações sobre marcadores é imprescindível para o mapeamento de QTLs em galinhas (Ledur et al., 2004).

Nos últimos dez anos, muitos QTLs têm sido mapeados em galinhas para várias características, incluindo crescimento, produção de ovos, resistência à doenças, composição corporal e comportamento (Abasht et al., 2006). De acordo com Hocking (2005), em galinhas, 114 QTLs significativos foram identificados até 2004, 18 somente no GGA1 (cromossomo 1 da galinha) para características de peso, gordura, resistência a doenças e produção de ovos. O autor notou também que não existiu um padrão de distribuição dos QTLs no genoma, mas que diferentes estudos mapearam QTLs em regiões próximas no GGA1 (250-450 cM). Estes resultados devem ser aprimorados com estudos de mapeamento fino para diminuir as regiões onde foram mapeados os QTLs.

Abasht et al. (2006) realizaram um levantamento em 50 trabalhos de mapeamento de QTLs em galinhas, sendo 21 deles relacionados com características de crescimento e composição corporal. Listaram 697 QTLs mapeados, 114 somente no GGA1. Neste cromossomo existem duas grandes regiões de concentração da maioria dos QTLs: nos intervalos de 60 a 269 cM (57 QTLs mapeados) e de 440 a 545 cM (Figura 1). No banco de QTLs (Animal QTLdb, 2009) existem descritos até o momento 791 QTLs em galinhas, de acordo com 52 publicações. Estes QTLs estão associados com 115 características, sendo 368 relacionados com crescimento. As principais características associadas aos QTLs são: peso vivo (117), gordura abdominal (57) e músculo do peito (25). No GGA1 existem 129 QTLs já descritos neste banco de dados.

Kerje et al. (2003) mapearam QTLs para peso corporal, crescimento em diferentes idades: 1-8, 8-46, 46-112 e 112-200 dias e peso de ovos em galinhas oriundas de um cruzamento entre aves *White Leghorn* e *Red Junglefowl*. Genotiparam 851 animais com 100 microssatélites (15 apenas no GGA1), além de quatro SNPs. Foram mapeados 17 QTLs significativos no GGA1 para todas as características estudadas. Destacaram-se 11 QTLs mapeados no intervalo entre *MCW0010-ADL0019*, sendo um para crescimento de 112-200 dias, que explicou 21,6% de variância fenotípica da característica.

Sewalen et al. (2002) estabeleceram uma população F_2 a partir de cruzamentos entre uma linhagem de corte e uma de postura e utilizaram 101 marcadores microssatélites, dos quais 24 no GGA1 para o mapeamento de QTLs associados ao peso corporal as 3, 6 e 9 semanas de idade. Foram identificados no GGA1: dois QTLs significativos para peso as 3 semanas (*LEI0068-LEI0046* e *ADL0183-ROS0025*), dois

QTLs significativos para peso as 6 semanas (*LEI0146-MCW0018* e *ADL0183-ROS0025*), um QTL significativo para peso as 9 semanas (*LEI0106-LEI0179*) e um QTL sugestivo para peso as 9 semanas (*MCW0010-ADL0188*).

Num estudo correlato, Ikeobi et al. (2002) identificaram QTLs associados ao peso da gordura abdominal, peso da gordura da pele e distribuição de gordura em 442 aves. Foram mapeados dois QTLs no GGA1: um significativo para gordura abdominal (*ADL0188-LEI0068*) e outro sugestivo para gordura da pele entre *ADL0183-ROS0025*. Utilizando a mesma população, Ikeobi et al. (2004) mapearam três QTLs significativos no GGA1 para: peso da sobrecoxa (*MCW0010-ADL0188*), do músculo da sobrecoxa (*LEI0146-LEI0068*) e para peso da coxa e músculo da sobrecoxa (*MCW0010-ADL0188*).

Zhou et al. (2007) analisaram 23 cromossomos com 269 marcadores (37 somente no GGA1) em duas populações geneticamente distintas de galinhas (*Broiler-Leghorn cross* e *Broiler-Fayomi cross*) para o mapeamento de QTLs associados com características metabólicas. Na população *Broiler-Leghorn cross* foram detectados QTLs sugestivos no GGA1 para: *IGF1* (102 cM, *ADL0019-UMA1.100*) e T_4 (tiroxina) (751 cM). Na outra população, *Broiler-Fayomi cross*, foram detectados QTLs significativos para: *IGF1* (543 cM), T_3 (triiodotironina) (72 cM, *MCW10-MCW106*) e $T_3:T_4$ (70 cM, *MCW10-MCW106*).

McElroy et al. (2006) analisaram 430 aves oriundas de um cruzamento de linhagens comerciais de frangos e poedeiras divergentes quanto à porcentagem de carne branca, genotipadas com 73 marcadores, 13 deles no GGA1. Foram mapeados QTLs significativos no GGA1 para: peso de gordura abdominal (168 cM, posição em relação ao mapa Consenso, Schmid et al., 2005) e porcentagem de gordura abdominal (155 cM) e QTLs sugestivos para: peso vivo (226 cM), peso da carcaça (213 cM) e porcentagem de filé (379 cM).

A partir de uma população F_2 compreendendo 240 aves oriundas do cruzamento de uma linhagem japonesa de postura e uma linhagem de corte (*White Plymouth Rock*), Uemoto et al. (2009) utilizaram 240 microsatélites para mapear QTLs. Foram avaliadas as características de: peso vivo (3, 6 e 9 semanas), peso da carcaça, peso da gordura abdominal, peso do peito e peso das coxas. Sete QTLs significativos foram associados

com peso vivo as 9 semanas (GGA1 e 3), ganho de peso (GGA1 e 3), peso da carcaça (GGA3), peso da gordura abdominal (GGA1) e peso das coxas (GGA3).

Nones et al. (2006) genotiparam três famílias de meios-irmãos paternos abrangendo sete famílias de irmãos completos (649 F₂) utilizando a população experimental F₂ da EMBRAPA (corte e postura) com 26 microssatélites do GGA1. Foram mapeados QTLs para peso vivo, consumo de ração, peso da carcaça, peso das coxas e sobrecoxas, peso da gordura abdominal, peso do coração, pulmões, moela, fígado, pés e comprimento do intestino.

Mapeamento fino de QTLs

O mapeamento de QTLs é particularmente importante porque os QTLs encontrados podem auxiliar na localização de genes. Porém, identificar os genes responsáveis pelos QTLs têm sido demorado e difícil porque cada loco controla apenas uma fração da variância fenotípica (Wong et al., 2004). Segundo Andersson e Georges (2004), o principal desafio das características complexas não é detectar os QTLs, mas descobrir os genes que os explicam. A descrição da arquitetura genética de uma característica quantitativa não está completa até que possamos especificar quais sítios polimórficos nos genes identificados como QTLs, bem como suas interações, causam de fato, a diferença no fenótipo da característica, os chamados QTNs (nucleotídeos controladores de características quantitativas) (Mackay, 2001a). Segundo Hu et al. (2007), a última conquista do mapeamento de QTLs é a identificação de genes que explicam as características complexas e a compreensão de suas funções fisiológicas e bioquímicas.

A análise completa de QTLs inclui o mapeamento tradicional de QTLs e em seguida, o mapeamento fino (Arbilly et al., 2006). A utilização destas duas abordagens resulta 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 e Lin, 2006).

Quando uma ligação significativa ou sugestiva é encontrada no genoma, é comum aumentar a informação genética na região pela genotipagem de marcadores adicionais (Atwood e Heard-Costa, 2003). O mapeamento fino visa reduzir ao máximo o intervalo no qual o QTL-alvo está localizado, aumentando o número de animais genotipados e/ou o número de marcadores. Existem muitos métodos para o mapeamento fino de QTLs, como o aumento de número de eventos de meioses, através do aumento do tamanho ou número de famílias genotipadas; a seleção de eventos de recombinação em retrocruzamentos utilizando gerações avançadas de cruzamentos entre linhagens ou estudos de haplótipos em populações exogâmicas. Independentemente do método utilizado, altas densidades de marcadores (microsatélites ou SNPs) serão necessárias para o mapeamento fino (Georges, 2007; Druet et al., 2008).

A dificuldade do mapeamento fino é o grande número de recombinações necessárias para diminuir o intervalo de mapeamento até o nível dos locos genéticos. Todos os genes localizados na região, onde foi mapeado um QTL, são genes candidatos que podem corresponder ao QTL, mas é prudente priorizar os genes que estejam relacionados com aspectos fisiológicos, desenvolvimento e expressão da característica para qual QTL foi mapeado (Mackay, 2001b).

Trabalhos de mapeamento fino de QTLs em animais de produção tais como galinhas (Kim et al., 2006; Liu et al., 2008; Heifetz et al., 2009); suínos (Uleberg et al., 2005; Berg et al., 2006; Mikawa et al., 2007); bovinos (Gautier et al., 2006; Krebs et al., 2006; Guillaume et al., 2007; Druet et al., 2008; Schulman et al., 2009) e ovinos (Calvo et al., 2006) empregaram as diferentes metodologias descritas acima para diminuir o intervalo de mapeamento e validar os QTLs.

Uleberg et al. (2005) refinaram o mapeamento de um QTL associado à gordura intramuscular em suínos incluindo cinco marcadores microsatélites, que reduziu a distância média entre marcadores de 14 cM para 8,7 cM. No estudo em bovinos de leite, Druet et al. (2008) genotiparam 926 animais com 437 SNPs no cromossomo 3, onde havia sido mapeado um QTL associado com taxa de não retorno ao cio. Foi feita a reconstrução dos haplótipos e realizada a análise de QTLs pelo método de regressão linear. Não foi possível refinar a localização do QTL mapeado anteriormente, pois foram detectadas oito regiões associadas aos haplótipos num intervalo de 35 cM no cromossomo 3.

Poucos trabalhos em galinhas foram realizados com a finalidade de refinar a localização de um QTL previamente identificado. A região de 40 cM no GGA1, associada com resistência à coccidiose num estudo anterior, foi considerada extensa para a identificação de genes. Por isso, Kim et al. (2006) utilizaram oito marcadores microssatélites adicionais localizados no GGA1 para o mapeamento fino numa amostra de 314 aves F₂, oriundas de um cruzamento de duas linhagens comerciais de frangos de corte com diferentes susceptibilidades à coccidiose. Foi conduzida uma análise de ligação considerando dois níveis de significância: *LOD (logarithm of the odds) score* de 2,7 para a análise de marcas individuais e 3,6 para análise multiponto. Utilizando o *LOD score* de 2,7 foi detectada a associação do marcador *LEI0101* com resistência à doença. Com a análise multiponto foi observado que o intervalo entre os marcadores *LEI0071* e *LEI0101* mostrou um *LOD score* máximo de 3,74 (a 254 cM) quando foram analisadas quatro e não doze famílias. Os autores sugerem que mais estudos sejam realizados para refinar esta região e que também sejam utilizados marcadores SNPs.

Numa região de 50,8 cM (*LEI0079-ROS0025*) no GGA1, onde foram mapeados QTLs para peso vivo, peso da carcaça e características de gordura foram adicionados nove microssatélites e analisadas mais oito famílias de uma população F₂ oriundas de cruzamento entre uma linhagem de corte selecionada para deposição de gordura abdominal e uma linhagem de postura nativa chinesa, totalizando doze famílias de meios-irmãos (1.011 animais) e doze marcadores (Liu et al., 2008). Foram confirmados os QTLs mapeados anteriormente, alguns com menores intervalos de confiança.

A partir de estudos anteriores onde foram mapeados 15 QTLs associados com resistência à doença de Marek em galinhas, Heifetz et al. (2009) utilizaram seis gerações de uma população derivada do cruzamento entre duas linhagens comerciais *White Leghorn* (total de 1.615 indivíduos). Foram utilizados 217 marcadores microssatélites e 15 SNPs, identificando 21 regiões de QTLs (QTLR) associadas com resistência à doença de Marek em diferentes cromossomos (GGA1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 15, 18, 26 e Z). As regiões onde foram mapeados os QTLs foram reduzidas cerca de duas vezes em comparação com o estudo anterior.

Glazier et al. (2002) propuseram os seguintes passos para a descoberta de genes responsáveis pelas características complexas: (1) Associação e ligação: o primeiro passo é estabelecer a evidência de ligação significativa ou associação estatística; (2)

Mapeamento fino: o próximo passo é reduzir o tamanho do intervalo crítico com a utilização de maior número de animais genotipados ou marcadores; (3) Análise de seqüências: as regiões de DNA no intervalo alvo devem ser testadas como genes candidatos e seus polimorfismos verificados. Alguns QTLs resultam de modificações de um único nucleotídeo, outros resultam de muitas variações em diversos nucleotídeos, tanto no mesmo gene, como em genes próximos, ligados; (4) Testes dos genes candidatos: pode ser feito por *knock-out* ou transgenia. Arbilly et al. (2006) acrescentaram que, além do mapeamento fino, pode ser realizada, em paralelo, a análise de expressão gênica para tentar identificar potenciais genes candidatos.

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP)

Polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) são variações de uma única base, que correspondem às variações mais comuns e abundantes no genoma, ocorrendo aproximadamente a cada 600 bases em humanos. Eles ocorrem tanto em regiões codificadoras (exons), como em não codificadoras (introns) (Guimarães e Costa, 2002). Alguns autores também consideram como SNP uma deleção ou inserção (Vignal et al., 2002).

Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na seqüência protéica são denominados não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca, e nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Embora os SNPs sinônimos não alterem a seqüência protéica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida. Além disso, os SNPs podem promover *splicing* alternativo, alterações no padrão de expressão de genes, geração ou supressão de códons de terminação ou poliadenilação na molécula de RNA mensageiro e alteração nos códons de iniciação de tradução (Guimarães e Costa, 2002).

As mutações que ocorrem nas regiões não codificadoras (introns) não podem afetar diretamente a estrutura da proteína, entretanto, podem impedir a produção do RNA mensageiro, inibindo a união dos exons por *splicing*. Além disso, as mutações na região promotora do gene podem alterar a expressão gênica (Lewin, 2001).

Devido ao fato de os SNPs serem encontrados em alta densidade nos genomas e serem facilmente detectados, eles são importantes marcadores para obtenção de mapas genéticos de alta resolução (Nie et al., 2003; Caixeta et al., 2006). SNPs são as principais contribuições para o estudo das variações genéticas, compreendendo 80% de todos os polimorfismos conhecidos. Apesar de os SNPs serem principalmente bialélicos e, conseqüentemente menos informativos que os microssatélites, eles são mais freqüentes e estáveis, sendo, portanto, adequados para estudos de associação. Além disso, pelo fato de terem, na maioria das vezes, dois alelos, podem ser genotipados por um simples ensaio de positivo ou negativo (Nature Genetics, 1998).

O estudo de SNPs envolve as etapas de identificação e genotipagem. Inicialmente, as abordagens de detecção de SNPs consistiam em amplificar fragmentos genômicos de vários indivíduos e comparar suas seqüências buscando variações. Atualmente, a maior parte dos estudos visando a identificação de SNPs em larga escala tem explorado as milhares de seqüências presentes nos bancos de dados, incluindo clones genômicos e, principalmente, seqüências de cDNA (DNA complementar) ou EST (Guimarães e Costa, 2002).

Para a genotipagem, diversas metodologias podem ser utilizadas, escolhidas de acordo com sua precisão, agilidade e custo. Existem muitas técnicas disponíveis: (1) hibridização direta, com o uso de sondas ou *chips* de DNA; (2) geração e separação de produtos alelo-específicos por cromatografia líquida de alta pressão desnaturante (DHPLC), espectrometria de massa, PCR em tempo real (*TaqMan*[®]), seqüenciamento de uma única base ou por enzimas de restrição. Em análises de menor escala, seqüenciamento ou digestão por enzimas de restrição (RFLP, polimorfismos no comprimento de fragmento de restrição) são rotineiramente empregados (Guimarães e Costa, 2002; Vignal et al., 2002).

O método de detecção *TaqMan*[®] funciona a partir da atividade de exonuclease 5'-3' de uma *Taq* DNA polimerase e de sondas marcadas duplamente (com um repórter e um corante "silenciador"), que possuem o princípio FRET (*fluorescence resonance energy transfer* = emissão obtida através de transferência de energia ressonante) e emitem um sinal de fluorescência apenas quando são clivadas.

Os SNPs têm se tornado os marcadores preferidos para mapeamentos de alta densidade e, em aves, eles têm sido identificados a cada 225 pares de bases (Jalving et

al., 2004), ou, segundo Wong et al. (2004), são encontrados na taxa média de cinco SNPs/kilobase. Wong et al. (2004) analisaram as raças *Red Jungle Fowl*, *Silkie* e duas linhagens comerciais (corte e postura), onde encontram 3,1 milhões de variações, sendo que 2,8 milhões foram caracterizados como SNPs e 0,3 milhões como deleções. Os autores consideraram como SNPs todos os tipos de variações, sejam elas substituições, deleções ou inserções e detectaram também que cerca de 70% dos SNP são comuns e segregam nas diversas raças de galinhas estudadas.

Os marcadores SNPs podem ser utilizados como alternativa aos microssatélites ou em complementação (Jalving et al., 2004). Alguns polimorfismos podem afetar a expressão de um gene, mas o efeito de um único polimorfismo pode ser mascarado pela interação com fatores ambientais (Franco et al., 2005). Segundo Schmid et al. (2005), o futuro dos estudos genéticos está em densos mapas de SNPs. Porém, sozinhos estes mapas não são adequados; eles devem ser combinados com outras estratégias, como o mapeamento fino (Wong et al., 2004). A segregação de grande número de SNPs comuns entre e dentro de populações de frangos de corte e poedeiras forneceu informação de um grande número de marcadores genéticos potenciais para o mapeamento de QTLs na avicultura (Burt, 2007).

No cromossomo 1 da galinha existem atualmente 674.948 SNPs descritos no *Chicken Variation Database* (ChickVD, 2009). Outro banco público de dados de SNPs é o *dbSNP* (2009), mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, 2009). Neste banco existem cerca de três milhões de SNPs em galinhas depositados, 605.112 apenas no GGA1.

Os SNPs também estão sendo utilizados como marcadores para o mapeamento de QTLs. Rao et al. (2007) utilizaram 28 SNPs no GGA1 para a identificação de QTLs associados com características de peso vivo aos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 e 84 dias e gordura abdominal e subcutânea em 500 galinhas, oriundas do cruzamento entre uma linhagem de frango de corte de rápido crescimento e uma linhagem nativa chinesa de crescimento lento. Foram identificados QTLs significativos associados com peso vivo aos 35 (351 cM), 42 (353 cM) e 70 dias (360 cM), peso da gordura abdominal (205 cM), taxa de gordura abdominal (221 cM) e espessura da gordura (72 cM).

Genes candidatos

Genes candidatos são genes já seqüenciados, de ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou fisiologia de uma característica. Estes genes podem ser seqüenciados, seus polimorfismos detectados e, se a mutação for associada com a variação na característica de interesse é possível a seleção direta. Mas isso é limitado ao conjunto de genes conhecidos (Ledur et al., 2005). O estudo de genes candidatos com base em efeitos fisiológicos é simples, em contraste com a investigação de seqüências anônimas de DNA. Quando uma associação entre um polimorfismo e uma característica importante é encontrada, o marcador pode ser imediatamente incluído em programas de seleção baseados em marcadores. Estas inclusões, gradualmente, aumentam a acurácia da seleção, e, conseqüentemente, melhoram a resposta. Porém, mais pesquisas são necessárias para a compreensão das interações genético-ambientais (Franco et al., 2005).

O estudo de polimorfismos em genes candidatos tem contribuído para a descoberta de informações fundamentais que podem ser incorporadas aos programas de melhoramento genético. Exemplos bem sucedidos da utilização de genes candidatos em suínos são os do gene do *halotano* e do *RN* (rendimento Napoli), que afetam a qualidade da carne e, em certas populações, os genes dos *receptores de estrogênio* e da *prolactina*, que afetam o tamanho da leitegada (Ledur, 2001).

Além das propostas que visam diminuir o intervalo onde foram mapeados os QTLs através do mapeamento fino, a análise de genes candidatos pode complementar estes estudos. Identificar o loco que está associado à característica quantitativa é extremamente importante e, para isso, uma estratégia comum para ir da região mapeada, que pode abranger até 40 cM, até o gene é a metodologia do gene candidato. O método de identificação de QTLs por meio de genes candidatos baseia-se na detecção de polimorfismos que possam estar associados com as características fenotípicas de interesse.

As vantagens desta metodologia são: (1) maior poder estatístico obtido com menor número de famílias e indivíduos quando comparado com análises de ligação; (2) ampla aplicabilidade, pois não é necessário utilizar-se populações com duas ou três gerações; (3) baixo custo após o desenvolvimento dos *primers* e detecção do

polimorfismo e a simplicidade operacional, pois se pode trabalhar com um único gene e a utilização imediata na seleção assistida por marcadores na população testada (Rothschild e Soller, 1997).

As limitações da análise de genes candidatos são o pequeno número de genes conhecidos que controlam características de interesse, o alto custo da etapa inicial e a dificuldade no estabelecimento do efeito do gene candidato. 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 e Soller, 1997).

Muitos estudos em galinhas são focados na tentativa de encontrar polimorfismos em genes candidatos associados com características de interesse para a indústria avícola. Zhang et al. (2009) identificaram dois SNPs no gene *calpaína 3* em galinhas. Os haplótipos foram construídos, e, em seguida, foram feitas as análises de associação dos genótipos dos SNPs, haplótipos e dos diplótipos com as características avaliadas. Foram encontradas diversas associações dos genótipos, haplótipos e diplótipos com peso vivo, peso da carcaça, peso do músculo do peito e peso do músculo das pernas. Nie et al. (2005) estudaram polimorfismos do gene *do hormônio do crescimento (GH)* em frangos e encontram associações com peso corporal, ganhos de peso e comprimento da canela. De Souza (2004) estudou polimorfismos em cinco genes relacionados ao desenvolvimento muscular (*MyoD*, *Myf5*, *miogenina*, *MRF4* e *miostatina*) nas linhagens parentais da população da EMBRAPA e encontrou associações da *miogenina* com peso vivo aos 42 dias, ganho de peso e pesos da carcaça, asas, gordura abdominal, fígado e pulmões. Ninov et al. (2008) investigaram os polimorfismos do gene *receptor da leptina* na mesma população e encontraram seis polimorfismos, sendo dois deles na linhagem TT (corte) e quatro com maior frequência na linhagem CC (postura). Dois SNPs do gene *receptor da leptina* foram associados com diversas características. O SNP C352T foi associado com proteína bruta e cinzas e rendimento de fígado, peito e carcaça. O SNP G915A foi associado com consumo de ração, rendimento de pulmões e coxas e sobrecoxas.

Nie et al. (2005) estudaram os polimorfismos do gene *hormônio do crescimento* em frangos e encontraram associações entre peso corporal e ganho de peso com o gene

candidato estudado. Wang et al. (2005) estudaram o gene *IGF2* em frangos e identificaram um polimorfismo associado com peso da gordura abdominal, peso ao nascer e peso de peito. Zhou et al. (2005) identificaram polimorfismos no gene candidato *IGF1*, associados com crescimento, características metabólicas, composição corporal e integridade óssea. Um polimorfismo na região promotora do gene *IGF1* foi associado com a maioria das características estudadas.

Todas as metodologias descritas: mapeamento de QTLs, mapeamento fino de QTLs, estudo de genes candidatos, identificação de polimorfismos em genes candidatos e estudos de expressão gênica se complementam e têm como finalidade a descoberta de regiões genômicas ou genes responsáveis pelas características complexas.

Gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (*IGF1*)

O gene do hormônio do crescimento (*GH*) está relacionado com outros genes, como: *IGF1*, *IGF2*, seus receptores, *PIT1* (fator de transcrição pituitária específico), *GHRH* (hormônio liberador do GH), *somastostatina* e *GHR* (receptor do hormônio do crescimento). Estes genes são candidatos potenciais em estudos de associação com características de crescimento devido a sua importância fisiológica na determinação de características econômicas (Franco et al., 2005). O GH induz à produção dos IGFs (fatores de crescimento semelhante à insulina ou somatomedinas), que são importantes moduladores positivos do crescimento em diferentes organismos (Duclos et al., 1999). Segundo Martinelli Júnior et al. (2002), os IGFs são hormônios produzidos na maioria dos órgãos e tecidos, sendo o fígado a principal fonte dos IGFs circulantes, que incluem o IGF1 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e IGF2 (fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2), além de seus receptores. Suas ações autócrinas, parácrinas e endócrinas são observadas na maioria dos tecidos (Figura 2).

O GH é um dos principais promotores da produção de IGF1, cuja síntese é também estimulada pelos hormônios tireoideanos, esteróides sexuais, insulina e influenciada pelo estado nutricional, dentre outros fatores (Martinelli Júnior et al., 2002). Os IGFs atuam na síntese de proteínas, lipídeos e glicogênio, inibem a lipólise e são potentes promotores de crescimento. São controlados primariamente pela secreção de GH pela pituitária. Receptores de IGFs estão presentes em todos os tecidos do corpo

(Froesch et al., 1985). Os IGFs são essenciais para o crescimento, pois parecem ter um papel fundamental no desenvolvimento dos músculos esqueléticos e cardíaco, atuando também na diferenciação dos osteoblastos (Schmid, 1995).

Segundo Beccavin et al. (2001), modelos genéticos que exibem crescimento em taxas opostas (baixo ou alto crescimento) são valiosas ferramentas para o estudo dos fatores de crescimento. Altos níveis de GH em galinhas estão associados com baixas taxas de crescimento, o que sugere que os níveis de GH não explicam diretamente a taxa de crescimento e implica na necessidade de estudos de outros fatores relacionados ao GH, os IGFs. Respostas a diferentes estados nutricionais, como o jejum prolongado em mamíferos, estão relacionadas com grandes alterações nas concentrações dos níveis de IGFs circulantes. O sistema IGF (principalmente o IGF1) é significativamente alterado pelo genótipo, sugerindo um papel principal no controle da taxa de crescimento em frangos de corte.

O gene *IGF1* tem sido intensamente estudado em galinhas, pois está associado com importantes ações fisiológicas, como: crescimento, proliferação e diferenciação dos músculos (mioblastos e linhagens miogênicas), cartilagens e ossos (Kelly, 1990; Florini et al., 1996; Duclos et al., 1999; Machida e Booth, 2004; Zhou et al., 2005); está relacionado com a produção de ovos em galinhas, atua no crescimento e diferenciação folicular e estimula a produção de progesterona ovariana (Kim et al., 2004); atua nas células da teca e da granulosa, localizadas nos ovários das aves (Armstrong e Hogg, 1996); promove a diferenciação de osteoblastos, estimula a eritropoiese e o crescimento longitudinal na ausência do GH (Schmid, 1995); pode induzir à proliferação das células satélites e atua na síntese de proteínas (Machida e Booth, 2004) e exerce um papel importante no crescimento celular através da mediação de muitas ações do GH (Kajimoto e Rotwein, 1991).

O *IGF1* foi mapeado no GGA1 a 166 cM no mapa genético de machos da população *East Lansing* (ARKdb, 2006), entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* (Klein et al., 1996). Possui 48.429 pares de bases distribuídos em quatro exons e três introns (Tabela 1) e sua proteína é formada por 153 aminoácidos (*GeneID*: 418090, NCBI, 2008). Em mamíferos, o *IGF1* possui um processo complicado de expressão e é transcrito e processado em múltiplos mRNAs. Em galinhas, este gene é mais compacto

e seu processo de expressão é mais simples, os exons são distribuídos em 50 kb e o produto transcrito possui 1,9 a 2,6 kb (Kajimoto e Rotwein, 1991).

O IGF1 é provavelmente produzido localmente durante a hipertrofia muscular. IGF1 e células satélites têm um papel essencial no processo de hipertrofia celular. Alguns estudos mostraram a relação entre estimulação local do crescimento do músculo esquelético e expressão do *IGF1*. A hipertrofia da musculatura esquelética é regulada por pelo menos três mecanismos moleculares principais: (1) atividade das células satélites; (2) transcrição gênica e (3) tradução de proteínas. O IGF1 pode influenciar todos estes processos (Machida e Booth, 2004).

Este gene possui um papel importante em diversos processos metabólicos, constituindo-se num gene candidato para estudos de associação com características de crescimento. Nele já foram descritos 67 polimorfismos em galinhas no banco público de dados NCBI (2009). Diversos estudos tentaram identificar SNPs neste gene em galinhas. Zhou et al. (2005) identificaram polimorfismos no *IGF1* associados com crescimento, características metabólicas, composição corporal e integridade óssea. Nagaraja et al. (2000) encontraram polimorfismos do gene *IGF1* associados a peso do ovo e taxa de postura em galinhas. Amills et al. (2003) buscaram polimorfismos no gene *IGF1* em duas linhagens geneticamente distintas para características de crescimento. Foram encontrados dois polimorfismos (SNP1 e SNP2), sendo que um deles já havia sido descrito. O SNP1 foi identificado na região 5'UTR. Não foram encontradas associações significativas destes dois SNPs com as características de peso vivo, ganho de peso médio diário, consumo de alimento e eficiência alimentar aos 44, 73 e 107 dias.

Beccavin et al. (2001) demonstraram que as concentrações de IGF1 podem ser alteradas pelo estado nutricional (aves alimentadas, jejum de 16h e 48h e alimentadas após o jejum) e pelo genótipo das galinhas analisadas (linhagem de alto e baixo crescimento). As aves da linhagem de alto crescimento apresentaram maiores concentrações de IGF1 circulante. As que foram submetidas ao jejum tiveram seus níveis de IGF1 diminuídos, e estes foram elevados, logo após a alimentação. Os níveis de IGF1 aumentaram gradualmente com a idade das aves (1-6 semanas da linhagem de alto crescimento e 1-12 semanas da linhagem de baixo crescimento). Quanto aos níveis de IGF1 hepáticos, houve aumento significativo entre a primeira e sexta semanas e

diminuição pelo jejum nas duas linhagens. Quando as aves foram alimentadas novamente, os níveis aumentaram apenas na linhagem de alto crescimento. Sugere-se que exista uma relação entre os níveis de IGF1 circulantes e taxa de crescimento nas galinhas.

Gene *Jumonji*, Domínio interativo 1A rico em AT (*JARID1A*)

Na galinha, o gene *JARID1A* (*Jumonji*, *AT rich interactive domain 1A*), *RBBP2-like* ou *SMCY* está localizado no GGA1 entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* e possui 48.523 pares de bases distribuídos em 28 exons e 27 introns e sua proteína contém 1.691 aminoácidos (Tabela 2). Este gene codifica uma proteína nuclear, que, juntamente com outras, está relacionada com a proteína retinoblastoma 1 (*GeneID*: 418148, NCBI, 2008).

O gene *retinoblastoma 1* (*RB1*) é um regulador negativo do ciclo celular e o primeiro gene supressor de tumor descoberto. A proteína retinoblastoma 1 tem papel importante no controle da proliferação celular, desenvolvimento, diferenciação e supressão de tumores. A perda da função desta proteína causa uma variedade de cânceres e problemas no desenvolvimento de alguns tipos de células, mas seu papel na transcrição permanece obscuro (Chan e Hong, 2001).

As possíveis funções relacionadas ao *JARID1A* descritas em humanos são: modificações da cromatina, regulação da transcrição e diferenciação celular, supressão de tumores, desenvolvimento embrionário, regulação negativa da proliferação celular, atividade oxidoreductase, entre outras. Como o *JARID1A* regula a transcrição ainda é um mecanismo desconhecido (NCBI, 2008). Em galinhas, já foram descritos 275 polimorfismos neste gene no banco público de dados NCBI (2009). Porém, não existem estudos de associação de polimorfismos deste gene com características de interesse na avicultura.

A família de genes chamada de ARID (domínio interativo rico em AT) em humanos é composta por sete subfamílias, que tem em comum a presença de domínios como o JMJC (*Jumonji*), JMJM, PHD, ARID e outros que normalmente estão presentes em proteínas reguladoras da transcrição através de alterações na estrutura da cromatina. Entre elas, está a subfamília JARID, que inclui os genes: *JARID1A*, *JARID1B*,

JARID1C e *JARID1D*. Na família ARID estão incluídos os genes *RBP1*, *MRF1*, *MRF2*, entre outros relacionados ao desenvolvimento, proliferação celular e regulação do crescimento (Patsialou et al., 2005).

Em galinhas, a proteína sintetizada pelo gene *JARID1A* é chamada de JARID1A, RBBP2-like ou RBP2 (proteína de ligação 2 do retinoblastoma) e possui expressão nuclear ubíqua, ou seja, é expressa em todos núcleos das células do organismo (NCBI, 2008). Segundo Klose et al. (2007), a proteína RBP2 pode agir como um ativador ou repressor da transcrição. Ela contém um domínio JMJC, recentemente definido como uma histona demetilase. A metilação de histonas é um importante processo que regula a dinâmica da cromatina e transcrição e está também associado ao câncer. A metilação era considerada uma modificação estável, porém tem sido provado o contrário (Xiang et al., 2007).

População experimental da EMBRAPA

Existem muitas linhagens de galinhas de corte ou postura utilizadas para diferentes finalidades, inclusive para estudos genéticos (Siegel et al., 2006). De forma simples, pode-se dividir as linhagens selecionadas para finalidades produtivas em frangos de corte e poedeiras, porém a maior parte das linhagens é mantida por companhias privadas e não está disponível para pesquisas.

A EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia-SC) em colaboração com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP (Piracicaba-SP) iniciou em 1999, o Projeto Brasileiro de Genômica da Galinha, cujo objetivo primordial foi o mapeamento de QTLs para características de desempenho e carcaça. Foram desenvolvidas duas populações experimentais F_2 , a partir do cruzamento de uma linhagem parental de corte (designada TT) e uma de postura (CC). As duas populações F_2 foram designadas TCTC e CTCT devido aos cruzamentos recíprocos das linhagens parentais (Figura 3).

A linhagem TT se originou do cruzamento de linhagens comerciais provenientes das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*, enquanto que a CC originou da *White Leghorn* (Rosário et al., 2009). A linhagem TT é uma linha macho, cujo objetivo de seleção foi melhorar o peso vivo, conversão alimentar, consumo de

ração, rendimento de carcaça e partes, fertilidade, eclodibilidade e reduzir a gordura abdominal e as síndromes metabólicas (Figueiredo et al., 2003a). Na linhagem CC selecionou-se as características de: produção de ovos, peso e qualidade do ovo, conversão alimentar, viabilidade, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade e redução do peso vivo (Figueiredo et al., 2003b). Devido às divergências fenotípicas entre estas linhagens, as aves resultantes do cruzamento entre elas são ideais para estudos de mapeamento de QTLs.

Fenotipicamente, as diferenças entre as duas linhagens parentais podem ser observadas desde os estádios embrionários até a idade adulta. Por exemplo, aos 17 dias de desenvolvimento embrionário, o músculo *pectoralis* na linhagem TT pesou 0,28 g, enquanto que na CC este músculo pesou 0,19 g. Aos 21 dias pós-eclosão, este músculo na TT pesou 42 g e na CC 7,7 g. Na idade de abate (41 dias) esta diferença pode ser observada nas aves TT com peso vivo de 2.395 g e nas CC com 513 g (Jorge et al., 2007).

A partir destas duas populações e de suas linhagens parentais foram desenvolvidos diversos trabalhos no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP (Piracicaba-SP): mapeamento de QTLs (Baron, 2004; Boschiero, 2006; Moura et al., 2006; Nones et al., 2006; Ambo, 2007; Campos, 2007; Pinto, 2007; Ruy et al., 2007; Rosário, 2008; Ambo et al., 2009; Campos et al., 2009); identificação de polimorfismos em genes candidatos e associações com características de interesse econômico (De Souza, 2004; Ninov, 2006; Ninov et al., 2008), estudos de expressão gênica (Alvares, 2001; Alves, 2004, Andreote et al., 2005, Marchesin, 2008) e identificação de seqüências expressas (Alves, 2004; Jorge, 2006; Cassoli, 2007). Todos estes estudos contribuíram para um maior entendimento do complexo processo biológico envolvendo o crescimento e desenvolvimento da galinha.

O desenvolvimento deste trabalho resultou na elaboração de dois artigos científicos, redigidos sob as normas de cada revista em questão.

O Capítulo 2, denominado MAPEAMENTO FINO DE UMA REGIÃO ASSOCIADA A QTLs NO CROMOSSOMO 1 DA GALINHA, apresenta-se de acordo com as normas para a publicação na **Genetics and Molecular Biology**. O objetivo deste trabalho foi refinar o mapeamento de uma região do cromossomo 1 da galinha, onde foram mapeados QTLs para peso vivo, peso do coração e dos pulmões numa população experimental F₂ brasileira de galinhas, a fim de se obter uma maior precisão na posição destes QTLs.

O Capítulo 3, denominado POLIMORFISMOS NOS GENES *IGF1* E *JARID1A* E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DA GALINHA, apresenta-se de acordo com as normas para a publicação na **Revista Brasileira de Zootecnia**. O objetivo deste trabalho foi identificar polimorfismos nos genes *IGF1* e *JARID1A*, localizados numa região do cromossomo 1 da galinha, onde foram mapeados QTLs para pesos vivos e pesos do coração e pulmões e testar a associação dos genótipos e dos diplótipos com características de crescimento.

Referências Bibliográficas

- ABASHT, B.; DEKKER S. J. C. M.; LAMONT, S.J. Review of quantitative trait loci identified in the chicken. **Poultry Science**, v. 85, n. 12, p. 2079-2096, 2006.
- ABEF. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 10 dez. 2008.
- AL-NASSER, A. et al. Overview of chicken taxonomy and domestication. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, n. 2, p. 285-300, 2007.
- ALVARES, L. E. **Quantificação da expressão dos fatores miogênicos e de PAX-3 durante o desenvolvimento embrionário de aves**. Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2001.
- ALVES, H. J. **Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.
- AMBO, M. **Mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs) associados a desempenho nos cromossomos 19, 23, 24, 26, 27 e 28 de *Gallus gallus***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.
- AMBO, M. et al. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, v. 40, n. 2, p. 200-208, 2009.
- AMILLS, M. et al. Identification of three single polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. **Poultry Science**, v. 82, n. 10, p. 1485-1493, 2003.
- ANDERSSON, L.; GEORGES, M. Domestic-animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. **Nature Reviews**, v. 5, n. 3, p. 202-212, 2004.
- ANDREOTE, A. P. D. et al. Quantificação de genes diferencialmente expressos em duas linhagens (corte e postura) de *Gallus gallus*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 51., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Genética, 2005.
- ANIMAL QTLdb. Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb>>. Acesso em: 10 jun. 2009.
- ARBILLY, M. et al. An integrative approach for the identification of quantitative trait loci. **Animal Genetics**, v. 37, n. 1, p. 7-9, 2006.
- ARMSTRONG, D. G.; HOGG, C. O. Insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and type-I IGF receptor gene expression in the ovary of the laying hen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, n. 1, p. 101-106, 1996.
- ARKDB, Chicken. Disponível em: <<http://www.thearkdb.org>>. Acessos em: 15 abr. 2006 e 5 jun. 2006.
- ATWOOD, L. D; HEARD-COSTA, N. Limits of fine-mapping a quantitative trait. **Genetic Epidemiology**, v. 24, n. 2, p. 99-106, 2003.
- AveWorld, Revista. Disponível em: <<http://www.aveworld.com.br>>. Acessos em: 17 dez. 2008 e 5 jun. 2009.
- AVICULTURA INDUSTRIAL, Estatísticas. Disponível em: <<http://www.aviculturaindustrial.com.br>>. Acesso em: 19 jan. 2009.
- AVISITE, Estatísticas e Notícias. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br>>. Acessos em: 28 mar. 2008, 9 jan. 2009 e 4 jun. 2009.
- BARON, E. E. **Identificação de QTLs nos cromossomos 2 e 4 que controlam características de desempenho e carcaça em aves (*Gallus gallus*)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

- BECCA VIN, C. et al. Insulin-like growth factors and body growth in chickens divergently selected for high or low growth rate. **Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 2, p. 297-306, 2001.
- BERG, F. et al. Refine localization of the FAT1 quantitative trait locus on pig chromosome 4 by marker-assisted backcrossing. **BMC Genetics**, v. 7, n. 17, 2006.
- BIOMED COMM[®], INC., Central nervous system diagram hGH & IGF-1 relationship. Disponível em: <<http://www.biomedcomm.com>>. Acesso em: 4 fev. 2009.
- BOSCHIERO, C. **Mapeamento de locos de características quantitativas associados a desempenho e carcaça nos cromossomos 11 e 13 de *Gallus gallus***. Botucatu: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006.
- BURT, D. W. Chicken genomics charts a path to the genome sequence. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v. 3, n. 1, p. 60-67, 2004.
- BURT, D. W. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. **Poultry Science**, v. 86, n. 7, p. 1460-1471, 2007.
- CAIXETA, E. T. et al. **Marcadores Moleculares**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 374 p.
- CALVO, J. H. et al. Fine mapping of genes on sheep chromosome 1 and their association with milk traits. **Animal Genetics**, v. 37, n. 3, p. 205-210, 2006.
- 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**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.
- CAMPOS, R. L. R. et al. Quantitative trait loci associated with fatness in a broiler-layer cross. **Animal Genetics**, 2009. In Press.
- CASSOLI, C. S. S. **Identificação e análise de etiquetas de seqüências expressas (ESTs) na hipófise e hipotálamo de *Gallus gallus***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.
- CHAN, S. W.; HONG, W. Retinoblastoma-binding protein 2 (RBP2) potentiates nuclear hormone receptor-mediated transcription. **Biological Chemistry**, v. 276, n. 30, p. 28402-28412, 2001.
- CHICKEN VARIATION DATABASE (ChickVD). Disponível em: <<http://chicken.genomics.org.cn>>. Acesso em: 26 jan. 2009.
- COGBURN, L. A. et al. Systems-wide chicken DNA microarrays, gene expression profiling and discovery of functional genes. **Poultry Science**, v. 82, n. 6, p. 939-951, 2003.
- DAVEY, M. G.; TICKLE, C. The chicken as a model for embryonic development. **Cytogenetic Genome Research**, v. 117, n. 1-4, p. 231-239, 2007.
- DBSNP, Single Nucleotide Polymorphism. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>>. Acesso em: 7 fev. 2009.
- DEQUÉANT, M. L.; POURQUIÉ, O. Chicken genome: new tools and concepts. **Developmental Dynamics**, v. 232, n. 4, p. 883-886, 2005.
- DE SOUZA, C. A. **Investigação de polimorfismos nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em *Gallus gallus***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.
- DRUET, T. et al. Fine mapping of quantitative trait loci affecting female fertility in dairy cattle on BTA03 using a dense single-nucleotide polymorphism map. **Genetics**, v. 178, n.4, p. 2227-2235, 2008.

- DUCLOS, M. J.; BECCA VIN, C.; SIMON, J. Genetic models for the study of insulin-like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, n. 2-3, p. 231-243, 1999.
- ELLEGREN, H. The avian genome uncovered. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 4, p. 180-186, 2005.
- ERIKSSON, J. et al. Identification of the yellow skin gene reveals a hybrid origin of the domestic chicken. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2008.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. Harlow: Longman Group, 1996.
- FIGUEIREDO, E. A. P. et al. Genetic gain in egg production and egg weight in White Legorn Embrapa 011. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: 2003a. 1 CD-ROM.
- FIGUEIREDO, E. A. P. et al. 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., REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2003, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: 2003b. 1 CD-ROM.
- FLORINI, J. R., EWTON, D. Z., COOLIGAN, S. A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 5, p. 481-517, 1996.
- FRANCO, M. M.; ANTUNES, R.; SILVA, H. D.; GOULART, L. R. Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in landrace pigs. **Journal of Applied Genetics**, v. 46, n. 2, p. 195-200, 2005.
- FROESCH, E. R. et al. Actions of insulin-like growth factors. **Annual Review Physiology**, v. 47, p. 443-467, 1985.
- FUMIHITO, A. et al. One subspecies of the red junglefowl (*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**, v. 91, n. 26, p. 12505-12509, 1994.
- GAUTIER, M. et al. Fine mapping physical characterization of two linked quantitative trait loci affecting milk fat yield in dairy cattle on BTA26. **Genetics**, v. 172, n. 1, p. 425-436, 2006.
- GEORGES, M. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, p. 131-162, 2007.
- GLAZIER, A. M.; NADEAU, J. H.; AITMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**, v. 298, n. 5602, p. 2345-2349, 2002.
- GROENEN, M. A. M. et al. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research**, v. 10, n. 1, p. 137-147, 2000.
- GUILLAUME, F. et al. Refinement of two female fertility QTL using alternative phenotypes in French Holstein dairy cattle. **Animal Genetics**, v. 38, n. 1, p. 72-74, 2007.
- GUIMARÃES, P. E. M.; COSTA, M. C. R. SNPs: sutis diferenças de um código. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 26, p. 24-27, 2002.
- HALEY C. S.; KNOTT, S. A.; ELSSEN, J. M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least-squares. **Genetics**, v. 136, n. 3, p. 1195-1207, 1994.

- HEIFETZ, E. M. et al. Mapping QTL affecting resistance to Marek's disease in an F6 advanced intercross population of commercial layer chickens. **BMC Genomics**, v. 10, n. 20, 2009.
- HILLIER, L. W. et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 9, n. 432, p. 695-716, 2004.
- HOCKING, P. M. Review of QTL mapping results in chicken. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, n. 2, p. 215-226, 2005.
- HU, Z. L.; FRITZ, E. R.; REECY, J. M. AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. D604-D609, 2007.
- IBGE, Notícias. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 19 jan. 2009.
- IKEOBI, C. O. N. et al. Quantitative trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Science**, v. 87, n. 2-3, p. 143-151, 2004.
- IKEOBI, C. O. N. et al. Quantitative trait loci affecting fatness in the chicken. **Animal Genetics**, v. 33, n. 6, p. 428-435, 2002.
- JALVING, R.; van't SLOT, R.; van OOST, B. A. Chicken single nucleotide polymorphism identification and selection for genetic mapping. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p. 1925-1931, 2004.
- JORGE, E. C. et al. Contributions and perspectives of chicken genomics in Brazil: from biological model to export commodity. **World's Poultry Science Journal**, v. 63, n. 4, p. 597-610, 2007.
- JORGE, E. C. **Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2006.
- KAJIMOTO, Y.; ROTWEIN, P. Structure of the chicken insulin-like growth factor I gene reveals conserved promoter elements. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 15, p. 9724-9731, 1991.
- KELLY, P. A. Growth Hormone and Prolactin. In: BAULIEU, E. E., KELLY, P. A., **Hormones: From Molecules to Disease**. New York: Springer, p. 191-228, 1990.
- KERJE, S. et al. The twofold difference in adult size between the red junglefowl and white leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. **Animal Genetics**, v. 34, n. 4, p. 264-274, 2003.
- KIM, M. H.; SEO, D. S.; KO, Y. Relationship between egg productivity and insulin-like growth factor-I genotypes in Korean native Ogo chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 7, p. 1203-1208, 2004.
- KIM, E. S. et al. Fine-mapping of coccidia-resistant quantitative trait loci in chickens. **Poultry Science**, v. 85, n. 11, p. 2028-2030, 2006.
- KLEIN, S. et al. Genetic and physical mapping of the chicken IGF-I gene to chromosome 1 and conservation of synteny with other vertebrate genomes. **Journal of Heredity**, v. 87, n. 1, p. 10-14, 1996.
- KLOSE, R. J. et al. The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 889-900, 2007.
- KNOTT, S. A.; ELSEN, J.M.; HALEY, C.S. Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 93, n. 1-2, p. 71-80, 1996.
- KREBS, S. et al. Fine mapping and candidate gene analysis of bovine spinal muscular atrophy. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 1, p. 67-76, 2006.

- LANDER, E. S.; BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v. 121, n. 1, p. 185-199, 1989.
- LEDUR, M. C. Genoma do frango - Mapeamento de QTL. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: 2001.
- LEDUR, M. C. et al. A importância do conhecimento do genoma para a produção de aves. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: 2004.
- LEDUR, M. C.; NONES, K.; BERTANI, G. R. A genômica na produção de Aves: mapeamento de QTLs e genes candidatos. In: SIMPÓSIO DE GENÉTICA DE AVES, 2., 2005, São Carlos. **Anais...** São Carlos: 2005.
- LEWIN, B. Genes VII. In: LEWIN, B. Oxford: Oxford University Press, 2001. 955 p.
- LIU, B. H. **Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis**. Boca Raton: CRC Press, 1998, 611 p.
- LIU, X. et al. Fine-mapping quantitative trait loci for body weight and abdominal fat traits: effects of marker density and sample size. **Poultry Science**, v. 87, n.7, p. 1314-1319, 2008.
- MACHIDA, S.; BOOTH F. W. Insulin-like growth factor-I and muscle growth: implications for satellite cell proliferation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, n. 2, p. 337-340, 2004.
- MACKAY, T. F. C. The genetic architecture of quantitative traits. **Annual Review Genetics**, v. 35, p. 303-339, 2001a.
- MACKAY, T. F. C. Quantitative trait loci in *Drosophila*. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 1, p. 11-20, 2001b.
- MACKAY, T. F. C. Complementing complexity. **Nature Genetics**, v. 36, n. 11, p. 1145-1147, 2004.
- MARCHESIN, M. L. **Análise da expressão gênica de MyoD, MRF4, miogenina e miostatina nos músculos Biceps femoris e Gastrocnemius lateralis em duas linhagens de Gallus gallus**. Rio Claro: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2008.
- MARTINELLI JÚNIOR, C. E. et al. Diagnóstico da deficiência de hormônio de crescimento, a rigor de IGF-1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 27-33, 2002.
- McELROY, J. P. et al. Identification of trait loci affecting white meat percentage and other growth and carcass traits in commercial broiler chicken. **Poultry Science**, v. 85, n. 4, p. 593-605, 2006.
- MIKAWA, S. et al. Fine mapping of a swine quantitative trait locus for number of vertebrae and analysis of an orphan nuclear receptor, germ cell nuclear factor (NR6A1). **Genome Research**, v. 17, n. 5, p. 586-93, 2007.
- MOURA, A. S. A. M. T. et al. Mapping QTL for performance and carcass traits in chicken chromosomes 6, 7, 8, 11 and 13. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Instituto Prociência, 2006. 1 CD-ROM.
- NAGARAJA, S. C. et al. Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. **The Journal of Heredity**, v. 91, n. 2, p. 150-156, 2000.
- NATURE GENETICS, Editorial. SNP attack on complex traits. **Nature Genetics**, v.20, n. 3, p. 217-218, 1998.

- NCBI National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Acessos em: 27 mar. 2008, 1 jul. 2008 e 20 fev. 2009.
- NIE, Q. H. et al. Single nucleotide polymorphism and its use in chicken QTL mapping. **Yi Chuan**, v. 25, n. 6, p. 729-34, 2003.
- NIE, Q. et al. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 6, p. 698-703, 2005.
- NINOV, K. **Identificação de polimorfismos no gene da leptina e de seu receptor em duas linhagens de aves e associação com características de desempenho e carcaça**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2006.
- NINOV, K. et al. Investigation of *leptin* gene in broiler and layer chicken lines. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 2, p. 214-219, 2008.
- NONES, K. et al. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, v. 37, n. 2, p. 95-100, 2006.
- PAPACHRISTOU, C.; LIN, S. A comparison of methods for intermediate fine mapping. **Genetic Epidemiology**, v. 30, n. 8, p. 677-689, 2006.
- PATSIALOU, A.; WILSKER, D.; MORAN, E. DNA-binding properties of ARID family proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 1, p. 66-79, 2005.
- PINTO, L. F. B. **Ocorrência de interações QTL x sexo, de epistasias e de QTLs pleiotrópicos em aves (*Gallus gallus*)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2007.
- RAO, Y. et al. SNP mapping of QTL affecting growth and fatness on chicken GGA1. **Genetics Selection Evolution**, v. 39, n. 5, p. 569-582, 2007.
- ROSÁRIO, M. F. **Arquitetura genética de características quantitativas associadas ao desempenho e ao rendimento de carcaça na galinha doméstica**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2008.
- ROSÁRIO, M. F. et al. Genotypic characterization of microsatellite markers in broiler and layer selected chicken lines and their reciprocal F₁s. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 2, p. 150-158, 2009.
- ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v.8, n. p.13-19, 1997.
- RUY, D. C. et al. Detection of QTL for performance, fatness and carcass traits on chicken chromosomes 3 and 5. In: QTLMAS, 11. 2007, Toulouse. Proceedings... Toulouse: Institut National de la Recherche Agronomique, 2007.
- SCHMID, C. Insulin-like growth factors. **Cell Biology International**, v. 19, n. 5, p.445-457, 1995.
- SCHMID, M. et al. First report on chicken genes and chromosomes 2000. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 90, n. 3-4, p. 169-218, 2000.
- SCHMID, M. et al. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. **Cytogenetic Genome Research**, v. 109, n. 4, p. 415-479, 2005.
- SCHULMAN, N. F. et al. Fine mapping of quantitative trait loci for mastitis resistance on bovine chromosome 11. **Animal Genetics**, 2009. In Press.
- SEWALLEN, A. et al. Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six and nine weeks of age in a broiler layer cross. **Poultry Science**, v. 81, n. 12, p. 1775-1781, 2002.
- SIEGEL, P. B.; DODGSON, J. B.; ANDERSSON, L. Progress from chicken genetics to the chicken genome. **Poultry Science**, v. 85, n. 12, p. 2050-2060, 2006.

- SILVA, M. V. G. B. et al. Modelos aleatórios na estimação da localização de QTLs em famílias de meios-irmãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 66-75, 2005.
- STERN, C. D. The chick: a great model system becomes even greater. **Developmental Cell**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2005.
- UEMOTO, Y. et al. Genetic mapping of quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in F₂ intercross chickens. **Poultry Science**, v. 88, n. 3, p. 477-482, 2009.
- ULEBERG, E. et al. Fine mapping of a QTL for intramuscular fat on porcine chromosome 6 using combined linkage and linkage disequilibrium mapping. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 122, n. 1, p. 1-6, 2005.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA). Disponível em: < <http://www.uba.org.br> >. Acessos em: 18 jan. 2009 e 5 jun. 2009.
- VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.
- WANG, G. et al. Insulin-like growth factor 2 as a candidate gene influencing growth and carcass traits and its biallelic expression in chicken. **Science in China C: Life Sciences**, v. 48, n. 2, p. 187-94, 2005.
- WELLER, J. I. **Quantitative Trait Loci Analysis in Animals**. Oxford: CABI Publishing, 2001. 304 p.
- WOLPERT, L. Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 9, p. 1015-1017, 2004.
- WONG, G. K. et al. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 717-722, 2004.
- XIANG, Y. et al. JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19226-31, 2007.
- ZHANG, Z. et al. Identification and association of the single nucleotide polymorphisms in calpain 3 (CAPN3) gene with carcass traits in chickens. **BMC Genetics**, v. 10, n. 10, 2009.
- ZHOU, H. et al. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. **Poultry Science**, v. 84, n. 2, p. 212-219, 2005.
- ZHOU, H. et al. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. I. Growth and average daily gain. **Poultry Science**, v. 85, n. 10, p. 1700-1711, 2006.
- ZHOU, H. et al. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. IV. Metabolic traits. **Poultry Science**, v. 86, n. 2, p. 267-276, 2007.

Tabela 1 - Número e tamanho (pares de bases) dos exons e introns do gene *IGF1*

Exons (pb)	Exons codificadores (pb)	Introns (pb)	<i>Total (pb)</i>
309	63	4.300	
157	157	34.137	
182	182	9.195	
149	60		
			<i>48.429</i>

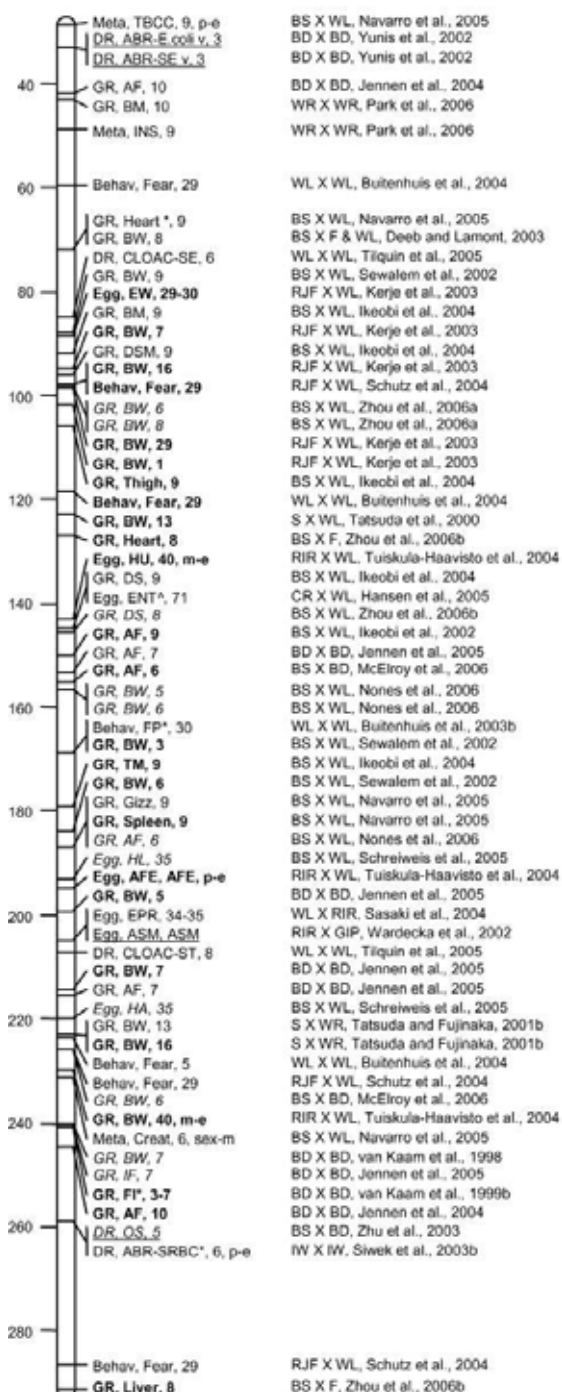
Fonte: NCBI (2008).

Tabela 2 – Número e tamanho (pares de bases) dos exons e introns do gene *JARID1A*

Exons	Tamanho dos exons (pb)	Tamanho dos exons codificadores (pb)	Tamanho dos introns (pb)	<i>Total (pb)</i>
1	165	165	1.905	
2	78	78	1.047	
3	123	123	2.100	
4	171	171	676	
5	135	135	4.791	
6	106	106	543	
7	89	89	2.863	
8	159	159	2.843	
9	120	120	1.068	
10	159	159	1.428	
11	182	182	1.485	
12	163	163	790	
13	120	120	970	
14	195	195	115	
15	182	182	266	
16	125	125	174	
17	151	151	3.441	
18	115	115	3.039	
19	356	356	530	
20	139	139	953	
21	180	180	256	
22	162	162	1.122	
23	552	552	765	
24	144	144	2.822	
25	160	160	333	
26	221	221	2.470	
27	411	411	1.821	
28	3.044	213		
				48.523

Fonte: NCBI (2008).

GGA1a



GGA1b

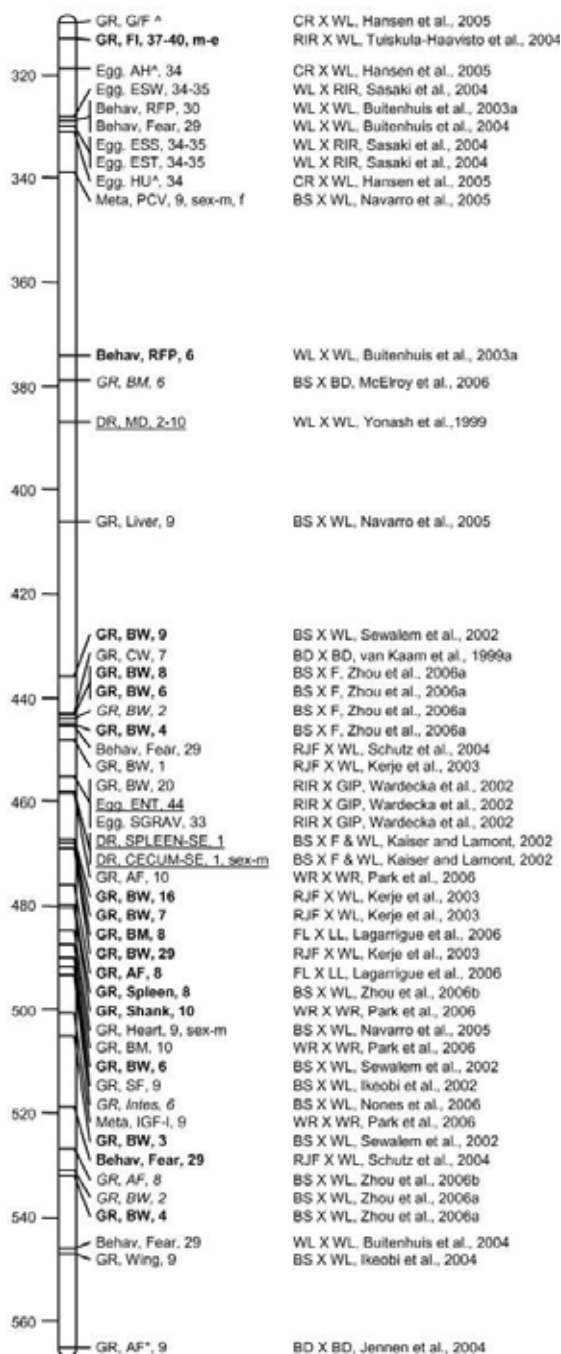


Figura 1 – QTLs detectados no GGA1. As localizações são baseadas nas distâncias dos marcadores do *Chicken Cmap* (<http://www.animals-ciencas.nl/Cmap>). Cada QTL, da esquerda para direita representa: classe da característica, característica, idade (semana), interação do QTL (se houver) e tipo de cruzamento. QTLs com ligação significativa ($P < 0,05$) são apresentados em negrito; QTLs sugestivos ($P < 0,2$) em romano; ligação no cromossomo ($P < 0,05$) em itálico e análise de marcas simples ($P < 0,01$) está em subscrito. Fonte Abasht et al. (2006).

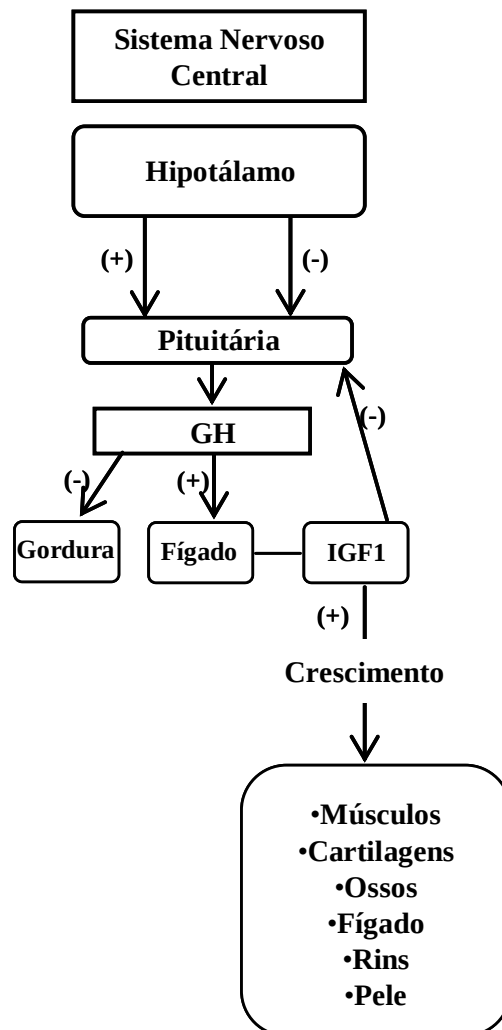


Figura 2 – Diagrama simplificado das ações dos hormônios do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1). O Sistema Nervoso Central controla o hipotálamo, que por sua vez, controla a pituitária, cujas células secretam o hormônio do crescimento (GH). O GH estimula o fígado a produzir o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1). O IGF1 estimula o desenvolvimento de uma variedade de tecidos: músculo, cartilagens, ossos e pele. Adaptado de Biomed Comm[®] Inc. (2009).

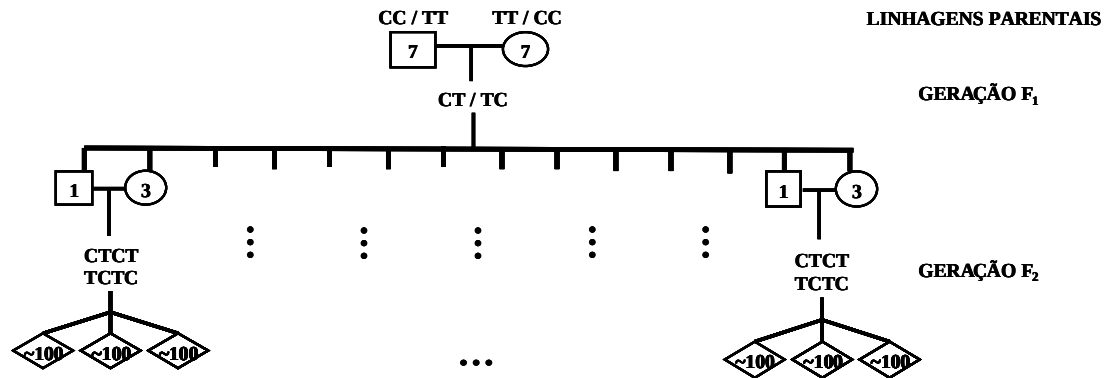


Figura 3 - Esquema simplificado da estrutura das duas populações brasileiras F_2 de galinhas desenvolvidas pela EMBRAPA Suínos e Aves, geradas a partir do cruzamento das linhagens de corte (TT) e postura (CC). Fonte: Rosário et al. (2009).

CAPÍTULO 2

MAPEAMENTO FINO DE UMA REGIÃO ASSOCIADA A QTLS NO CROMOSSOMO 1 DA GALINHA

Mapeamento fino de uma região associada a QTLs no cromossomo 1 da galinha

Clarissa Boschiero¹, Kátia Nones², Mônica Corrêa Ledur³, Millor Fernandes do Rosário², Luiz Lehmann Coutinho², Ana Silvia Alves Meira Tavares Moura¹

¹UNESP, Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Brasil

²USP, Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil

³EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

Short running title – Mapeamento fino no cromossomo 1 da galinha.

Palavras chave: peso vivo, frango de corte, marcadores microsatélites, locos de características quantitativas.

Send correspondence to Ana Silvia A. M. T. Moura. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Produção Animal, UNESP, 18618-000, Botucatu, SP, Brazil, phone +55 (14) 38117189. E-mail: anamoura@fca.unesp.br.

Resumo

A partir de resultados de um estudo anterior, no qual foram mapeados QTLs para características de peso vivo, peso do coração e pulmões no GGA1, foi definida uma região no intervalo entre os marcadores *ADL0234* e *LEI0071*, abrangendo 82,3 cM. Foram avaliadas três famílias de meios-irmãos paternos que compreendiam sete famílias de irmãos completos, num total de 652 F₂ para as características: peso vivo aos 35 e 41 dias de idade, pesos do coração e pulmões e rendimentos de coração e pulmões. Os genótipos de seis marcadores microssatélites foram adicionados aos dez utilizados anteriormente. O mapa de ligação obtido da região compreendeu 110,8 cM com espaçamento médio entre os marcadores de 7,4 cM. Na análise de F₂, em um único intervalo (*LEI0146-LEI0174*), compreendendo 28,8 cM, foram mapeados QTLs para todas as características estudadas, com exceção dos rendimentos de coração e pulmões. Neste intervalo estão localizados o gene *IGF1* e o centrômero do cromossomo. A adição de seis marcadores confirmou os QTLs mapeados anteriormente, porém alguns em diferentes posições. A análise de meios-irmãos paternos indicou que os principais QTLs estavam segregando em apenas uma das famílias (7716), na qual cinco QTLs foram mapeados. Na análise de meios-irmãos maternos, duas famílias segregaram QTLs tanto na análise Individual como na Conjunta (7810 e 7971). As diferentes análises permitiram selecionar dois casais F₁, que devem ser o alvo dos próximos estudos. Este estudo restringiu a busca por genes candidatos responsáveis pelas características de interesse a uma região de 28,8 cM (9,82 Mb) no GGA1.

Abstract

Based on the results from a previous study, in which QTL for body weight, heart and lungs weights and heart and lungs percentages were mapped to GGA1, a region was defined between markers *ADL0234* and *LEI0071*, spanning 82.3 cM. Three paternal half-sib families, comprising seven full-sib families, totaling 652 F₂ were evaluated for body weight at 35 and 41 days of age, heart and lungs weights and heart and lungs yields. Genotypes of six microsatellite markers were added to those of ten previously used. The linkage map of this region spanned 110.8 cM, with average spacing of 7.4 cM between markers. In a single interval (*LEI0146-LEI0174*), comprising 28.8 cM, QTLs for all traits, except for heart and lungs yields were mapped in the F₂ analysis. In this same interval the *IGF1* gene, and the chromosome centromere, are located. The use of six additional markers confirmed the same QTLs mapped previously, but some of them, in different positions. The paternal half-sib analysis indicated that the main QTLs were segregating in one of the families only (7716), in which five QTLs were mapped. In the maternal half-sib analysis, two families segregated QTLs both, in the across and within families analyses (7810 and 7971). These analyses allowed the selection of two F₁ couples to be the target for future studies. This study restricted the search for candidate genes responsible for the traits of interest to a region of 28.8 cM (9.82 Mb) in GGA1.

Introdução

Nos últimos vinte anos, muitos genes que controlam características mendelianas foram identificados, ao contrário das características quantitativas, para as quais é mais árdua a identificação destes genes, visto que um número desconhecido deles é que muito provavelmente as controlem. Dessa forma, através das técnicas moleculares está sendo possível descobrir mecanismos de expressão gênica, localização de genes ou de regiões cromossômicas responsáveis por características quantitativas (Zhou et al., 2006). Além disso, Cogburn et al. (2003) afirmaram que os mecanismos genéticos que governam o crescimento, diferenciação e funções dos sistemas metabólico, somático e reprodutivo nas galinhas são ainda amplamente desconhecidos.

O mapeamento de QTLs tornou-se um método comumente empregado nos últimos quinze anos, facilitado pela descoberta de marcadores moleculares altamente polimórficos, além do desenvolvimento de métodos estatísticos sofisticados de análises que têm permitido associar a informação fenotípica com a genotípica (Mackay, 2004).

A galinha é um excelente modelo para a investigação da arquitetura genética das características quantitativas (Burt, 2004). Muitos QTLs têm sido mapeados para crescimento, produção de ovos, resistência a doenças, composição corporal e comportamento (Abasht et al., 2006). Num levantamento de 50 trabalhos, foram listados cerca de 700 QTLs, dos quais 114 somente no GGA1. Portanto, a partir da identificação de QTLs em animais de produção, o passo seguinte na identificação de genes que explicam características complexas tem sido o mapeamento fino (Grapes et al., 2006). As estratégias para se utilizar da abordagem de mapeamento fino são: aumentar a informação genética na região através da genotipagem de um número maior de animais

com um maior número de marcadores moleculares com o intuito de reduzir ao máximo o intervalo no qual o QTL-alvo está localizado (Atwood e Heard-Costa, 2003).

A EMBRAPA Suínos e Aves em colaboração com a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) iniciou em 1999, o Projeto Brasileiro do Genoma da Galinha, cujo objetivo primordial tem sido o mapeamento de QTLs para características de desempenho e carcaça. Uma população experimental F_2 foi desenvolvida a partir do cruzamento de uma linhagem de corte e uma de postura. Nesta população, Nones et al. (2006) mapearam diversos QTLs entre os seguintes marcadores do GGA1: *LEI0068-MCW0297* (análise F_2 : peso vivo aos 35, 41 e 42 dias), *MCW0297-LEI0146* (F_2 : peso dos pulmões), *LEI0146-LEI0174* (F_2 : peso do coração. Meios-irmãos: peso aos 35 dias, peso do coração e pulmões com e sem ajuste), *MCW0018-ADL0150* (meios-irmãos: peso vivo aos 41 e 42 dias) e *ADL0150-ADL0319* (meios-irmãos: peso vivo aos 35, 41 e 42 dias). O QTL mapeado para peso aos 41 dias, no intervalo entre *MCW0018-ADL0150*, explicou mais de 17% da variância fenotípica numa das famílias. No entanto, os intervalos de confiança foram muito extensos abrangendo até quase a totalidade do cromossomo. Estudos com outras populações também indicaram a presença de QTLs nesta mesma região (Sewalen et al., 2002; Kerje et al., 2003; Jennen et al., 2005).

Portanto, este estudo teve por objetivo empregar a abordagem de mapeamento fino numa região no GGA1, entre os marcadores *ADL0234* e *LEI0071*, onde foram mapeados QTLs para peso vivo, peso do coração e dos pulmões, mas com grandes intervalos de confiança, numa população experimental F_2 brasileira de galinhas.

Material e Métodos

População Experimental

Foi utilizada a população experimental desenvolvida pela EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia-SC), a partir do cruzamento de machos de uma linhagem de corte (designada TT) e fêmeas de uma linhagem de postura (CC). Estas linhagens se originaram de raças diferentes e foram selecionadas de acordo com critérios distintos, conforme detalhado por Figueiredo et al. (2003a, 2003b). Sete machos TT e sete fêmeas CC foram utilizados nos cruzamentos para formação da geração F_1 . As aves foram mantidas em gaiolas individuais, com controle de *pedigree*, e os ovos identificados. Para a formação da segunda geração (F_2) foram selecionados, ao acaso, um macho e três fêmeas de cada família F_1 . Cada macho fertilizou três fêmeas, evitando-se acasalamentos entre parentes.

A geração F_2 totalizou 2063 aves de 21 famílias de irmãos completos, produzidas em 17 incubações durante oito meses. Deste total, 652 aves pertencentes a sete famílias de irmãos completos ou três famílias de meios-irmãos paternos foram utilizadas neste estudo, as mesmas de Nones et al. (2006) (Tabela 1). Essa população foi avaliada quanto às características de desempenho, rendimento de carcaça e órgãos. As aves foram criadas como frangos de corte recebendo ração à base de milho e farelo de soja e água à vontade e mantidas em boxes coletivos até os 35 dias de idade. Nesta idade foram realizados a pesagem e o alojamento em gaiolas individuais até os 41 dias.

Tabela 1 – *Pedigree* e estrutura de acasalamentos da população experimental utilizada

<i>Parentais</i>	Machos TT	6232	5661	5649	6037	5561	5921
	Fêmeas CC	332	88	886	241	570	37
<i>F₁</i>	Machos TC	7822	7769	7716			
	Fêmeas TC	7810 7816	7765		7978 7749	7709	7971
<i>Acasalamentos F₁</i> (<i>n F₂</i>)		7822 x 7765 (73) 7971 (100)		7716 x 7810 (77) 7978 (100)		7769 x 7709 (100) 7749 (96) 7816 (97)	

Colheita dos dados fenotípicos e das amostras de sangue

As características de desempenho e carcaça avaliadas neste estudo foram: peso vivo aos 35 (PV35) e 41 dias de idade (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul). Os rendimentos foram calculados conforme se segue: rendimento do coração ($R_{cor} = 100 \cdot P_{cor} / PV_{42}$) e dos pulmões ($R_{pul} = 100 \cdot P_{pul} / PV_{42}$). O peso vivo aos 42 dias (PV42) foi medido após jejum de 6 horas e transporte para o local de abate, o que justificou uma menor média em relação ao PV41 (Tabela 2), sendo utilizado apenas para o cálculo dos rendimentos. Os pesos do coração e pulmões foram medidos aos 42 dias de idade, imediatamente após o abate.

Amostras de sangue dos animais de todas as gerações foram colhidas em tubos contendo EDTA (10%) e armazenadas em *freezer* a -80°C na EMBRAPA Suínos e Aves. O sangue dos animais da geração parental e F_1 foi colhido através da veia braquial e dos animais da geração F_2 , durante o abate. Extrações de DNA foram realizadas através do método utilizando-se serino-protease (Proteinase K[®], Promega) ou detergente de guanidina (DNAzol[®], Invitrogen). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-20000), as amostras foram diluídas na concentração padrão de $20 \text{ ng DNA } \mu\text{L}^{-1}$ e armazenadas em *freezer* a -18°C .

Região genômica de estudo

Nones et al. (2006) genotiparam sete famílias de irmãos completos, compreendendo três famílias de meios-irmãos paternos (652 F_2) com dez marcadores microssatélites do GGA1. Utilizando a estrutura populacional de F_2 , mapearam QTLs para peso aos 35 e 41 dias de idade (*LEI0068-MCW0297*), peso dos pulmões (*MCW0297-LEI0146*) e coração (*LEI0146-LEI0174*), com o primeiro marcador posicionado a 72 cM no mapa Consenso (Schmid et al., 2005). Já com a estrutura de meios-irmãos paternos, empregando a análise individual (dentro das famílias), foram mapeados QTLs para peso aos 41 e 42 dias (*MCW0018-ADL0150*), peso aos 35 dias (*ADL0150-ADL0319*) e peso do coração e pulmões sem e com ajuste para peso vivo aos 42 dias entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174*. Na análise conjunta das três famílias de meios-irmãos foram mapeados QTLs para peso vivo aos 35 dias, peso do coração e pulmões (*LEI0146-LEI0174*) e peso aos 41 dias (*ADL0150-ADL0319*) (Figura 1).

A partir destes resultados foi definida a região genômica de estudo no intervalo entre os marcadores *ADL0234* e *LEI0071* (Figuras 2A, B e C), do mapa EMBRAPA (Nones et al., 2005), abrangendo 82,3 cM.

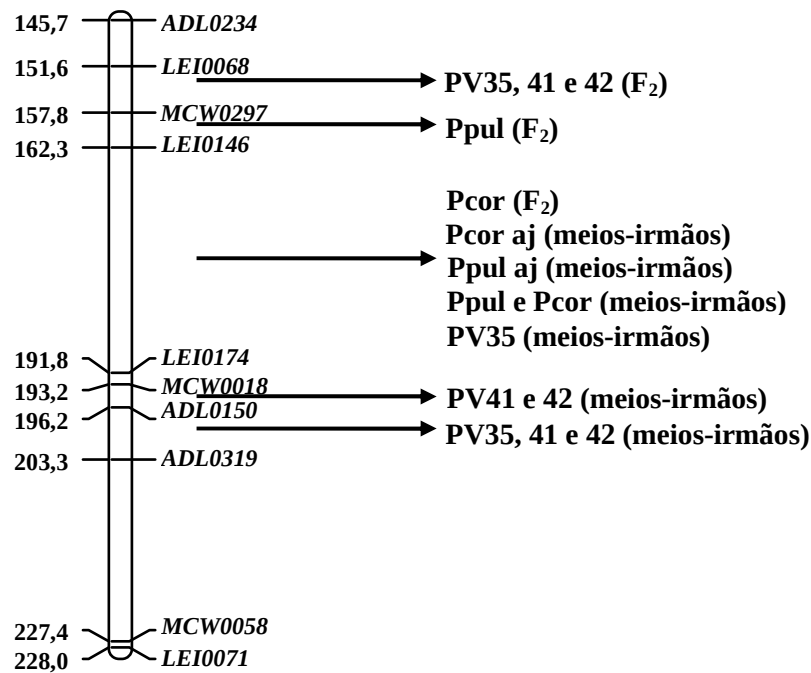


Figura 1 – Mapa de ligação da região estudada do GGA1 adaptado de Nones et al. (2005), com a indicação da posição dos marcadores em cM e QTLs mapeados por Nones et al. (2006) nesta região. Entre parênteses: tipo de análise utilizada.

Genótipos e Mapa de ligação

Foram utilizados os dados genotípicos dos dez marcadores microssatélites de Nones et al. (2006): *ADL0234*, *LEI0068*, *MCW0297*, *LEI0146*, *LEI0174*, *MCW0018*, *ADL0150*, *ADL0319*, *MCW0058* e *LEI0071*, além de seis marcadores adicionais: *ADL0192*, *ADL0364*, *MCW0007*, *MCW0112*, *MCW289E* e *MCW0353*.

Para as amplificações dos microssatélites foram utilizadas reações de PCR, as quais tiveram volume final de 15 µL contendo: 3 µL de DNA genômico (20 ng/µL), 1,5 µL de solução tampão (10×) (50 mmol/L KCl e 10 mmol/L Tris-HCl, com pH = 8,5), 1,38 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (50 mM), 0,60 µL dNTPs (10 mM), 1,20 µL de cada *primer* direto e reverso (2,5 pmol/µL) (marcados com fluorescência HEX ou

FAM), 0,48 µL da enzima *Taq* DNA polimerase (5 U/µL) e 5,64 µL de água ultrapura. O programa para amplificação utilizado no termociclador foi: dois minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos de um minuto a 94°C, um minuto na temperatura de anelamento (específica para cada marcador, variando de 59 a 63°C) e um minuto a 72°C, seguido pela extensão final de dez minutos a 72°C. Após as amplificações foram aplicadas alíquotas do produto amplificado com o marcador de peso molecular ϕ X174 RF DNA/*HaeIII* (Invitrogen™) em um gel de agarose (2%) para verificação do tamanho aproximado dos fragmentos após eletroforese.

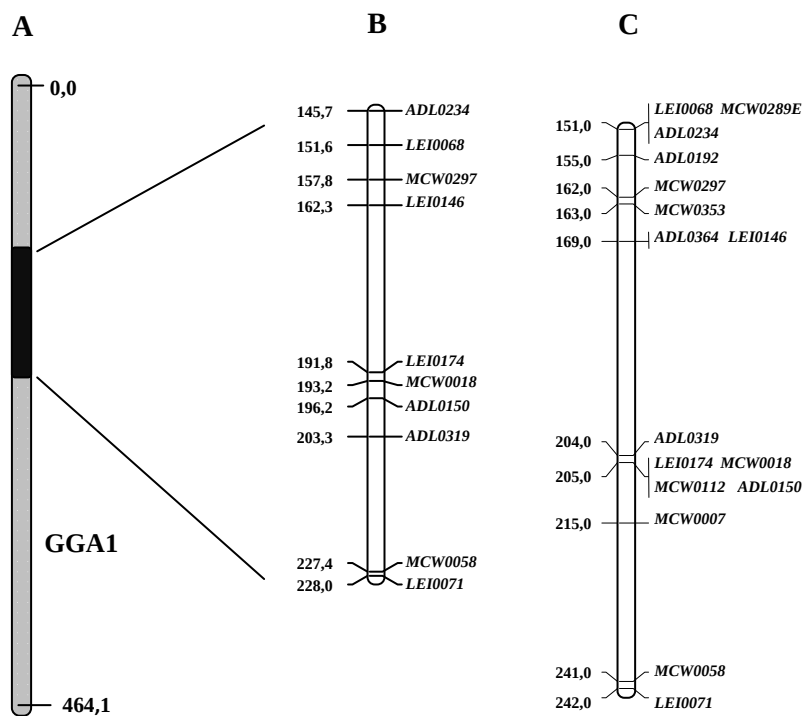


Figura 2 – (A) representa o mapa de ligação do GGA1 obtido por Nones et al. (2005), (B) representa a região genômica de estudo com seus respectivos marcadores e posições em cM (centiMorgans) e (C) representa a região estudada respectiva no Mapa Consenso da galinha (Schmid et al., 2005).

As genotipagens foram conduzidas em duas etapas: (1) genotipagens dos parentais/ F_1 e (2) genotipagens das aves F_2 , cerca de 90 aves de cada família, através do seqüenciador de DNA MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare). Apesar de a amplificação de cada marcador ter sido individual, nas genotipagens utilizou-se uma mistura do produto amplificado de três a quatro marcadores, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado e da fluorescência do *primer*, juntamente com o padrão interno ET-ROX 400® (GE Healthcare). O programa para representação gráfica dos picos de fluorescência e determinação do tamanho dos fragmentos foi o MegaBACE™ *Genetic Profiler Software Suite* (GE Healthcare).

O mapa de ligação foi construído pelo método da verossimilhança, com o auxílio do programa *CRI-MAP* (Green et al., 1990), que utiliza a função de Kosambi para transformar as frações de recombinação estimadas em distâncias de mapa em cM. O programa utiliza como *default* o $LOD = 3$, ou seja, a hipótese dos marcadores estarem ligados é 1000 vezes mais verossímil que a de não estarem.

Mapeamento de QTLs

O método utilizado foi o mapeamento por intervalos, proposto por Lander e Botstein (1989), que emprega regressão linear e estimação por quadrados mínimos e implementado pelo programa *QTL Express* (Seaton et al., 2002). De acordo com a estrutura populacional deste estudo (F_2 ou meios-irmãos) com *pedigree* de três gerações a partir do cruzamento entre linhagens parcialmente endogâmicas, o programa *QTL Express* foi apropriado para esta finalidade. A estrutura populacional F_2 pressupõe que alelos alternativos do QTL estejam fixados nas linhagens fundadoras de corte (QQ) e de postura (qq). Na primeira etapa da análise, a probabilidade de um indivíduo F_2 possuir cada um dos possíveis genótipos do QTL (QQ, Qq, qQ e qq) foi calculada

condicionalmente a cada cM, na dependência do genótipo dos marcadores flanqueadores do intervalo considerado.

As seqüências de análises consistiram em três modelos genéticos: (1) testar o efeito aditivo (a); (2) testar os efeitos aditivos e de dominância (a + d); (3) testar os efeitos aditivos, de dominância e efeito gamético (a + d + i) (*imprinting*: i). Todas estas três etapas foram realizadas. O efeito aditivo é definido como sendo metade da diferença do valor fenotípico dos F₂ homozigóticos para os alelos alternativos do QTL e o efeito de dominância como a diferença entre o valor fenotípico dos heterozigotos em relação à média dos homozigotos (De Koning et al., 1999). O efeito de *imprinting* ou gamético ocorre quando os genomas parentais sofrem modificações durante a gametogênese, resultando na expressão incompleta ou ausência de expressão de alguns genes herdados de um dos genitores (De Koning et al., 2002). O modelo genético-estatístico incluiu os efeitos fixos de sexo, família e incubação.

A análise de meios-irmãos considera que a evidência de QTL vem da segregação dentro de famílias de meios-irmãos, que podem ser paternos ou maternos. Numa verdadeira estrutura de meios-irmãos paternos, cada fêmea teria apenas uma progênie e, por isso, não existiria a informação de segregação dentro das fêmeas (De Koning et al., 1998). Foi realizada também a análise de meios-irmãos maternos, levando em consideração a fêmea como genitor comum, pois neste caso o interesse é a utilização apenas das informações de segregação das fêmeas. As análises de meios-irmãos paternos e maternos, embora não sejam ideais para a estrutura populacional analisada, podem revelar QTLs que não seriam mapeados na análise de F₂.

Nas análises de meios-irmãos, diferentemente da estrutura de F₂, não são feitas pressuposições quanto ao número de alelos ou a fixação de alelos dos QTLs e toda

relação de parentesco adicional entre e dentro dos grupos de meios-irmãos é ignorada. Dentro de cada família de meios-irmãos é calculado o efeito de substituição do alelo do QTL, ou seja, é calculada a probabilidade de cada indivíduo F_2 herdar cada gameta do macho (fêmea) em cada posição. O efeito de substituição foi considerado significativo quando o valor foi duas vezes maior que o erro-padrão. Nas análises simultâneas dos três machos ou sete fêmeas, a regressão foi ajustada dentro de cada macho (fêmea), isto porque nem todos os machos (fêmeas) são heterozigóticos para o QTL e também porque a fase de ligação entre os alelos do QTL e alelos dos marcadores pode variar de macho (fêmea) para macho (fêmea) (Knott et al., 1996). Quando um QTL foi detectado na análise contendo as três ou sete famílias, uma análise individual de cada uma das famílias foi realizada para inferir quais famílias estavam segregando o QTL. O modelo genético-estatístico incluiu os efeitos fixos de sexo e incubação. Na análise individual (dentro de cada família de meios-irmãos paternos ou maternos) correu-se o risco de perda do poder de detecção de QTLs, devido à redução do número de indivíduos analisados, já que são analisadas as famílias separadamente.

Nível de significância

Os níveis de significância foram obtidos de acordo com a proposta de Lander e Kruglyak (1995): genômico (ligação sugestiva, significativo a 5% e 1%), controlando-se, no último caso, a taxa de Erro Tipo I (falso positivo), pois para detectar QTLs, um grande número de testes é necessário. Como estes testes não são independentes, obtém-se um nível de significância que pode gerar falsos QTLs. Para reduzir este problema, o nível de significância no cromossomo foi calculado para obter o nível de significância genômico desejado, proporcional à contribuição do cromossomo ou da região estudada

para o genoma autossômico, como sugerido por De Koning et al. (1999). Esta probabilidade foi calculada pela seguinte equação seguindo a correção de Bonferroni:

$$P_{(genômico)} = 1 - (1 - P_{(cromossomo)})^{1/r}$$

Onde r é a contribuição de um cromossomo, obtida dividindo-se o comprimento da região estudada pelo tamanho do genoma em cM. Foram utilizadas 10.000 permutações para o cálculo dos três níveis de significância, sugeridos por Churchill e Doerge (1994).

A proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL (VF %) foi calculada de acordo com: $VF \% = [(QM_{reduzido} - QM_{completo}) / QM_{reduzido} \times 100]$, onde $QM_{reduzido}$ e $QM_{completo}$ é o quadrado médio do modelo reduzido e completo, respectivamente. O modelo completo incluiu o efeito do QTL (aditividade, dominância ou *imprinting*) além dos efeitos e o modelo reduzido incluiu apenas os efeitos fixos.

Intervalos de confiança

Os intervalos de confiança (IC) foram estimados através da opção *bootstrap with resampling* do programa *QTL Express* (Seaton et al., 2002), determinando intervalos de confiança empíricos a 95% de probabilidade.

Com a finalidade de comparar os resultados deste trabalho com os de Nones et al. (2006) e com a literatura, duas abordagens podem ser utilizadas: comparar os intervalos de confiança estimados ou comparar as regiões do genoma onde os marcadores flanqueadores dos QTLs mapeados estão localizados.

Para comparação dos intervalos de confiança (cM) com a seqüência do genoma (Mb), foi feita a transformação de centiMorgans (cM) em mega pares de bases (Mb). Para isso foi adotada a relação de 1:0,341 (cM:Mb) para o GGA1, de acordo com ArkDB (<http://www.thearkdb.org>; Schmid et al., 2005), onde o mapa de ligação do

GGA1 possui 589 cM e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), onde a sequência do genoma possui 201 Mb. Lembrando que esta relação é um valor médio, já que a taxa de recombinação não é constante ao longo do cromossomo. Esta transformação também foi utilizada para comparações dos intervalos entre marcadores.

Resultados

Na Tabela 2 estão apresentadas as estatísticas descritivas das características fenotípicas medidas nas aves F₂.

Tabela 2 – Estatísticas descritivas das características avaliadas nos animais F₂

Característica	N	Média	Desvio-padrão
PV35 (g)	659	804	136
PV41 (g)	660	1.023	185
PV42 (g)	660	988	182
Pcor (g)	658	6,4	1,6
Ppul (g)	659	8,1	2,2

Peso aos 35 (PV35), 41 (PV41) e 42 dias (PV42), peso do coração (Pcor) e peso dos pulmões (Ppul).

Mapa de ligação da região estudada

O mapa de ligação da região estudada apresentou 110,8 cM e espaçamento médio entre os marcadores de 7,4 cM (Figura 3). O primeiro marcador posicionado no mapa (*ADL0192*) está localizado a 155 cM e o último marcador (*LEI0071*) a 242 cM no Mapa Consenso (Schmid et al., 2005). A maior distância foi de 28,8 cM entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174*, onde estão localizados o gene *IGF1* e o centrômero do

cromossomo. O menor espaçamento obtido foi de 0,9 cM entre os marcadores *MCW0018* e *MCW0007*.

Na média dos 16 marcadores, o número de meioses informativas foi de 914 e de meioses informativas com fase conhecida foi de 646 (Tabela 3). O marcador *MCW0353* foi o menos informativo, enquanto que o *LEI0068* foi o mais informativo. O nível de informatividade baseou-se no número de meioses informativas com fase conhecida.

Tabela 3 - Grau de informação dos marcadores do mapa de ligação parcial do GGA1

Marcadores	Número de meioses informativas	Número de meioses informativas com fase conhecida
<i>ADL0192</i> ¹	491	448
<i>ADL0234</i>	803	803
<i>LEI0068</i>	979	979
<i>MCW0289</i> ¹	968	968
<i>MCW0353</i> ¹	416	284
<i>MCW0297</i>	657	657
<i>ADL0364</i> ¹	1050	590
<i>LEI0146</i>	1265	887
<i>LEI0174</i>	537	537
<i>MCW0018</i>	1155	497
<i>MCW0007</i> ¹	854	854
<i>MCW0112</i> ¹	1118	476
<i>ADL0150</i>	1250	542
<i>ADL0319</i>	726	444
<i>MCW0058</i>	1085	595
<i>LEI0071</i>	1278	772
<i>Média</i>	<i>914</i>	<i>646</i>

¹Marcadores microsatélites adicionados.

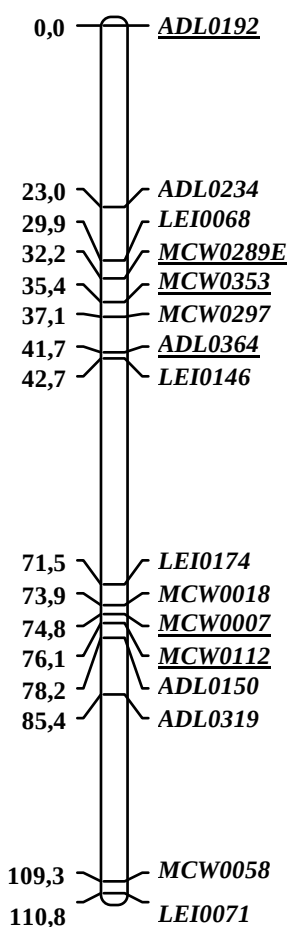


Figura 3 - Mapa de ligação da região estudada do GGA1 obtido com a adição de seis marcadores (sublinhados), contendo as posições em centiMorgans (cM). Para a representação gráfica deste mapa foi utilizado o programa *MapChart*, versão 2.1 (Voorrips, 2002). O primeiro marcador foi o *ADL0192* posicionado a 155 cM no Mapa Consenso (Schmid et al., 2005).

Mapeamento de QTLs com estrutura F_2

Em um único intervalo (*LEI0146-LEI0174*), compreendendo 28,8 cM, foram mapeados QTLs para todas as características estudadas, com exceção dos rendimentos de coração e pulmões (Tabela 4, Figura 4). Os QTLs com significância de 1% no genoma foram associados com PV35, PV41, Pcor e Ppul. Neste intervalo estão localizados o gene *IGF1* e o centrômero do cromossomo.

Tabela 4 - QTLs mapeados no intervalo entre *LEI0146* e *LEI0174*

Característica ¹	Valor de F ²	Posição (cM) ³	IC (cM) ⁴	Efeito aditivo (EP)	VF % ⁵
PV35	24,7**	54	2 - 96,5	32,86 (7,41)	3,7
PV41	21,8**	53	0 - 97	45,11 (9,66)	3,2
Pcor	29,1**	49	24 - 102	0,43 (0,08)	4,3
Ppul	22,8**	43	39 - 52	0,53 (0,11)	3,4
Rcor	5,6	43	0 - 110	0,01 (0,01)	0,7
Rpul	7,3	43	32 - 109	0,02 (0,01)	1,1

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). ²Razão F: **Ligação significativa a 1% no genoma. ³Primeiro marcador: *ADL0192* (155 cM no Mapa Consenso). ⁴IC: intervalo de confiança. ⁵VF (%): proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL. EP: erro-padrão.

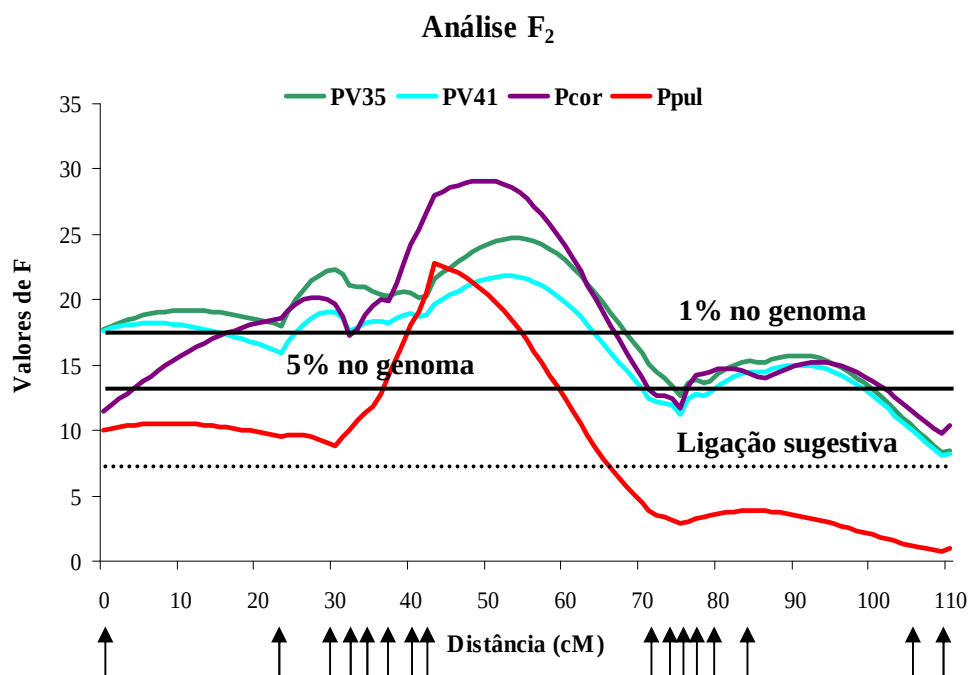


Figura 4 – Valores de F obtidos na análise de mapeamento de QTLs no modelo de F₂ no GGA1. As setas representam a localização dos marcadores microsatélites utilizados. O primeiro marcador foi o *ADL0192* posicionado a 155 cM no Mapa Consenso (Schmid et al., 2005). As três linhas horizontais representam os níveis de significância aproximados para todas as características.

Todos os QTLs mapeados apresentaram efeito aditivo positivo (Tabela 4). Os efeitos de dominância e efeito gamético (*imprinting*) dos QTLs não foram significativos. A proporção da variância fenotípica total explicada pelos QTLs variou de 3,2 a 4,3% (Tabela 4).

Os intervalos de confiança obtidos foram em média 70,6 cM. O menor intervalo obtido foi para o Ppul (13,0 cM), enquanto que o maior foi para PV41 (97,0 cM).

Mapeamento de QTLs com estrutura de meios-irmãos paternos (Conjunta e Individual)

Na análise Conjunta (Tabela 5) foram mapeados QTLs para: PV35, PV41, Pcor e Ppul e na análise Individual (Tabela 6) para: PV35, PV41, Pcor, Ppul e Rpul (família 7716) e para Pcor e Rcor (família 7822). Nenhum QTL foi identificado na família 7769. Os intervalos de confiança variaram de 47,0 a 95,0 cM (Análise Conjunta) e de 40,0 a 93,0 cM (Análise Individual). A proporção da variância fenotípica total atribuída aos QTLs mapeados variou de 2,6 a 4,3% (Conjunta) e de 4,1 a 14,7% (Individual), com destaque para os QTLs mapeados na família 7716 para PV35, PV41 e Ppul, que explicaram quase 15% da variância fenotípica total.

Na análise Conjunta, os QTLs para PV35, PV41, Pcor e Ppul estão segregando na família 7716, enquanto um QTL para Pcor também está segregando na família 7822 (Tabela 5). Na análise Individual (Tabela 6) QTLs para PV35, PV41, Pcor, Ppul e Rpul estão segregando na família 7716 e QTLs para Pcor e Rcor estão segregando na família 7822. Nenhum QTL está segregando na família 7769 nas duas análises (Conjunta e Individual).

Tabela 5 - QTLs mapeados na análise Conjunta de meio-irmãos paternos

Característica ¹	Valor de F ²	Posição (cM) ³	Marcadores flanqueadores	IC (cM) ⁴	Efeito de substituição (EP)	Macho	VF % ⁵
PV35	6,5**	81	ADL0150-ADL0319	0 - 92,5	88,25 (20,29) 7,21 (18,07) 13,72 (20,43)	7716 7769 7822	2,6
PV41	9,2**	83	ADL0150-ADL0319	0 - 95	121,08 (23,16) 0,08 (21,02) 12,37 (23,37)	7716 7769 7822	3,8
Pcor	8,5**	51	LEI0146-LEI0174	23 - 107	0,78 (0,21) 0,26 (0,17) 0,70 (0,22)	7716 7769 7822	3,5
Ppul	10,4**	53	LEI0146-LEI0174	39 - 86	1,76 (0,33) 0,51 (0,27) 0,58 (0,35)	7716 7769 7822	4,3
Rcor	2,6	23	ADL0192-ADL0234	16 - 110	0,01 (0,02) 0,01 (0,01) 0,05 (0,02)	7716 7769 7822	0,7
Rpul	3,9	43	LEI0146-LEI0174	9 - 110	0,07 (0,02) 0,03 (0,02) 0,02 (0,03)	7716 7769 7822	1,1

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). ²Razão F: **ligação significativa a 1% no genoma. ³Primeiro marcador: ADL0192 (155 cM no Mapa Consenso). ⁴IC: intervalo de confiança. ⁵VF (%): proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL. Os efeitos de substituição em negrito foram significativos. EP: erro-padrão.

Tabela 6 - QTLs mapeados na análise Individual de meio-irmãos paternos

Característica ¹	Valor de F ²	Posição (cM) ³	Marcadores flanqueadores	IC (cM) ⁴	Efeito de substituição (EP)	VF % ⁵
<i>Família 7716</i>						
PV35	29,8 ^{**}	80	ADL0150-ADL0319	22,5 - 93	84,81 (15,53)	14,7
PV41	29,7 ^{**}	80	ADL0150-ADL0319	56 - 96	117,49 (21,55)	14,7
Pcor	14,4 ^{**}	91	ADL0319-MCW0058	32 - 109	0,94 (0,25)	7,4
Ppul	29,4 ^{**}	57	LEI0146-LEI0174	45 - 87	1,81 (0,33)	14,5
Rcor	0,3	109	MCW0058-LEI0071	2 - 110	0,01 (0,02)	0,0
Rpul	7,9 ⁺	43	LEI0146-LEI0174	40 - 109	0,08 (0,03)	4,1
<i>Família 7822</i>						
PV35	3,0	43	LEI0146-LEI0174	0 - 110	31,98 (18,46)	1,2
PV41	1,9	43	LEI0146-LEI0174	0 - 110	33,17 (23,50)	0,6
Pcor	14,4 [*]	44	LEI0146-LEI0174	23 - 109	0,77 (0,20)	7,8
Ppul	0,2	75	MCW0007-MCW0012	0 - 110	0,15 (0,30)	0,0
Rcor	10,5 ⁺	23	ADL0192-ADL0234	17 - 110	0,06 (0,02)	5,9
Rpul	0,7	75	MCW0007-MCW0012	0 - 110	0,02 (0,03)	0,0
<i>Família 7769</i>						
PV35	3,3	13	ADL0192-ADL0234	0 - 110	37,74 (20,69)	0,8
PV41	4,6	15	ADL0192-ADL0234	0 - 110	43,50 (20,18)	1,3
Pcor	5,1	23	ADL0192-ADL0234	14 - 110	0,32 (0,15)	1,5
Ppul	5,0	6	ADL0192-ADL0234	0 - 110	0,60 (0,27)	1,5
Rcor	0,7	109	MCW0058-LEI0071	0 - 110	0,01 (0,01)	0,0
Rpul	1,9	109	MCW0058-LEI0071	0 - 110	0,03 (0,02)	4,2

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). ²Razão F: ^{*}ligação sugestiva; ^{*}ligação significativa a 5% no genoma; ^{**}ligação significativa a 1% no genoma. ³Primeiro marcador: ADL0192 (155 cM no Mapa Consenso 2005). ⁴IC: intervalo de confiança. ⁵VF (%): proporção da variância fenotípica explicada pelo QTL. Os efeitos de substituição em negrito foram significativos. EP: erro-padrão.

Mapeamento de QTLs com estrutura de meios-irmãos maternos (Conjunta e Individual)

Na análise Conjunta (Tabela 7) foram mapeados QTLs sugestivos para: PV41, Pcor e Ppul e na análise Individual (Tabela 8) foram mapeados QTLs sugestivos para: PV41 (família 7810), Rcor (família 7816) e para Pcor (família 7971). Nenhum QTL foi identificado nas famílias 7978, 7709, 7749 e 7765.

Na análise Conjunta o QTL para PV41 está segregando nas famílias 7810 e 7971; o QTL para Pcor está segregando na família 7749 e o QTL para Ppul está segregando nas famílias 7749 e 7709 (Tabela 7); enquanto que na análise Individual os QTLs para PV41, Rcor e Pcor estão segregando em três famílias (7810, 7816 e 7971, Tabela 8).

Na análise Conjunta os QTLs para Pcor e Ppul e na análise Individual, o QTL para Rcor, foram todos mapeados no intervalo entre *LEI0068* e *MCW0289E*. O QTL mapeado para PV41 nas duas análises foi mapeado no mesmo intervalo (*ADL0319-MCW0058*).

Na Figura 5 pode-se observar todos os QTLs significativos e sugestivos mapeados nas diferentes análises: F₂ e meios-irmãos (paternos e maternos, Conjunta e Individual). A maioria dos QTLs foi mapeada no intervalo entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174*. Também pode-se observar os QTLs mapeados no estudo de Nones et al. (2006) para comparação dos intervalos.

Tabela 7 - QTLs mapeados na análise Conjunta de meios-irmãos maternos

Característica ¹	Valor de F ²	Posição (cM) ³	Marcadores flanqueadores	Fêmea	Efeito de substituição (EP)
PV41	2,9 ⁺	92	<i>ADL0319-MCW0058</i>	7810	116,19 (39,41)
				7978	40,13 (33,92)
				7709	8,35 (38,52)
				7749	38,85 (33,39)
				7816	41,67 (35,04)
				7765	3,87 (40,99)
				7971	88,45 (33,56)
Pcor	2,9 ⁺	30	<i>LEI0068-MCW0289E</i>	7810	0,56 (0,37)
				7978	0,19 (0,25)
				7709	0,33 (0,25)
				7749	0,79 (0,26)
				7816	0,43 (0,27)
				7765	0,50 (0,30)
				7971	0,43 (0,30)
Ppul	2,9 ⁺	32	<i>LEI0068-MCW00289E</i>	7810	0,32 (0,55)
				7978	0,21 (0,39)
				7709	0,93 (0,40)
				7749	1,15 (0,42)
				7816	0,68 (0,42)
				7765	0,45 (0,46)
				7971	0,81 (0,44)
Rcor	2,1	0	<i>ADL0192-ADL0234</i>	7810	0,06 (0,04)
				7978	0,03 (0,04)
				7709	2,00 (0,02)
				7749	0,11 (0,04)
				7816	0,06 (0,04)
				7765	0,02 (0,04)
				7971	0,05 (0,05)
Rpul	2,7	32	<i>LEI0068-MCW00289E</i>	7810	0,02 (0,05)
				7978	0,03 (0,03)
				7709	0,05 (0,03)
				7749	0,09 (0,03)
				7816	0,05 (0,03)
				7765	0,07 (0,04)
				7971	0,07 (0,04)

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). ²Razão F: ⁺ligação sugestiva. ³Primeiro marcador: *ADL0192* (155 cM no Mapa Consenso). Os efeitos de substituição em negrito foram significativos. EP: erro-padrão.

Tabela 8 - QTLs sugestivos mapeados na análise Individual de meios-irmãos maternos

Característica ¹	Valor de F ²	Posição (cM) ³	Marcadores flanqueadores	Efeito de substituição (EP)
<i>Família 7810</i>				
PV41	7,6 ⁺	87	<i>ADL0319-MCW0058</i>	112,47 (40,88)
<i>Família 7816</i>				
Rcor	8,5 ⁺	32	<i>LEI0068-MCW0289E</i>	0,078 (0,03)
<i>Família 7971</i>				
Pcor	7,3 ⁺	110	<i>MCW0058-LEI0071</i>	0,76 (0,28)

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). ²Razão F: ⁺ligação sugestiva. ³Primeiro marcador: *ADL0192* (155 cM no Mapa Consenso). Os efeitos de substituição em negrito foram significativos. EP: erro-padrão.

Discussão

Este estudo teve como motivação os resultados de Nones et al. (2006), que identificaram QTLs no intervalo entre os marcadores *ADL0234* e *LEI0071* do GGA1, além de outros estudos que também identificaram QTLs nesta região (Sewalen et al., 2002; Kerje et al., 2003; Jennen et al., 2005). No presente estudo, o objetivo foi melhorar a resolução de mapeamento destes QTLs, sendo o primeiro estudo de mapeamento fino realizado nesta população F₂ brasileira de galinhas. O GGA1 é o maior cromossomo da galinha, onde já foram mapeados 129 QTLs dentre os 791 já descritos nos 39 cromossomos (<http://www.animalgenome.org/QTLdb>).

A extensão do mapa de ligação da região estudada do GGA1 aumentou de 82,3 cM (Nones et al., 2005) para 110,8 cM (ou 37,78 Mb, Anexo I), enquanto que no mapa Consenso (Schmid et al., 2005), esta região equivale a 91 cM. Houve diminuição do intervalo médio entre os marcadores de 9,2 cM (Nones et al., 2005) para 7,4 cM no trabalho atual.

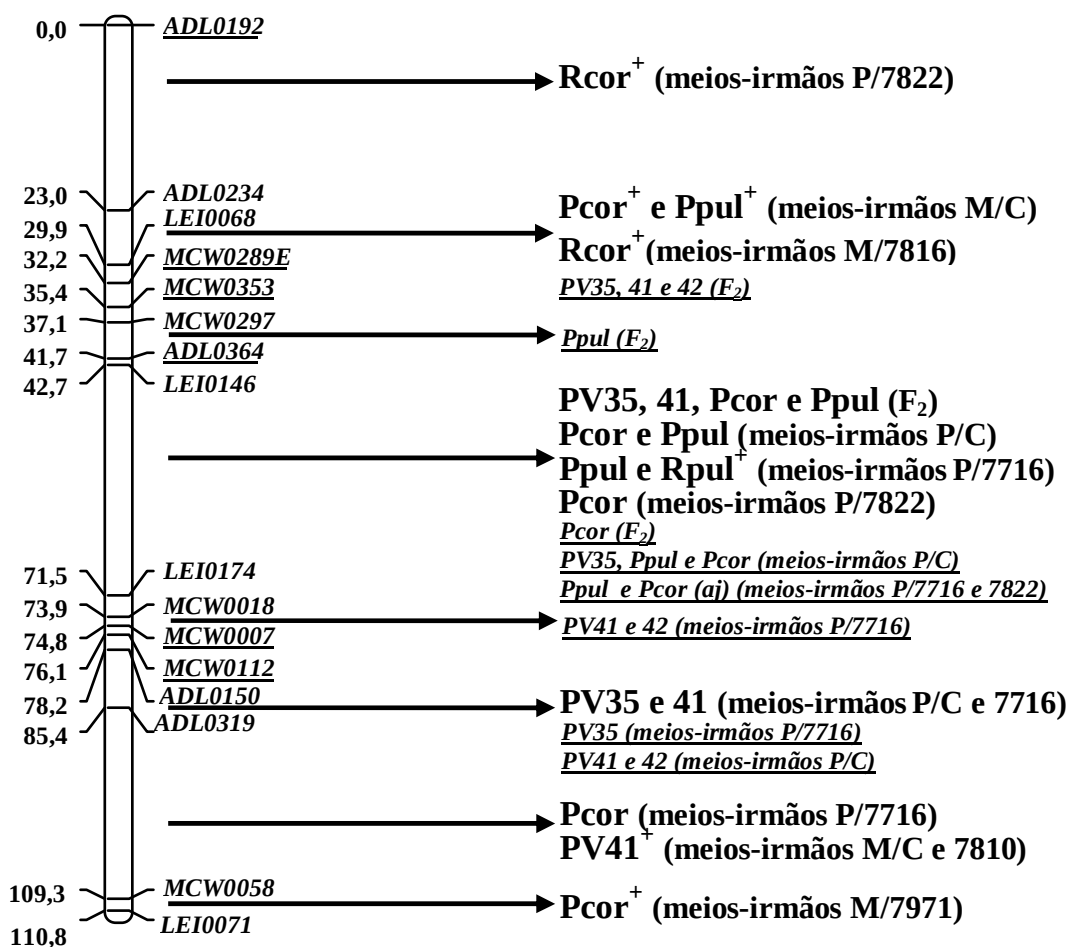


Figura 5 - Mapa de ligação da região estudada do GGA1 com os respectivos marcadores microssatélites em cM (centiMorgans) e a indicação da posição dos QTLs significativos e sugestivos (+) mapeados pelas diferentes análises. Entre parênteses: tipo de análise utilizada. P= paternos e M= maternos. C= análise Conjunta. O primeiro marcador foi o ADL0192 posicionado a 155 cM no Mapa Consenso (Schmid et al., 2005). Em itálico e sublinhado: QTLs mapeados no estudo de Nones et al. (2006).

Ao se comparar o mapa EMBRAPA (Nones et al., 2005) com o deste trabalho, nos quais foram utilizados a mesma população e número de animais, porém seis marcadores adicionais, observa-se que não houve inversão de marcadores. No entanto, houve inversão de vários marcadores em relação ao mapa Consenso da galinha (Schmid

et al., 2005), que foram: *ADL0192↔LEI0068/MCW289E*, *MCW0353↔MCW0297* e *MCW0007↔ADL0319*. O menor espaçamento obtido foi de 0,9 cM (*MCW0018* e *MCW0007*) que equivale a 0,31 Mb ou 310.000 pb (Anexo I). O maior espaçamento foi de 28,8 cM ou 9,82 Mb (Anexo I) entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174*. Mesmo com a adição de dois novos marcadores nesta região (*MCW0353* e *ADL0364*), nenhum deles foi posicionado no intervalo entre *LEI0146* e *LEI0174* e este permaneceu com quase 30 cM.

De acordo com Schmid et al. (2000), o centrômero do GGA1 está localizado entre os marcadores *ALVE1* (204 cM no mapa Consenso) e o gene *GAPDH* (241 cM). Adotando a relação de 1:0,341 (cM:Mb) para o GGA1, no genoma, este intervalo corresponde de 64,1 a 75,7 Mb. Segundo Galkina et al. (2006), o centrômero está localizado entre os marcadores *MCW0112* (205 cM ou 61,6 Mb) e *LEI0101* (259 cM ou 75,3 Mb). No atual trabalho, o intervalo entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* está posicionado aproximadamente entre 67,4 a 77,2 Mb (Anexo I), compreendendo a região do centrômero, segundo os autores citados.

O centrômero é uma constrição primária que divide o cromossomo em dois braços e influi no movimento durante a divisão celular. Plantas e animais possuem seqüências altamente repetitivas nos centrômeros, como os DNA α satélites, o que confunde até os mais poderosos métodos de mapeamento (Henikoff et al., 2001). As regiões de centrômero foram omitidas pelo Projeto Genoma Humano devido à sua natureza repetitiva e esperada escassez de genes. Apesar de estas regiões serem freqüentemente consideradas difíceis de seqüenciar, o desafio não é o seqüenciamento propriamente dito, mas sim a montagem das seqüências, devido ao elevado grau de

homogeneidade entre as muitas centenas ou milhares de cópias de uma sequência repetida (Rud e Willard, 2004).

Wicker et al. (2005) estudaram as seqüências repetitivas no genoma da galinha e observaram que os pequenos cromossomos possuem mais genes e menor quantidade de seqüências repetitivas que os grandes cromossomos. Em alguns casos, a densidade de seqüências repetitivas aumenta nas regiões próximas aos centrômeros e telômeros. Os autores também afirmaram que muitas das seqüências repetitivas não foram representadas no genoma da galinha publicado (Schmid et al., 2000), e isto inclui regiões centroméricas. Por isso, o intervalo de cerca de 30 cM, entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174*, que está localizado na região de centrômero do cromossomo, talvez seja maior do que a relatada nos mapas físicos. Muitos genes estão localizados neste intervalo (*LEI0146-LEI0174*). Um levantamento feito no banco público de dados *GenBank* (NCBI, 2008) revelou 117 genes nesta região no genoma, dentre eles o *IGF1*, *PTN* (*pleiotrophin*), *MTPN* (*myotrophin*), *ADIPOR2* (*adiponectin receptor 2*), *JARID1A*, entre outros.

Os QTLs para PV35, PV41, Pcor e Ppul foram mapeados apenas em um intervalo de marcadores (*LEI0146-LEI0174*) na análise de F₂. Isso sugere possivelmente a presença de somente um QTL com efeito pleiotrópico, ou seja, atuando no controle de várias características. Porém, a possibilidade de serem vários QTLs ligados nesta região não pode ser descartada, devendo ser testada com análises envolvendo múltiplas características simultaneamente. Nones et al. (2006) mapearam QTLs para as mesmas características, porém em diferentes posições (Figura 1). O QTL para Pcor foi mapeado no intervalo entre *LEI0146-LEI0174*, enquanto o QTL para Ppul foi mapeado entre *MCW0297* e *LEI0146*, e os QTLs associados ao PV35 e PV41 foram mapeados entre

LEI0068 e *MCW0297*, intervalo próximo ao obtido neste estudo (Figura 5). Quando se compara os intervalos de marcadores dos QTLs mapeados por Nones et al. (2006) com os mapeados no trabalho atual, observa-se que não houve redução dos intervalos.

Os IC variaram de 13 a 97 cM, que corresponde a 4,40 a 33,07 Mb (Anexo I). A proporção da variância fenotípica total na F_2 atribuída a um QTL variou de 3,2 a 4,3%, enquanto que Nones et al. (2006) obtiveram valores semelhantes, de 1,3 a 4,0% para os QTLs mapeados para as mesmas características. Todos os QTLs apresentaram efeito aditivo positivo, indicando que os alelos que conferem maiores pesos vivos e pesos do coração e pulmões são originários da linhagem de corte.

Diversos QTLs foram mapeados com análise de F_2 no GGA1, entre os marcadores *ADL0234* e *LEI0071*. Sewalen et al. (2002) identificaram no GGA1 um QTL significativo para peso as 3 semanas entre os marcadores *LEI0068* (151 cM no mapa Consenso 2005) e *LEI0046* (169 cM) e um significativo para peso as 6 semanas entre *LEI0146* (169 cM) e *MCW0018* (205 cM). Onze QTLs foram mapeados no intervalo entre *MCW0010* (72 cM) e *ADL0019* (122 cM) para características de crescimento, sendo um de grande efeito que explicou 21,6% de variância fenotípica (Kerje et al., 2003). Jennen et al. (2005) identificaram QTL para peso vivo as 7 semanas entre *MCW0018* (205 cM) e *MCW0058* (241 cM). Todos estes QTLs relatados foram mapeados próximos ou dentro da região estudada (Figura 2), indicando a importância desta região e, a presença de genes responsáveis por estas características.

Os mesmos QTLs mapeados no presente estudo nas análises Conjunta e Individual de meios-irmãos paternos foram mapeados por Nones et al. (2006). No atual estudo, na análise Individual (famílias 7716 e 7822) foram mapeados dois QTLs sugestivos para R_{pul}, que não tinham sido detectados anteriormente (Nones et al.,

2006). Alguns QTLs foram mapeados no mesmo intervalo, como foi o caso do QTL para Pcor e Ppul (Conjunta e Individual). Já os QTLs para pesos vivos foram mapeados em outros intervalos (*MCW0018-ADL0150* e *ADL0150-ADL0319*). Os QTLs mapeados na família 7716, para PV35, PV41 e Ppul explicaram cerca de 15% da variância fenotípica total.

As análises dentro de famílias (Individual) indicaram que os principais QTLs estão segregando em apenas uma das famílias de meios-irmãos paternos (família 7716), onde cinco QTLs foram mapeados (Tabela 6), enquanto que na família 7822 apenas dois foram mapeados (Tabela 6). Isso também foi detectado no estudo de Nones et al. (2006), confirmando a importância da primeira família. A análise Individual parece refletir, em alguns casos, os resultados da análise Conjunta.

Nas duas análises de meios-irmãos maternos, Conjunta e Individual, foram mapeados apenas QTLs sugestivos, provavelmente porque o poder de detecção de QTLs é menor em função do número de indivíduos ser mais reduzido. As famílias 7810 e 7971 estão segregando QTLs tanto na análise Individual, como na Conjunta. Na Figura 5 pode-se observar que todos QTLs mapeados estão localizados em três intervalos de marcadores. Os QTL sugestivos para Pcor mapeados nas análises de meios-irmãos paternos (7716) e maternos (7971) foram posicionados em intervalos adjacentes.

Com esta análise pode-se complementar os resultados obtidos com as outras análises. A família 7716 é importante, conforme foi evidenciado pelos resultados da análise de meios-irmãos paternos. Este macho F_1 7716 foi acasalado com as fêmeas 7810 e 7978 (Tabela 1). Na análise de meios-irmãos maternos, as fêmeas 7810 e 7971 revelaram-se como as mais importantes. Analisando estes resultados em conjunto, os casais F_1 7716 x 7810 e 7822 x 7971 são merecedores de investigação mais

aprofundada. Tudo indica que os QTLs estão segregando nas progênies destes dois casais, e, por isso, os estudos de identificação de polimorfismos em genes candidatos deverão ser focados nestes animais.

As características que foram associadas aos QTLs mapeados neste trabalho, como peso vivo, peso do coração e dos pulmões são de extrema importância para a avicultura. Os frangos de corte vêm sendo selecionados em programas de melhoramento para elevado peso vivo, conversão alimentar, rendimento de carcaça e partes nobres, o que vem resultando em um substancial aumento na velocidade de crescimento. Porém, os órgãos vitais, como o coração e os pulmões, que nas linhagens de corte apresentam um tamanho relativo reduzido quando comparados com os de linhagens de postura. Estas limitações anatômicas e fisiológicas da circulação sangüínea nos pulmões e coração têm levado os frangos de corte à síndrome de hipertensão pulmonar, que pode resultar em grande acúmulo de fluido na cavidade abdominal, quadro este denominado de ascite, conduzindo o animal à morte ou à condenação de carcaça (Rosário et al., 2004; Hassanzadeh et al., 2005).

Avaliando linhagens comerciais de frangos de corte, de acordo com os trabalhos de Rance et al. (2002) e Gaya et al. (2004), as herdabilidades estimadas para peso do coração foram moderadas, com valores de $0,30 \pm 0,08$ e $0,38 \pm 0,04$, respectivamente. Já na população F_2 da EMBRAPA as herdabilidades para peso do coração e dos pulmões foram baixas, com valores de 0,11 e 0,10, respectivamente (Ledur et al., 2006). Estes resultados são interessantes, pois demonstram que existe variabilidade genética que pode ser explorada com o intuito de selecionar aves com maior peso de coração. Isso pode favorecer a obtenção de híbridos comerciais que sejam mais resistentes à incidência de desordens metabólicas (Gaya et al. 2006). Portanto, os pesos do coração e

dos pulmões devem ser utilizados como critério de seleção nos programas de melhoramento genético. Adicionalmente, os QTLs mapeados para peso do coração e pulmões neste trabalho poderão ser utilizados para a seleção de genes candidatos por posição e função, favorecendo a identificação de genes responsáveis pelo controle destas características.

A adição de seis marcadores microssatélites permitiu confirmar os QTLs mapeados por Nones et al. (2006), embora todos QTLs na análise de F_2 tenham sido mapeados no maior intervalo do mapa de ligação (cerca de 30 cM), onde está localizado o centrômero do cromossomo. Não foi possível reduzir os intervalos onde foram mapeados estes QTLs. As diferentes análises conduzidas permitiram selecionar apenas dois casais, que devem ser alvo dos próximos trabalhos. Este estudo possibilitou restringir a busca por genes candidatos responsáveis pelas características analisadas, para dois casais F_1 e uma região de 28,8 cM (9,82 Mb) no GGA1, onde existem 117 genes descritos em bancos de dados (NCBI, 2009).

Agradecimentos

Este projeto recebeu auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A primeira autora recebeu bolsa que foi concedida pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP).

Referências Bibliográficas

- Abasht B, Dekker SJCM and Lamont SJ (2006) Review of quantitative trait loci identified in the chicken. *Poult Sci*, 85 (12): 2079-2096.
- Atwood LD and Heard-Costa N (2003) Limits of fine-mapping a quantitative trait. *Genet Epidemiology* 24 (22): 99-106.

- Burt DW (2004) Chicken genomics charts a path to the genome sequence. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 3 (1): 60-67.
- Churchill GA and Doerge RW (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138 (3): 963-971.
- Cogburn LA, Wang X, Carre W, Rejto L, Porter TE, Aggrey SE and Simon J (2003) Systems-wide chicken DNA microarrays, gene expression profiling and discovery of functional genes. *Poult Sci* 82 (6): 939-951.
- De Koning DJ, Visscher PM, Knott SA and Haley CS (1998) A strategy for QTL detection in half-sib populations. *Animal Sci* 67: 257-268.
- De Koning DJ, Janss LL, Rattink AP, van Oers PA, de Vries BJ, Groenen MA, van der Poel JJ, de Groot PN, Brascamp EW and van Arendonk JA (1999) Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus scrofa*). *Genet* 152 (4):1679-1690.
- De Koning DJ, Bovenhuis H and Arendonk JAM (2002) On the detection of imprinted quantitative trait loci in experimental crosses of outbred species. *Genet* 161: 931-938.
- Figueiredo EAP, Schmidt GS, Ledur MC, Avila VS, Brum PAR, Fiorentin L and Jaenisch FRF (2003a) Genetic gain in egg production and egg weight in White Legorn Embrapa 011. *Proceedings of the IX World Conference on Animal Production, XVIII Reunião da Associação Latinoamericana de Produção Animal, Porto Alegre, CD-ROM.*
- Figueiredo EAP, Rosa PS, Scheuermann GN, Jaenisch FRF, Schmidt GS, Ledur MC, Brentano L and Costa CAF (2003b) Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. *Proceedings of the IX World Conference on Animal Production, XVIII Reunião da Associação Latinoamericana de Produção Animal, Porto Alegre, CD-ROM.*
- Galkina S, Deryusheva S, Fillon V, Vignal A, Crooijmans R, Groenen M, Rodionov A and Gaginskaya E (2006) FISH on avian lampbrush chromosomes produces higher resolution gene mapping. *Genetica* 128 (1-3): 241-51.
- Gaya LG, Ferraz JBS, Mattos EC, Rezende FM, Figueiredo LG, Mourão GB, Filho TM and Eler JP (2004) Estimativa de parâmetros genéticos do peso do coração em linhagem macho de frangos de corte. *Proceedings of the V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, Pirassununga.*

- Gaya LG, Mourão GB and Ferraz JBS (2006) Aspectos genético-quantitativos de características de desempenho, carcaça e composição corporal em frangos. *Cienc Rural* 36 (2): 709-716.
- Grapes L, Firat MZ, Dekkers JCM, Rothschild MF and Fernando RL (2006) Optimal haplotype structure for linkage disequilibrium-based fine mapping of quantitative trait loci using identity-by-descent. *Genet* 172 (3):1955-1965.
- Green P, Falls K and Crooks S (1990) CRI-MAP Program version 2.4. Washington University School of Medicine, St. Louis.
- Hassanzadeh M, Gilanpour H, Charkhkar S, Buyse J and Decuypere E (2005) Anatomical parameters of cardiopulmonary system in three different lines of chickens: further evidence for involvement in ascites syndrome. *Avian Pathol* 34(3):188-93.
- Henikoff, S, Ahmad K and Malik HS (2001) The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Sci* 293 (5532): 1089-1102.
- Jennen DG, Vereijken AL, Bovenhuis H, Crooijmans RM, van der Poel JJ and Groenen MA (2005) Confirmation of quantitative trait loci affecting fatness in chickens. *Genet Sel Evol* 37 (2):215-228.
- Kerje S, Carlborg O, Jacobsson L, Schütz K, Hartmann C, Jensen P and Andersson L (2003) The twofold difference in adult size between the red junglefowl and white leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. *Anim Genet* 34 (4): 264-274.
- Knott SA, Elsen JM and Haley CS (1996) Methods for multiple-marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. *Theor Appl Genet* 93: 71-80.
- Lander ES and Botstein D (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genet*, 121 (1): 185-199.
- Lander E and Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 11 (3): 241-247.
- Ledur MC, Melo CMR, Nones K, Zanella EL, Ninov K, Bonassi CA, Jaenisch FRF, Moura ASAMT, Coutinho LL and Schmidt GS (2006) Genetic and phenotypic parameters for organs, body and carcass weights, and haematocrit value, in a broiler x layer cross resource population. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Belo Horizonte.
- Mackay TFC (2004) Complementing complexity. *Nat Genet* 36:1145-1147.

- Nones K, Ledur MC, Ruy DC, Baron EE, Moura ASAMT and Coutinho LL (2005) Genetic linkage map of chicken chromosome 1 from a Brazilian resource population. *Sci Agric* 62: 12-17.
- Nones K, Ledur MC, Ruy DC, Baron EE, Melo CMR, Moura ASAMT, Zanella EL, Burt DW and Coutinho LL (2006) Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. *Anim Genet* 37 (2): 95-100.
- Rance KA, McEntee GM and McDevitt RM (2002) Genetic and phenotypic relationships between and within support and demand tissues in a single line of broiler chicken. *British Poult Sci* 43 (4): 518-527.
- Rosário MF, Silva MAN, Coelho AAD and Savino VJM (2004) Síndrome ascítica em frangos de corte: uma revisão sobre a fisiologia, avaliação e Perspectivas. *Cienc Rural* 34 (6): 1987-1996.
- Rud MK and Willard HF. (2004) Analysis of the centromeric regions of the human genome assembly. *Trends in Genetics* 20 (11): 529-533.
- Schmid M, Nanda I, Guttenbach M, Steinlein C, Hoehn M, Scharl M, Haaf T, Weigend S, Fries R, Buerstedde JM *et al.* (2000) First report on chicken genes and chromosomes 2000. *Cytogenet Cell Genet* 90 (3-4): 169-218.
- Schmid M, Nanda I, Hoehn H, Scharl M, Haaf T, Buerstedde JM, Arakawa H, Caldwell RB, Weigend S, Burt DW *et al.* (2005) Second report on chicken genes and chromosomes 2005. *Cytogenet Genome Res* 109 (4): 415-479.
- Seaton G, Haley CS, Knott SA, Kearsey M and Visscher PM (2002) QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformat* 18 (2): 339-340.
- Sewalen A, Morrice DM, Law A, Windsor D, Haley CS, Ikeobi CON, Burt DW and Hocking PM (2002) Mapping of quantitative trait loci for body weight at three, six and nine weeks of age in a broiler layer cross. *Poult Sci* 81 (12): 1775-1781.
- Voorrips RE (2002) MapChart Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93 (1): 77-78.
- Wicker T, Robertson JS, Schulze SR, Feltus FA, Magrini V, Morrison JA, Mardis ER, Wilson RK, Peterson DG, Paterson AH and Ivarie R (2005) The repetitive landscape of the chicken genome. *Genome Res* 15: 126-136.

Zhou H, Deeb N, Evock-Clover CM, Ashwell CM and Lamont SJ (2006) Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. I. Growth and average daily gain. Poult Sci 85 (10): 1700-1711.

Internet Resources Section

ARKDB Genomes, <http://www.thearkdb.org> (15 April 2006, 5 June 2006 and 17 June 2009).

National Center for Biotechnology Information (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (11 October 2006, 12 February 2008 and 17 June 2009).

CAPÍTULO 3

POLIMORFISMOS NOS GENES *IGF1* E *JARID1A* E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO DA GALINHA

Polimorfismos nos genes *IGF1* e *JARID1A* e associação com características de crescimento da galinha¹

**Clarissa Boschiero², Erika Cristina Jorge³, Kerli Ninov³, Nirlei Aparecida Silva³,
Mônica Corrêa Ledur⁴, Luiz Lehmann Coutinho³, Ana Silvia Alves Meira Tavares
Moura²**

¹Este projeto recebeu suporte financeiro do CNPq

²UNESP, Departamento de Produção Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, Brasil. E-mail: anamoura@fca.unesp.br

³USP, Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, ESALQ, Piracicaba, SP, Brasil

⁴EMBRAPA Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil

RESUMO

O gene *fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1)* tem sido intensamente estudado, pois está associado com crescimento, proliferação e diferenciação dos músculos, cartilagens e ossos. O gene *Jumonji, domínio interativo 1A rico em AT (JARID1A)* está relacionado com modificações da cromatina, regulação da transcrição e proliferação celular, diferenciação celular e desenvolvimento embrionário. O presente trabalho teve como objetivo buscar polimorfismos nestes dois genes e testar a associação dos polimorfismos e de seus haplótipos com peso vivo, peso do coração e dos pulmões na galinha. Para a identificação de polimorfismos foram utilizadas aves oriundas da população experimental F₂ da Embrapa Suínos e Aves, pertencentes a duas linhagens parentais distintas: seis machos TT (corte) e seis fêmeas CC (postura). Também foram avaliadas dez aves TC pertencentes a geração F₁. Seis regiões compreendendo introns e/ou exons de cada um dos genes *IGF1* e *JARID1A* foram amplificadas e seqüenciadas. Quatro polimorfismos de uma única base (SNP) foram identificados numa região de intron do *IGF1* e nove polimorfismos em seis regiões distintas gene *JARID1A*, quatro dos quais, em exons. Dois polimorfismos, um de cada gene, foram selecionados para a genotipagem de 165 aves F₂. Os polimorfismos

47920G>A (*IGF1*) e 34208C>T (*JARID1A*) foram associados com peso vivo aos 41 dias de idade e peso do coração. As interações sexo x genótipo do polimorfismo 34208C>T e sexo x diplótipos (combinação dos genótipos dos dois polimorfismos) foram também associadas com PV41. O alelo C pode estar envolvido com a diferença no peso vivo aos 41 dias de idade entre machos e fêmeas.

Palavras-chave: fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), frango de corte, polimorfismos de base única (SNP), *JARID1A*

ABSTRACT

The insulin-like growth factor gene (*IGF1*) has been intensely studied because it is associated with growth, proliferation and differentiation of muscle, cartilage and bones. The *Jumonji*, AT rich interactive domain 1A (*JARID1A*) has been related to chromatin modifications, regulation of transcription, cellular proliferation and differentiation, and embryonic development. The present study had the objective of searching for polymorphisms in these two genes and testing the associations of the polymorphisms and their haplotypes with body weight, heart and lungs weights in the chicken. For the identification of polymorphisms the chickens from the F₂ Embrapa Swine and Poultry experimental population belonging to two lines were used: six TT (broiler) males and six CC (layer) females. Ten TC chickens from the F₁ generation were also evaluated. Six regions including exons and/or introns in each gene *IGF1* and *JARID1A* were amplified and sequenced. Four single nucleotide polymorphisms (SNP) were identified in an intron region of *IGF1* and nine polymorphisms in six distinct regions of *JARID1A*, four of which in exons. Two polymorphisms, one from each gene, were chosen for genotyping 165 F₂ chickens. The polymorphisms 47920G>A (*IGF1*) and 34208C>T (*JARID1A*) were associated to body weight at 41 days of age and heart weight. The sex x genotype of polymorphism 34208C>T and sex x diplotype (combination of genotypes from the two polymorphisms) interactions were also associated with body weight at 41 days of age. The C allele may be involved with the difference of body weight at 41 days between males and females.

Key words: broiler, insulin-like growth factor 1 (IGF1), *JARID1A*, single-nucleotide polymorphism (SNP).

Introdução

Com o auxílio de técnicas de genética molecular (PCR, enzimas de restrição, seqüenciamento, entre outras), o progresso genético pode ser facilitado, permitindo a introgressão de alelos favoráveis (Mackay, 2001). Alguns fenótipos são causados pela variação de um único nucleotídeo, outros são causados por múltiplos nucleotídeos em um único gene ou, ainda, por múltiplos nucleotídeos ligados em genes próximos (Glazier et al., 2002). A frequência de polimorfismos de base única (SNPs) na galinha varia de 1 a cada 138 a 640 bp (Schmid et al., 2005). As variações mais comuns são C↔T e A↔G. No banco de SNPs *Chicken Variation Database* (ChickVD, 2009) existem cerca de 3,6 milhões de SNPs descritos e 674.948 no cromossomo 1.

Em uma população experimental brasileira F₂ de galinhas, Nones et al. (2006) mapearam diversos QTLs entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* do GGA1: peso do coração (análise F₂), peso aos 35 dias e peso do coração e dos pulmões com e sem ajuste (meios-irmãos paternos). Com o objetivo de refinar estes QTLs utilizando o mesmo número de animais, porém, um maior número de marcadores, foram mapeados QTLs neste mesmo intervalo associados com peso vivo aos 35 e 41 dias, peso do coração e pulmões (análise F₂) e peso do coração e pulmões (meios-irmãos) (resultados não publicados). Esta região de cerca de 30 cM ou 9,8 Mb, é também, onde está localizado o centrômero do cromossomo (Schmid et al., 2000; Galkina et al., 2006), além de 117 genes (NCBI, 2008).

Dessa forma, o gene *fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1)* foi selecionado para este estudo por ter sido mapeado a 166 cM no GGA1 no mapa genético de machos da população *East Lansing* (ARKdb, 2006), entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* (Klein et al., 1996). Além disso, o gene *IGF1* tem sido intensamente estudado, pois está associado com inúmeras ações fisiológicas: crescimento, proliferação e diferenciação dos músculos, cartilagens e ossos (Kelly, 1990; Florini et al., 1996; Duclos et al., 1999), estimulação da eritropoiese (Schmid, 1995), proliferação das células satélites do tecido muscular e síntese de proteínas (Machida e Booth, 2004). O *IGF1* é um gene candidato por posição e função para crescimento e deposição de gordura em função dos QTLs mapeados na região onde o gene está localizado. Possui 48.429 pares de bases distribuídos em quatro exons e três introns e a proteína correspondente é formada por 153 aminoácidos (NCBI, 2008). Um

polimorfismo na região promotora deste gene foi associado com características de crescimento, composição corporal e ósseas (Zhou et al., 2005). Adicionalmente, haplótipos envolvendo três SNPs, identificados por Bian et al. (2008) em regiões de exons do *IGF1*, foram associados com peso vivo e peso da carcaça.

Já o gene *Jumonji, Domínio interativo 1A rico em AT (JARID1A)* foi escolhido por sua localização (entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* no GGA1) e funções relacionadas à proliferação celular (NCBI, 2008). Possui 48.523 pb distribuídos em 28 exons e 27 introns e a proteína correspondente contém 1.691 aminoácidos (NCBI, 2008). Suas possíveis funções em humanos são: modificações da cromatina, regulação da transcrição e proliferação celular, diferenciação celular, supressão de tumores e desenvolvimento embrionário (NCBI, 2008). Já foram descritos 275 polimorfismos na galinha (NCBI, 2009), porém, não existem estudos de associação de polimorfismos deste gene com características de interesse para a avicultura.

Portanto, este estudo objetivou identificar polimorfismos nos genes *IGF1* e *JARID1A*, localizados numa região do GGA1, onde foram mapeados diversos QTLs para pesos vivos e pesos do coração e pulmões e testar a associação dos genótipos e dos diplótipos com características de crescimento.

Material e Métodos

Foi utilizada a população experimental desenvolvida pela EMBRAPA Suínos e Aves (Concórdia-SC), a partir do cruzamento de machos de uma linhagem de corte (designada TT) e fêmeas de uma linhagem de poedeiras (CC). Estas linhagens se originaram de raças diferentes e foram selecionadas de acordo com critérios distintos, conforme detalhado por Figueiredo et al. (2003a, 2003b). Seis machos TT e seis fêmeas CC foram acasalados para formação da geração F₁. As aves foram mantidas em gaiolas individuais, com controle de *pedigree* e os ovos foram identificados para possibilitar o anelamento da geração F₁ TC. Para a formação da segunda geração (F₂ TCTC), foram selecionados três machos e sete fêmeas F₁. Cada macho fecundou três fêmeas, por meio de inseminação artificial, evitando-se acasalamentos entre parentes. Foi gerado um total de cerca de 100 aves F₂ por família de F₁ em 17 incubações, totalizando cerca de 650 aves F₂. As aves foram criadas como frangos de corte, recebendo ração à base de milho e farelo de soja e água à vontade. Foram mantidas em boxes coletivos até os 35 dias de

idade quando foram realizados a pesagem e o alojamento em gaiolas individuais até os 41 dias.

Para a identificação de polimorfismos nos dois genes candidatos foram avaliadas apenas as aves das gerações parental e F_1 pertencentes às mesmas sete famílias de irmãos completos utilizadas no estudo de mapeamento fino de QTLs: seis machos TT (corte), seis fêmeas CC (postura), além de dez aves F_1 TC. Para a genotipagem das aves F_2 , foi utilizado um total de 165 animais, pertencentes a duas famílias de irmãos completos. Estas duas famílias foram selecionadas em função dos resultados de mapeamento fino de QTLs, levando em consideração as análises de F_2 , meios-irmãos paternos e maternos (conjunta e individual), onde os resultados indicaram que os QTLs estão segregando nas progênies destes dois casais F_1 .

As características avaliadas foram: peso vivo aos 35 (PV35) e 41 dias de idade (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul). Os rendimentos foram calculados da seguinte forma: rendimento do coração ($R_{cor} = 100 \cdot P_{cor} / PV_{42}$) e dos pulmões ($R_{pul} = 100 \cdot P_{pul} / PV_{42}$). O peso vivo aos 42 dias (PV42) foi medido após jejum de 6 horas e transporte para o local de abate, sendo utilizado apenas para o cálculo dos rendimentos. Os pesos do coração e pulmões foram medidos aos 42 dias de idade, imediatamente após o abate. Amostras de sangue das aves de todas as gerações foram colhidas em tubos contendo EDTA (10%) e armazenadas em *freezer* a -80°C . As extrações de DNA foram realizadas com serino-protease (Proteinase K[®], Promega) ou com detergente de guanidina (DNAzol[®], Invitrogen). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (HITACHI, modelo U-20000) e as amostras foram diluídas para uma concentração padronizada de $20 \text{ ng DNA } \mu\text{L}^{-1}$.

Dois genes candidatos por posição e por função biológica foram escolhidos através da pesquisa no banco público de dados NCBI (2008): *IGF1* e *JARID1A*. A região de cerca de 30 cM, onde foram mapeados diversos QTLs num estudo de mapeamento fino (resultados não publicados), está localizada no cromossomo 1 entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174* (Figura 1).

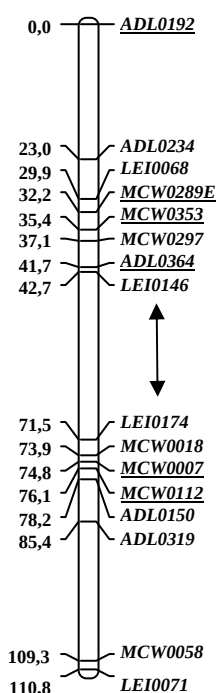


Figura 1 - Mapa de ligação da região estudada do GGA1. A região indicada pela seta representa a região genômica de estudo para a escolha dos dois genes candidatos. O primeiro marcador *ADL0192* foi posicionado a 155 cM no Mapa Consenso (Schmid et al., 2005).

Seis pares de *primers* foram desenhados para cada gene com base em regiões de exons e/ou introns, com 20 bases cada um, com o intuito de amplificar regiões de 650 a 800 pares de bases (Tabela 1). Para isto, partiu-se das seqüências disponíveis no banco de dados NCBI (2008), utilizando-se o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A qualidade dos *primers* desenhados foi analisada com o programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>), considerando-se a formação de dímeros e *hairpins*, a temperatura de anelamento e conteúdo de CG (%).

Os *primers* foram diluídos na concentração de 2 pmol μL^{-1} , em seguida, foram otimizadas as condições de amplificação de PCR, por meio de gradientes de temperatura. Para cada reação, com volume final de 50 μL , foram adicionados 10 μL de DNA genômico (20 ng μL^{-1}) a 40 μL do *mix* de reação composto pelos reagentes: 5 μL de tampão 10 $\times$ (50 mM de KCl, 10mM Tris-HCl pH 9,0), 2 μL de MgCl_2 (50 mM), 2

μL de dNTP (10 mM), 5 μL de cada *primer* (2 pmol μL^{-1}), 0,6 μL (1U) de enzima Platinum® *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e água ultrapura para completar. A amplificação dos fragmentos dos genes foi realizada com desnaturação inicial a 95°C por um minuto, desnaturação a 95°C por um minuto, anelamento por um minuto com temperatura específica para cada par de *primer* (Tabela 1), extensão a 72°C por um minuto e extensão final a 72°C por dez minutos. Foram utilizados 30 ciclos. Os produtos da PCR (1 μL) foram aplicados em gel de agarose (1%) para visualização do tamanho dos fragmentos.

Tabela 1 - *Primers* utilizados para amplificar fragmentos dos genes *IGF1* e *JARID1A*

<i>Gene/Primer</i> (pb) ¹	Localização ²	Seqüências dos <i>primers</i> (5'-3')	TA ³ (°C)
<i>IGF1/A</i> (703)	E1 e I1	D: TCTCTAAATCCCTCTTCTGT R: ACCAAGCAAATGCAACAGTG	60
<i>IGF1/B</i> (839)	E2 e I2	D: CACTGTGTCCTACATTCATT R: CAAACTAAAACGCAGCAAAGG	50
<i>IGF1/C</i> (711)	E3 e I3	D: CGCTTACACCACAAGGGAAT R: TGGAGAACACACATATTAAACATTGA	60
<i>IGF1/D</i> (701)	I3 e E4	D: GCCCTCTTGATTTGCTTGTC R: TTCTGTTTCCTGTGTTCCCTCT	60
<i>IGF1/E</i> (722)	I2	D: CACTGAGATTACTGGAAAAC R: TTGTGCAGCTCTCAGGAATG	60
<i>IGF1/F</i> (720)	I3	D: GGTTACATTTCTTTTCTCA R: GGAGCATTTTGGCAGAAGAA	52
<i>JARID1A/A</i> (673)	E1 e I1	D: CGAGAAAACGGGCATCTG R: CACAGAGCGAGGCATCATAA	60
<i>JARID1A/B</i> (707)	E14 e I14	D: GGAAAGTGGGTGGTGAGAGA R: TAATGCTTACACAATACCTA	60
<i>JARID1A/C</i> (695)	E28	D: TGGCTGCGATGAGTGGTTTC R: AGTAGTGTTAGCCGCCTGGA	60
<i>JARID1A/D</i> (749)	E21/22 e I21/22	D: CCTACCTGGAGCAACTGGAG R: ACTTCCCTCTACTTCCACTGC	62
<i>JARID1A/E</i> (720)	I5	D: CTTTCATGTCATTCTGTGCTTG R: CGGCTATGTGAGTAGGCTGA	50
<i>JARID1A/F</i> (688)	E25, I25 e E26	D: GACAATGCCAGCGTAAAATC R: CAGAGGGTGGATGAGTAGCC	60

¹Tamanho do fragmento amplificado. ²E: exon. I: intron. ³Temperatura de anelamento. D: direto. R: reverso.

As amostras de DNA dos doze animais parentais e dez F₁ foram amplificadas utilizando cada um dos doze pares de *primers* desenhados. Em seguida, foi realizada uma pré-purificação dos produtos da PCR, que consiste na retirada dos *primers* e dos nucleotídeos não incorporados, para obtenção de seqüências de melhor qualidade. Utilizou-se o *GFX 96 PCR Purification Kit*[®] (GE Healthcare). Após a pré-purificação, 1 µL das amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%), juntamente com 2 µL do padrão de peso molecular *Low DNA Mass*[™] *Ladder* (Invitrogen) para a verificação da concentração do produto amplificado.

As reações de seqüenciamento foram realizadas com o *Kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*[®] (Applied Biosystems). Para cada reação foram utilizados: tampão *Save Money*, *primers* (direto e reverso separadamente), *Kit Big Dye*, água ultrapura e DNA. As condições foram: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento (temperaturas descritas na Tabela 1) por 15 segundos e extensão a 60°C por um minuto, totalizando 25 ciclos. Foram preparadas duas reações de seqüenciamento para cada indivíduo, uma utilizando o *primer* direto e outra o reverso. Estas reações foram purificadas com a adição de isopropanol, etanol e formamida. Depois foram desnaturadas a 95°C por cinco minutos, resfriadas em gelo e aplicadas no seqüenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer*[®] (Applied Biosystems).

Para a detecção dos polimorfismos, as seqüências de nucleotídeos dos indivíduos das gerações parental e F₁ foram analisadas e alinhadas com o auxílio dos programas *Phred* (Ewing et al., 1998), *Phrap* (<http://www.phrap.org>) e *Consed* (Gordon et al., 1998). O programa *Phred* analisa os arquivos de cromatogramas das seqüências obtidas, determinando os nucleotídeos. Para a montagem das seqüências foi utilizado o programa *Phrap* e para a visualização, análise e edição, o programa *Consed*. Após a análise das seqüências, elas foram alinhadas com o auxílio do programa *BioEdit* (versão 7.0.9.0., Hall, 1999), juntamente com a seqüência genômica utilizada para o desenho de cada *primer*, com o intuito de comparar os polimorfismos encontrados com a seqüência genômica do NCBI (2008). Foi utilizada a opção *ClustalW Multiple Alignment* para o alinhamento.

Depois de confirmados os polimorfismos nas aves parentais e F₁, dois deles, um de cada gene, foram selecionados. A escolha dos polimorfismos foi feita a partir da análise de segregação dos SNPs identificados ao longo das gerações parental e F₁,

observando-se também quais famílias foram pelo menos parcialmente informativas (genótipos heterozigóticos). Esta escolha foi facilitada pela reconstrução dos haplótipos dos treze polimorfismos identificados nos dois genes (Anexo II). A escolha das famílias foi realizada por meio dos resultados das análises de mapeamento fino de QTLs (F₂ e meios-irmãos paternos e maternos) (resultados não publicados).

As genotipagens das aves F₂ para os dois polimorfismos escolhidos foram feitas através da PCR em tempo real, utilizando-se o equipamento *LightCycler 480 System II*[®] (Roche), pelo método *Endpoint Genotyping*, com o formato de detecção *Dual Color Hydrolysis Probe*, que é o ideal para utilização de sondas *TaqMan*[®] (Applied Biosystems), permitindo a identificação de diferentes genótipos (homozigóticos e heterozigóticos). *TaqMan*[®] é uma sonda utilizada para detectar seqüências específicas nos fragmentos de DNA amplificados por PCR. Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade de exonuclease 5'-3' da Taq DNA polimerase. Durante a PCR em tempo real, a sonda *TaqMan*[®] hibridiza com a seqüência da fita simples de DNA complementar alvo da amplificação.

O desenho das sondas *TaqMan*[®] e *primers* foram realizados pela empresa Applied Biosystems. Para tanto, foi necessário o envio das seqüências genômicas formatadas, onde estavam presentes os polimorfismos, utilizando-se o programa *File Builder* (versão 3.0, Applied Biosystems, disponível em <http://www.appliedbiosystems.com.br>).

Para cada reação com volume final de 10 µL foram adicionados 1 µL de DNA genômico (20 ng µL⁻¹), 5 µL de *TaqMan*[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), composta por: tampão, *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*, *AmpErase*[®] *uracil-N-glycosylase* (UNG) e dNTPs, e 0,25 µL de Custom *TaqMan*[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems), que inclui *primers* e sondas marcadas com as fluorescências VIC e FAM e 3,75 µL de água ultrapura para completar. As condições incluíram: pré-incubação, amplificação e resfriamento. A etapa de pré-incubação consistiu de 50°C por dois minutos com taxa de rampa de 4,40°C/s para ativação da UNG e, em seguida, 95°C por dez minutos a 4,40°C/s para a ativação da *AmpliTaq Gold DNA Polymerase*. A amplificação consistiu de 45 ciclos: desnaturação a 95°C por 15 segundos a 4,40°C/s, seguida do anelamento a 60°C por um minuto com 2,20°C/s, e por

fim a extensão a 72°C por um segundo a 4,40°C/s. O resfriamento foi a 40°C por dez segundos a 1,50°C/s.

A análise dos genótipos dos F₂ foi realizada através do *LightCycler 480 software 1,5* (Roche), onde foi utilizada a opção *Endpoint Genotyping*. Em todas as corridas foram empregados controles negativos junto com as amostras a serem avaliadas.

A reconstrução dos haplótipos foi realizada manualmente nas gerações P e F₁ das sete famílias estudadas para todos os polimorfismos identificados (Anexo II). As frequências genótípicas dos polimorfismos, haplótipos e diplótipos foram calculadas com o auxílio do procedimento *FREQ* do SAS (2003). Foi conduzido teste de associação entre os genótipos dos polimorfismos e diplótipos com as características fenotípicas através de análise de variância com o *PROC GLM* do SAS (2003). O modelo incluiu os efeitos fixos de incubação, sexo e família, além do genótipo do polimorfismo de cada gene candidato em questão separadamente ou diplótipo (combinação dos genótipos dos dois polimorfismos). Também foi incluída a interação sexo x genótipo. A estrutura dos dados não permitiu considerar as interações envolvendo os efeitos de incubação e de família. Os efeitos aditivos e de dominância foram estimados através de contrastes linear e quadrático, respectivamente, para os locos com três classes genótípicas.

Resultados e Discussão

Num levantamento realizado no banco público de dados NCBI (2008), na região do genoma de 9,82 Mb do GGA1, foram identificados 117 genes. Deste total, dois genes foram escolhidos relacionados com características de crescimento. Foi realizada busca no banco de dados NCBI (2008) das seqüências referentes ao DNA genômico disponíveis para os genes *IGF1* (*GeneID*: 418090) e *JARID1A* (*GeneID*: 418148) e foram selecionadas as seguintes: NC 006088.2 (*IGF1*: região de 57.327.750 a 57.376.178 bases) e NC 006088.2 (*JARID1A*: região de 62.358.975 a 62.407.497 bases). Além disso, 67 SNPs no *IGF1* e 275 no *JARID1A* foram identificados no mesmo banco público (NCBI, 2008).

Após o desenho dos *primers*, eles foram conferidos utilizando a ferramenta *BLASTN* (*nucleotide blast*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para verificar se

foram específicos para a região escolhida, ou seja, se não iriam amplificar outras seqüências não desejadas.

No gene *IGF1* foram detectados quatro polimorfismos nas seis regiões flanqueadas pelos *primers* desenhados (Tabela 2). Não foram detectados polimorfismos nas regiões amplificadas pelos *primers*: *IGF1/A*, *B* e *E*. Na região de 711 pb flanqueada pelo *primer IGF1/C* foi identificado um polimorfismo (Figura 2), na região de 701 pb flanqueada pelo *primer IGF1/D*, dois polimorfismos (Figura 3) e na região de 720 pb flanqueada pelo *primer IGF1/F* um polimorfismo (Figura 4). Os quatro polimorfismos identificados (39162C>G, 47792A>G, 47920G>A e 47291T>C) estão localizados no intron 3. Na região flanqueada pelo *primer IGF1/C* nenhuma diferença foi encontrada em relação à seqüência genômica do *GenBank* (NCBI, 2008). Já nas regiões amplificadas pelos *primers IGF1/D* e *F*, foram identificados 20 polimorfismos (Tabela 3, Figuras 3 e 4), dez para cada região amplificada.

Tabela 2 - Polimorfismos identificados no intron 3 do gene *IGF1*

<i>Primer</i>	Posição (pb) ¹	Polimorfismo	Designação
<i>IGF1/C1</i>	39.162	C→G	39162C>G
<i>IGF1/D1</i>	47.792	A→G	47792A>G
<i>IGF1/D2</i>	47.920	G→A	47920G>A
<i>IGF1/F1</i>	47.291	T→C	47291T>C

¹Posição em relação ao início do gene *IGF1*.

1	<u>CGCTTACACCACAAGGGAATAGTGGATGAATGCTGCTTCCAGAGTTGTGAC</u>	51
52	CTGAGGAGGCTGGAGATGTACTGTGCTCCAATAAAGCCACCTAAATCTGCAC	103
104	GCTCTGTACGTGCTCAGCGCCACACTGATATGCCAAAAGCACAAAAGGTAGG	155
156	CCAGGCCAAAAGACAAAAAGCTCTATTTTAGGAAAAGAAATTTATGTCAAGG	207
208	CTGGTAACTTAGCAAACAA[C→G]TAAACCTCTTTCAAAAAGAGAAATCAAA	255
256	CACTGAGTGTTTAAATACTCATTTATCCAGAAAATACTCACTCATCCTTCTTT	308
309	GTTAGGAAGAGGCAGATTGAGTGACTGACAGCTTTTCTGGTATTCTTCTCAC	360
361	TGTGTAAATGAACAAATCATTTTCTTCTTTCATCATTGTTTTGTCTTTTATTT	414
415	ATTTTTATTTACCAGAAGTAAATTAAATTGATAATTTAACTCCAGTCATTAC	467
468	ATACTTCATTTTAACTATTCAATGTTTAATATGTGTGTTCTCCA	511

Figura 2 - Seqüência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer C* no gene *IGF1* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seu respectivo polimorfismo 39162C>G. A região do exon 3 compreende de 1 até 150 bases. Os *primers* estão sublinhados.

1	<u>GCCCTCTTGATTGCTGGT</u> CACATCACTCTGATTATGAGAATACAAATGATT	51
52	TGGCTGCTGCTCCTGCAGTGAACCCACATATTTTAAATCTGCTAAAGGCCT	104
105	TGTCCAACAAAAACCTTACCTACACATCTCATATGCAGCTTATGCGACATGTA	157
158	GGTAACAG[A→G]ATTTTGAAAACCTCTGCTCACTGGCTACTAAAGTCCAGAA	206
207	GGCTCCATAAAGCCTACAAACACAACCTTTAAAGTTCCATTGGCCCCCTCTGCAC	259
260	CCTGATTTTGCAAATGTCCTTGTTCTGAAAGAAA[G→A]AAAATTTATGCTAC	308
309	CTAACTGTATGTCTAAGCCCCGTCTAGGTTCCCGTACATAGAGGTTTCTTCTGC	361
362	CAAAATGCTCCAAAGTAACAGATTTGGTTGACTTTCTCCAAATATCATGCAT	413
414	ATGCAAAATTCAGTTATGTTGCAACTACTCAGATCAACAATGACAGCAATCA	465
466	AGATGTTTATACCTAGAAGAAGAGGAAAATTACAGTAGAAATTTTATGTAGT	517
518	CAAGTTCTCAGTGATCTGGCTGAAGAGCTCTAAGAATTCTAGCATTAAAGGAT	569
570	AACTAATCTGTGTGGTCATATAGAACATTAAAATCTATCTAATCTAATTTTTTA	622
623	TTTTTTATTTCTTATTTTTTTTACATCTTCAGGAAGTGCATTTGAAGAATACAA	676
677	<u>GTAGAGGGAACACAGGAAACAGAA</u>	700

Figura 3 - Sequência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer D* no gene *IGF1* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seus respectivos polimorfismos: 47792A>G e 47920G>A. Os *primers* estão sublinhados, o exon 4 corresponde a 655 bases até o final da sequência e em negrito estão os polimorfismos em relação à sequência do NCBI (2008), acesso NC 006088.2.

1	<u>GGTTACATTTCT</u> [T→C][TTTCTCAGGCTAAAATAGAGGACAGGTGCAGTGGCA	49
50	CATCTCCATACATATGCCTCACCTTTCTCAGTGAGATTTTATATTTTGTGGTTT	103
104	TCTTATGACAGCAGACACAATTTCTGTACAAAAAGAATTTCACTTCTGTTGA	155
156	GGACTATAAAAAATAGAAAGTCATTTGTCAATTCTGCCTCTAGACCAGTAGAG	207
208	AATGGGTAGTTTGGAGTCCAGCTAATATTTACCAGCATGGTAAAGGAAGAAA	259
260	TCAAAAAGTTGATATAGTAACTTCTAGTGCTTCCAGAACTAGCCTGAGAAT	311
312	GGAAAGACAGTAAACAGAGGGCATTATTAATTCCAAAGCCCTCTTGATTTGC	363
364	TTGTCACATCACTCTGATTATGAGAATACAAATGATTTGGCTGCTGCTCCTGC	416
417	AGTGAACCCACATATTTTAAAATTCTGCTAAAGGCCTTGTCCAACAAAAACC	468
469	TTACCTACACATCTCATATGCAGCTTATGCGACATGTAGGTAACAGGATTTT	520
521	GAAAACCTCTGCTCACTGGCTACTAAAGTCCAGAAGGCTCCATAAAGCCTAC	572
573	AAACACAACCTTTAAAGTTCCATTGGCCCCCTCTGCACCCTGATTTTGCAAATGT	625
626	CCTTGTTCTGAAAGAAAGAAAATTTATGCTACCTAACTGTATGTCTAAGCCC	677
678	<u>GTCTAGGTTCCCGTACATAGAGGTTTCTTCTGCCAAAATGCTCC</u>	721

Figura 4 - Sequência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer F* no intron 3 do gene *IGF1* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seu respectivo polimorfismo 47291T>C. Os *primers* estão sublinhados e em negrito estão os outros polimorfismos identificados em relação à sequência do NCBI (2008), acesso NC 006088.2, assim como a inserção (base 39).

Tabela 3 - Polimorfismos identificados no intron 3 do gene *IGF1* em todos animais parentais (TT e CC) e F₁ (TC), utilizando-se os *primers* *IGF1/D* e *F*, que diferem em relação à sequência genômica do NCBI (2008), acesso NC 006088.2.

<i>Primer</i>	Posição (pb) ¹	Polimorfismo	Designação
<i>IGF1/D</i>	47.641	T→G	47641T>G
	47.729	T→C	47729T>C
	47.732	A→G	47732A>G
	47.751	A→T	47751A>T
	47.779	G→A	47779G>A
	47.955	A→G	47955A>G
	47.959	G→A	47959G>A
	48.036	T→G	48036T>G
	48.037	A→C	48037A>C
	48.193	A→G	48193A>G
<i>IGF1/F</i>	47.317	G	47317deleção/inserção
	47.399	T→C	47399T>C
	47.551	T→A	47551T>A
	47.730	T→C	47730T>C
	47.733	A→G	47733A>G
	47.752	A→T	47752A>T
	47.780	G→A	47780G>A
	47.793	A→G	47793A>G
	47.956	A→G	47956A>G
	47.960	G→A	47960G>A

¹Posição em relação ao início do gene *IGF1*.

No gene *JARID1A* foram detectados nove polimorfismos nas seis regiões flanqueadas pelos *primers* utilizados, sendo que quatro deles estão em regiões de exons (Tabela 4). Não foram detectados polimorfismos nas regiões amplificadas pelos *primers* *A* e *E*. Na região de 795 pb flanqueada pelo *primer* *JARID1A/B* foram identificados quatro polimorfismos (Figura 5), um polimorfismo na região de 695 pb flanqueada pelo *primer* *JARID1A/C* (Figura 6), três na região de 749 pb flanqueada pelo *primer* *JARID1A/D* (Figura 7) e um na região de 688 pb amplificada pelo *primer* *JARID1A/F* (Figura 8).

Os polimorfismos encontrados nas regiões de exons do gene *JARID1A* não acarretaram alterações nos aminoácidos e conseqüentemente na proteína. Isto foi verificado utilizando a ferramenta *Translate* (<http://ca.expasy.org/tools/dna.html>), que permite a tradução da sequência de nucleotídeos na sequência de proteína correspondente. Em seguida, foi realizada comparação da sequência da proteína com a

do genoma da galinha, através da ferramenta *Protein BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As mutações nos exons deste gene são sinônimas, já que não alteraram os aminoácidos. O polimorfismo 34208C>T está numa região de exon traduzida, porém ambos os códons correspondem ao aminoácido leucina. Apenas o polimorfismo 45962C>T está na região não traduzida do último exon do gene (Tabela 5).

Tabela 4 - Polimorfismos identificados no gene *JARID1A*

<i>Primer</i>	Localização	Posição ¹	Polimorfismo	Designação
<i>JARID1A/B1</i>	E14	24.441	A→G	24441A>G
<i>JARID1A/B2</i>	E14	24.471	G→A	24471G>A
<i>JARID1A/B3</i>	I14	24.508	A→G	24508A>G
<i>JARID1A/B4</i>	I14	24.528	C→G	24528C>G
<i>JARID1A/C1</i>	E28	45.962	C→T	45962C>T
<i>JARID1A/D1</i>	E21	34.208	C→T	34208C>T
<i>JARID1A/D2</i>	I21	34.347	G→T	34347G>T
<i>JARID1A/D3</i>	I21	34.344	C→T	34344C>T
<i>JARID1A/F1</i>	I25	40.411	G→T	40411G>T

E: exon. I: intron. ¹Posição em relação ao início do gene *JARID1A*.

1	<u>GGAAAGTGGGTGGTGAGAGATTGTCTCAAATGTTTTGTCCCCAAATGATCA</u>	52
53	ATGACAATGATTTTTGTAGCTTCCAATTGGACGTCAGTGTGTGAGTCACTACC	105
106	GAAGGCTTGGGCGTCATTGCGTTTTCTCCCATGAAGAACTGATCTTCAAGAT	157
158	GGCTGCCGATCCAGAGTGCTTGGATGTTGGACTGGCTGCCATGGTCTGCAAG	209
210	GAGATGACACTAATGATAGAGGA[A→G]GAAACACGCTTAAGGGAACTGT	256
257	TGTGCA[G→A]ATGGTAAATAATGAAAAACAACCTCTTTACTTGCA A[A→G]	300
301	AGAAATTTTGCTCCCCTCC[C→G]CTCTTTCCTTTCTGCTTTGCCTGGACTAGT	350
351	GTTTTTAACAGGTGCCTAATTTTTTTTTAAGGGAGTATTAATGTCTGAAGAAG	403
404	AGGTGTTTGAATTGGTTCCAGATGATGAACGTCAGTGCACAGCTTGCAGAAC	455
456	AACGTGCTTCTTGTGTCAGCTCTTACGTGTTCCCTGTAATCCCGAGCGCTTGGTCT	508
509	GCCTATACCACCCATCTGATTTATGTCCGTGCCCCATGCAGAACAAAGTGCTT	560
561	AAGGTATGCCAGCAGTTGTTTTTTTTCCCTTTCCAGATCAATAGTGTCTTGGA	613
614	GACTGATAGCCAAATTTAACATTTGGCCACTCTTCTCTCTTCTTTATTTAAG	666
667	CAGTGCTTTTATCCTCTTTGTTTGATTCTTGGGTCAAGGCAGAGGATATTAT	719
720	ATGTATTCTGTCCTGACCTTATTTTAGCTGGAAAACTCAACAATAAGTAATA	772
773	TCCTAGGTATTGTGTAAGCATT	795

Figura 5 - Sequência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer B* no gene *JARID1A* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seus respectivos polimorfismos: 24441A>G, 24471G>A, 24508A>G e 24528C>G. Os *primers* estão sublinhados e as regiões de introns correspondem a 1-71, 267-381 e 564 bases até o final da sequência.

<u>1</u>	<u>TGGCTGCGATGAGTGGTTTCATCAGGTTTGC</u>	<u>53</u>
54	GCTGAGAATGAGGATTACATCTGTATAAACTGTGCAAAGAAAACAATGCAG	104
105	GGACCAAGTAGCCCTGCTCATGCACCACCTCCTTCTTTCTTGTGAGCTACAA	157
158	ACTCCCAATGGAAGATCTTAAGGAGACAAGTTAGCAACTGCTCGATGTCTGG	209
210	AACTTGCTGAGAAATGGACCGCTGAAACCCCTACAGAAAGAGAGGGTTTGA	260
261	ATCTAATGTAGCCACTGAGCTTCACTTCCAAGGATGTACAGACCTGCAGCAG	312
313	AGTTGGTCCCTTCCTTACAGCTGGCTTCCTTCATACAGCAGGGACGTCAAGG	364
365	CACAGTGGTTCTGACTCATCTATGCAGACACCGCCTCATTAGGAGCTGCAGC	416
417	CAGTGTTTTGACTTGAGTATTTCCATCTTTGAGAGTGGCTGTTG[C→T]TCTTA	466
467	GAGACTGAGCTAACCCGAGGCTGTTAGATTAGACGCTTCAGGGTGTAGAAAG	518
519	TCCATGTTGGCAGTGGAGCTGGCCTGGAATTGGTGGCACGGGCTGGAGCTTT	570
571	TAGCCATACCAGGTTGCCCTAAGGAGGTTTTGGAAGTTAGCTTTTGCCTCCTC	623
624	CTGCCAACCCAGTGAGAAGGGCAGTGTCTTGAGAGAGTTCAGTTGTCTCCGT	675
<u>676</u>	<u>ATCCAGGCGGCTAACACTACT</u>	<u>696</u>

Figura 6 - Sequência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer C* no exon 28 do gene *JARID1A* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seu respectivo polimorfismo 45962C>T. Os *primers* estão sublinhados.

<u>1</u>	<u>CCTACCTGGAGCAACTGGAGAACTTATCTGCCAAAGGCCGCCCAATACCAGT</u>	<u>53</u>
54	GCGCCTTGATGCCTTGCCACAGCTGGAGTCACAGGTAGCTGCTGCACGGGCT	105
106	TGGAGGGAGCGCACAGGAAGGACCTTC[C→T]TGAAGAAGAACTCAAGCTA	152
153	CAGTCTGTTACAGGTAAGCAGTAAGTGTGAGACTTCAGAAATGGGTCTTGAT	204
205	TCTTCTGCAGTCTGGAAGACACAACAGATTATCTAATTCCATTTGATAAGCT	256
257	AGAATGTAATAAGCT[G→T]CAGCTGAACTCAGGTGAGAAGAACAAAAAAG	303
304	ACAAGTCTGTGTTTGGCTATGCTTGTGTTTGTGTATAAGCAACCTCAACTGTTG	356
357	CTTTTTAAGAAA[C→T]AGATTAAACCTCTAATTCTTGGCAGTAACAGTGTA	405
406	GTTTTCTTGTTACAGGTTCTGAGCCCTCGCACTGATATTGGTGTGTTATGGAA	458
459	GCAGTAAGAATAGACGGAAGAGGGCAAAGGAGTTGATGGAGAAGGAGAAG	508
509	GAAAAAGATCTCGATTTGGAATCCCTAAGCGAGCTGGAGGATGGGCTGGAG	559
560	GAGGCCAGAGACACTGCAGCTGTGGTAAGGAGCATTGAAAGGTAGTGTCTC	610
611	CTGATACGTGGATTTAATTTCTCTAATCTGTGTAAAAATACAGGAAATCTGA	662
663	TAATTAATTTTGCTGAAACAAATATCTAACGACATTGGCACAGTAATATAGT	714
<u>715</u>	<u>TTTTTTTTTTTTTTTGCAGTGGAAAGTAGAGGGAAGT</u>	<u>750</u>

Figura 7 - Sequência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer D* do gene *JARID1A* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seus respectivos polimorfismos 34208C>T, 34347G>T e 34344C>T. Os *primers* estão sublinhados e as regiões de introns correspondem a 166 até 421 e 584 até o fim.

1	<u>GACAATGCCAGCGTAAAAATCTTCTAGCAGCTTAGAACCCAATTTGTTTTGTG</u>	53
54	ACGAGGAAATCCCCATTAAATCAGAGGAAGTGGTGACACATATGTGGACTG	104
105	CTCCCTCGTTCTGTGCCGAACACGCGTATTCATCTGCTTCTAAAAGCTGCTCT	157
158	CAAGGTATCTGCTTTCCTATGCATTGGGATAAAATTGGACAACCTGGAGTGAG	209
210	CAATCAGAGAGCAAGAGAGGAACTATTCTTGTTCCTCTGCTAGATGTAGAG	261
262	GATATGGTCTCTGTAAGAAGGTACAAGAGAGTAACAGTACAGTTGGGATGTC	313
314	TGGTATATAAAGCTGTGTCTATGATTTTTGGGGGG[G→T]TTTTCTTTGTTTTT	363
364	TTTGTGTTCTTTTTTTTTCTTTTGCTTGGGATTGCCTCCATCTTTAAGTAGCTA	418
419	TTGTACAAAGTATGTCATCTCTTTTGTGTTTGATCTCTTTCTTTATCGTCATG	472
473	CAACTTGTCTCCTGTCTGAAAGGTTCCAGCACTCCAAGAAAGCAGCCTCGGA	524
525	AAAGTCCACTGGTACCTCGCAGTTTGGAGCCCCCTGTACTGGAGTTATCACC	576
577	TGGAGCAAAGGCTCAGTTAGAAGATCTAATGATGGTAGGAGACCTACTAGA	627
628	GGTATCACTGGATGAAACTCAGCACATCTGGCGGATTTTACAGGCTACTCAT	679
680	<u>CCACCCTCTG</u>	689

Figura 8 - Sequência consenso (5'-3') gerada a partir do fragmento amplificado com o *primer F* do gene *JARID1A* dos indivíduos das gerações parental e F₁ e seu respectivo polimorfismo 40411G>T. Os *primers* estão sublinhados e a região de intron compreende de 162 a 494 bases.

Tabela 5 - Polimorfismos identificados em regiões de exons no gene *JARID1A* e seus respectivos códons e aminoácidos formados

Polimorfismo	Localização	Posição do códon ¹	Códon (aminoácido) ²	Códon mutante (aminoácido)
24441A>G	E14	644	GAA (glutamato)	GAG (glutamato)
24471G>A	E14	654	CAG (glutamina)	CAA (glutamina)
34208C>T	E21	1.061	TTG (leucina)	CTG (leucina)
45962C>T	E28	Região não traduzida	—	—

E= exon. ¹Posição em relação ao início do RNA mensageiro. ²Em relação a sequência do RNA mensageiro do NCBI (2008), acesso XM_416379.2. Em negrito está representado o polimorfismo identificado.

Após a análise das sequências dos parentais e F₁, dois polimorfismos foram escolhidos para a análise de associação com as características fenotípicas na geração F₂: 47920G>A (*IGF1*) e 34208C>T (*JARID1A*). As famílias de irmãos completos 7810 e 7971, com cerca de 100 aves cada, foram escolhidas para a genotipagem das aves F₂.

Na Figura 9, pode-se observar como exemplo, o resultado da genotipagem da família 7971 para o polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*). Três classes genotípicas foram identificadas nos F₂, já que o casal F₁ era heterozigoto. Neste gráfico são representados os comprimentos de onda (nm) das fluorescências detectadas pelo equipamento: VIC (eixo x: 533-580 nm) e FAM (eixo y: 465-510 nm).

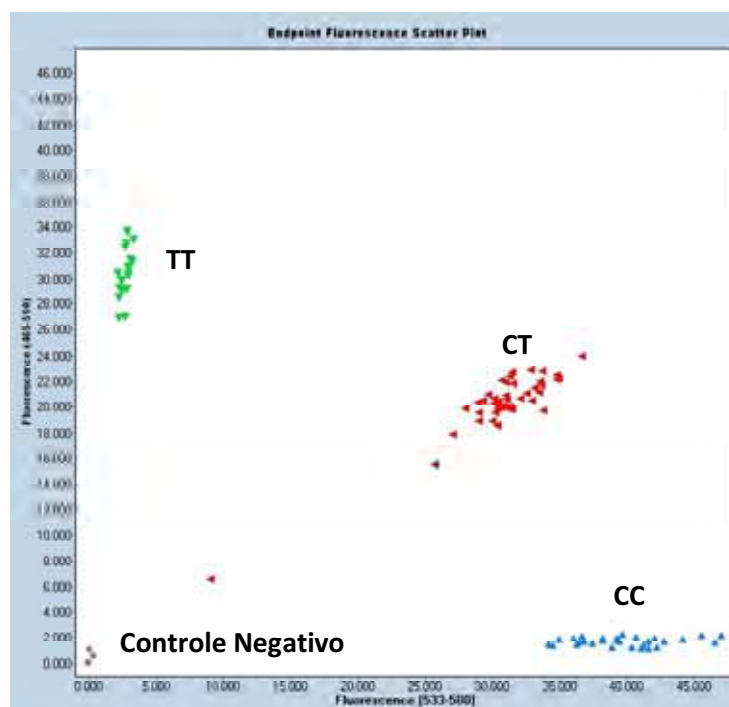


Figura 9 - Resultado da genotipagem das aves F_2 da família 7971 para o polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*) analisado com o programa *LightCycler 480 software 1,5* (Roche). Três genótipos foram identificados nesta família (C/C, C/T e T/T), além do controle negativo. Cada triângulo representa um animal genotipado.

As estatísticas descritivas das características fenotípicas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Estatísticas descritivas das características avaliadas nas duas famílias de irmãos completos selecionadas para genotipagem das aves F_2 ($n F_2 = 165$)

Variável ¹	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
PV35 (g)	795	119	536	1.071
PV41 (g)	1.014	168	578	1.398
PV42 (g)	973	165	549	1.374
Pcor (g)	6,6	1,7	2,0	12,0
Ppul (g)	8,3	2,2	4,0	14,0
Rcor (%)	0,68	0,14	0,32	1,20
Rpul (%)	0,85	0,17	0,44	1,36

¹Peso aos 35 (PV35), 41 (PV41) e 42 dias (PV42), peso do coração (Pcor) e peso dos pulmões (Ppul).

As frequências genóticas dos dois polimorfismos escolhidos nas duas famílias (7810 e 7971) estão apresentadas na Tabela 7. O SNP 47920G>A (*IGF1*) foi genotipado na família 7810 (n= 74). A família 7971 (n=91) não apresentou este polimorfismo, portanto não foi genotipada. Foi realizada uma análise de frequência dos genótipos nos 165 animais avaliados, sendo que foram encontrados os genótipos A/A e A/G. O polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*) foi genotipado nas famílias 7971 (n=91) e 7810 (n=74), somando 165 animais. Para este polimorfismo foram encontrados os três genótipos (C/C, C/T e T/T) na família 7971 e dois na família 7810 (C/C e C/T).

Tabela 7 – Número de animais (frequências genóticas) para os polimorfismos estudados em duas famílias da população F₂ TCTC

Gene <i>IGF1</i> – Polimorfismo 47920G>A			
Genótipos	Famílias		Total
	7810	7971	
A/A	37 (0,50)	91 (1,00)	128 (0,77)
A/G	37 (0,50)	0 (0,00)	37 (0,23)
Total	74 (0,44)	91 (0,56)	165
Gene <i>JARID1A</i> – Polimorfismo 34208C>T			
Genótipos	Famílias		Total
	7810	7971	
C/C	38 (0,51)	28 (0,30)	66 (0,40)
C/T	36 (0,49)	41 (0,45)	77 (0,46)
T/T	0 (0,00)	22 (0,25)	22 (0,14)
Total	74 (0,44)	91 (0,56)	165

As frequências alélicas dos dois polimorfismos (genes) são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Frequências alélicas estimadas para os polimorfismos 47920G>A (*IGF1*) e 34208C>T (*JARID1A*) nas três gerações

Polimorfismos (<i>Gene</i>)	Geração (n)	(p)	(q)
47920G>A (<i>IGF1</i>)	P (8)	f (A) = 0,875	f (G) = 0,125
34208C>T (<i>JARID1A</i>)		f (C) = 0,8125	f (T) = 0,1875
47920G>A (<i>IGF1</i>)	F ₁ (4)	f (A) = 0,875	f (G) = 0,125
34208C>T (<i>JARID1A</i>)		f (C) = 0,625	f (T) = 0,375
47920G>A (<i>IGF1</i>)	F ₂ (165)	f (A) = 0,887	f (G) = 0,112
34208C>T (<i>JARID1A</i>)		f (C) = 0,633	f (T) = 0,366

Os haplótipos obtidos foram: H1 (AC), H2 (AT), H3 (GC) e H4 (GT), para um total de 165 aves nas duas famílias (Tabela 9). O primeiro alelo nestes haplótipos é referente ao gene *IGF1* (47920G>A) e o segundo ao *JARID1A* (34208C>T). Na família 7971 foram observados dois haplótipos: H1 e H2. Na família 7810 foram observados os quatro haplótipos. O haplótipo H4 apresentou baixa frequência com apenas quatro indivíduos.

Tabela 9 - Frequências dos haplótipos em duas famílias da população F₂ TCTC

Haplótipos ¹	Número de haplótipos	Frequências
H1	176	0,533
H2	117	0,355
H3	33	0,100
H4	4	0,012
Total	330	1,000

¹H1 (AC), H2 (AT), H3 (GC) e H4 (GT): o primeiro alelo em cada haplótipo se refere ao gene *IGF1* (47920G>A) e o segundo ao *JARID1A* (34208C>T).

Cinco diplótipos foram identificados num total de 165 indivíduos nas duas famílias: H1H1 (ACAC), H1H2 (ACAT), H1H3 (ACGC), H1H4 (ACGT) e H2H2 (ATAT) (Tabela 10). Na família 7971 foram observados três diplótipos: H1H1, H1H2 e H2H2. Na família 7810 foram observados quatro diplótipos: H1H1, H1H2, H1H3 e H1H4. O diplótipo H1H4 apresentou baixa frequência, enquanto que o diplótipo H1H2 apresentou a frequência mais alta.

Tabela 10 - Frequências dos diplótipos em duas famílias da população F₂ TCTC

Diplótipos ¹	Número de indivíduos	Frequências
H1H1	33	0,200
H1H2	73	0,442
H1H3	33	0,200
H1H4	4	0,024
H2H2	22	0,133
Total	165	1,000

¹H1H1 (ACAC), H1H2 (ACAT), H1H3 (ACGC), H1H4 (ACGT) e H2H2 (ATAT): o primeiro alelo em cada haplótipo se refere ao gene *IGF1* (47920G>A) e o segundo ao *JARID1A* (34208C>T).

Os resultados da análise de variância das características de desempenho e órgãos, quando o genótipo do polimorfismo 47920G>A (*IGF1*) foi incluído no modelo,

mostraram que houve efeito de incubação sobre a maioria das características avaliadas, exceto Ppul e Rpul (Tabela 11). Este resultado era esperado, visto que os F₂ foram gerados em 17 incubações, o que levou cerca de oito meses. Detectou-se efeito de família apenas sobre PV35 e PV41 e de sexo sobre a maioria das características, exceto Rcor e Rpul. O genótipo do polimorfismo 47920G>A (*IGF1*) foi associado ao PV41 e Pcor (Tabela 11).

Tabela 11 - Probabilidades de erro do tipo I na análise de variância das características de desempenho e órgãos quando o genótipo do polimorfismo 47920G>A do gene *IGF1* foi incluído no modelo

Característica ¹	Incubação	Família	Sexo	Genótipo	Sexo x Genótipo
PV35 (g)	0,0002	0,0284	<,0001	NS	NS
PV41 (g)	0,0192	0,0204	<,0001	0,0325	NS
Pcor (g)	<,0001	NS	<,0001	0,0398	NS
Ppul (g)	NS	NS	<,0001	NS	NS
Rcor (%)	<,0001	NS	NS	NS	NS
Rpul (%)	NS	NS	NS	NS	NS

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). P<0,05.

Aves com o genótipo A/A tiveram maior peso aos 41 dias do que as com o genótipo A/G (Figura 10). O genótipo A/A foi responsável pelo maior PV41, com um acréscimo médio de 62 g no peso vivo. Nas duas famílias analisadas, o alelo G foi sempre proveniente da linhagem de postura, enquanto que o alelo A foi proveniente das linhagens de corte e postura (Anexo II).

O genótipo do polimorfismo 47920G>A (*IGF1*) também foi associado com Pcor (Tabela 11). Aves com o genótipo A/A tiveram maior peso do coração do que as com o genótipo A/G (Figura 11). O genótipo A/A conferiu acréscimo de 0,6 g ao peso do coração. Nas duas famílias analisadas, o alelo G foi proveniente da linhagem de postura, enquanto que o alelo A foi proveniente das linhagens de corte e postura (Anexo II). Portanto, o polimorfismo apresentou efeitos semelhantes sobre PV41 e Pcor.

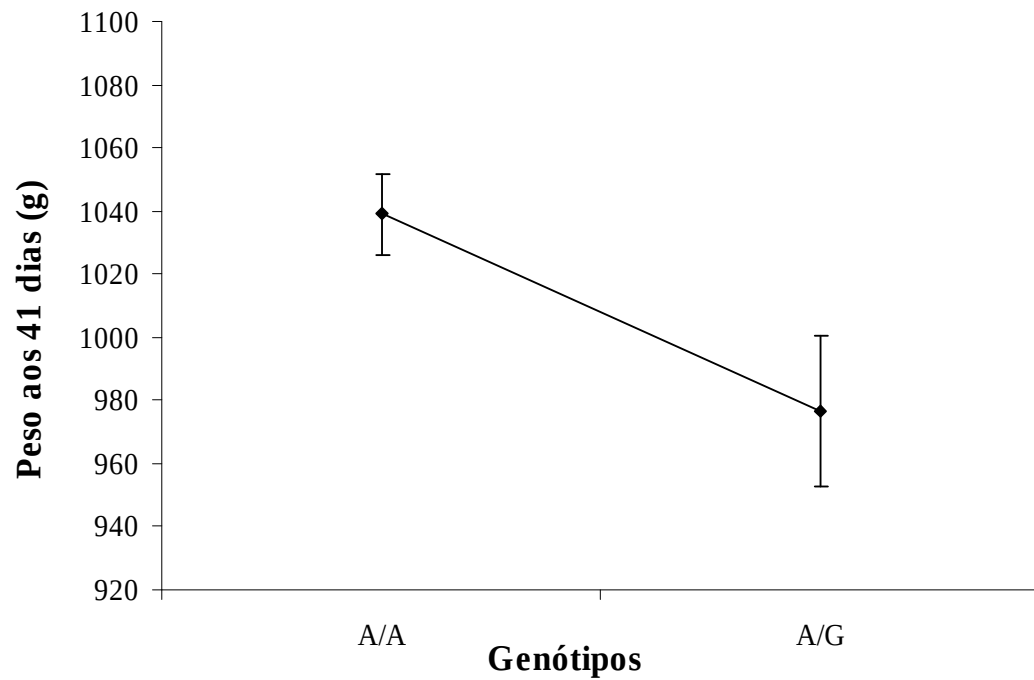


Figura 10 - Peso vivo aos 41 dias de idade de aves F₂ da população TCTC, de acordo com os genótipos A/A e A/G do polimorfismo 47920G>A (*IGF1*).

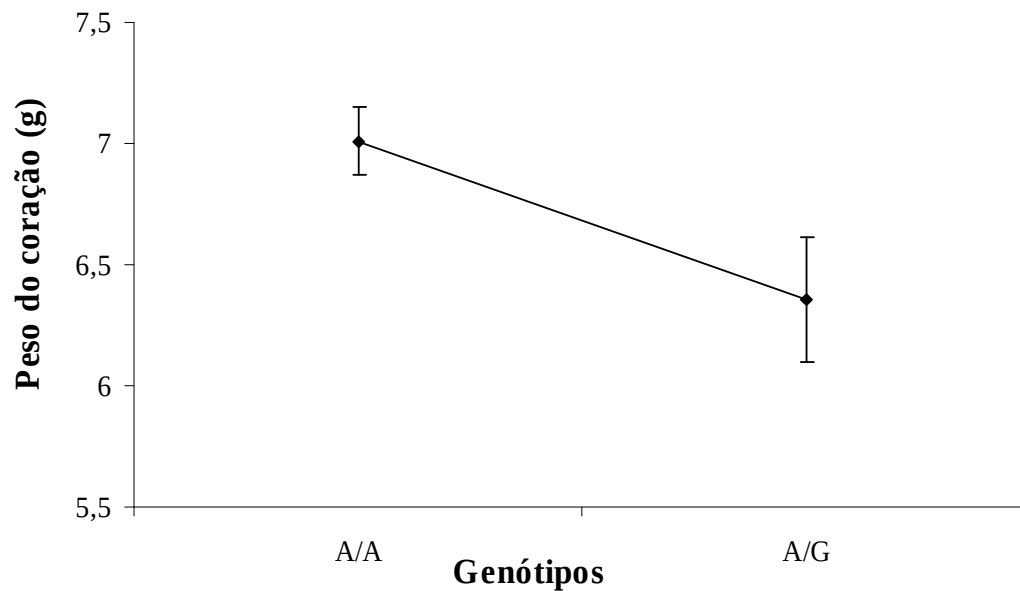


Figura 11 - Peso do coração de aves F₂ da população TCTC, de acordo com os genótipos A/A e A/G do polimorfismo 47920G>A (*IGF1*).

Os resultados da análise de variância das características de desempenho e órgãos, quando o genótipo do polimorfismo 34208C>T do gene *JARID1A* foi incluído no modelo, mostraram que houve efeito de incubação sobre a maioria das características avaliadas, exceto Ppul e Rpul (Tabela 12). Detectou-se efeito de família sobre o PV35, PV41 e Ppul e de sexo sobre a maioria das características, exceto Rcor e Rpul. Houve associação do genótipo do polimorfismo 34208C>T com as características PV41 e Pcor. Foi observada também associação entre a característica PV41 e a interação sexo x genótipo, indicando que os genótipos do polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*) têm efeitos diferentes sobre o PV41 em fêmeas e machos.

Tabela 12 - Probabilidades de erro tipo I na análise de variância das características de desempenho e órgãos quando o genótipo do polimorfismo 34208C>T do gene *JARID1A* foi incluído no modelo

Característica ¹	Incubação	Família	Sexo	Genótipo	Sexo x Genótipo
PV35 (g)	0,0005	0,0023	<,0001	NS	NS
PV41 (g)	0,0196	0,0001	<,0001	0,0193	0,0034
Pcor (g)	<,0001	NS	<,0001	0,0215	NS
Ppul (g)	NS	0,0460	<,0001	NS	NS
Rcor (%)	<,0001	NS	NS	NS	NS
Rpul (%)	NS	NS	NS	NS	NS

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). P>0,05.

A interação sexo x genótipo foi associada com o PV41 (Tabela 12). Para o polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*) a ação gênica foi distinta em machos e fêmeas. As fêmeas com o genótipo T/T apresentaram maior peso vivo do que as com os genótipos C/C e C/T (Figura 12). O contraste indicou efeito aditivo (P= 0,0075) nas fêmeas. Nos machos, no entanto, o contraste revelou efeito de sobredominância (P= 0,0018) uma vez que o PV41 foi mais elevado nos indivíduos com o genótipo C/T (heterozigoto) em relação a ambos os homozigotos. Nas duas famílias analisadas, o alelo T foi proveniente da linhagem de corte, enquanto que o alelo C foi proveniente das linhagens de corte e postura (Anexo II).

O genótipo do polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*) foi também associado com o Pcor (Tabela 12). As aves com o genótipo C/T apresentaram maior peso do coração do que as com os genótipos C/C e T/T (Figura 13), neste loco o contraste revelou efeito não aditivo de dominância (P= 0,0185). Nas duas famílias analisadas, o alelo T foi

proveniente da linhagem de corte, enquanto que o alelo C foi proveniente das linhagens de corte e postura (Anexo II). Porém, foi a combinação dos dois alelos que conferiu o maior peso do coração nos animais.

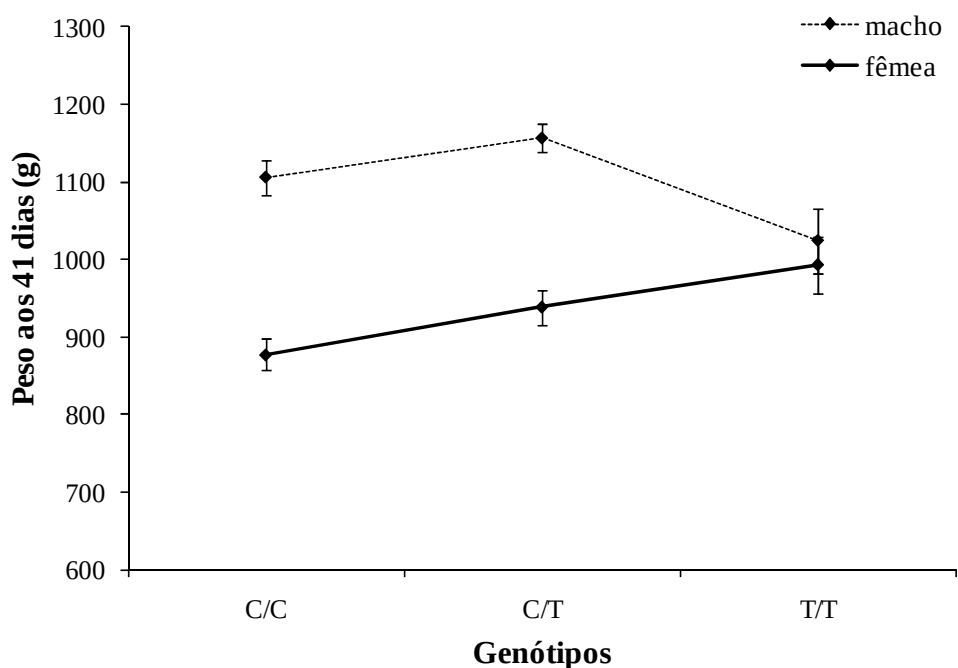


Figura 12 - Peso vivo aos 41 dias de idade de machos e fêmeas F₂ da população TCTC, de acordo com os genótipos C/C, C/T e T/T do polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*).

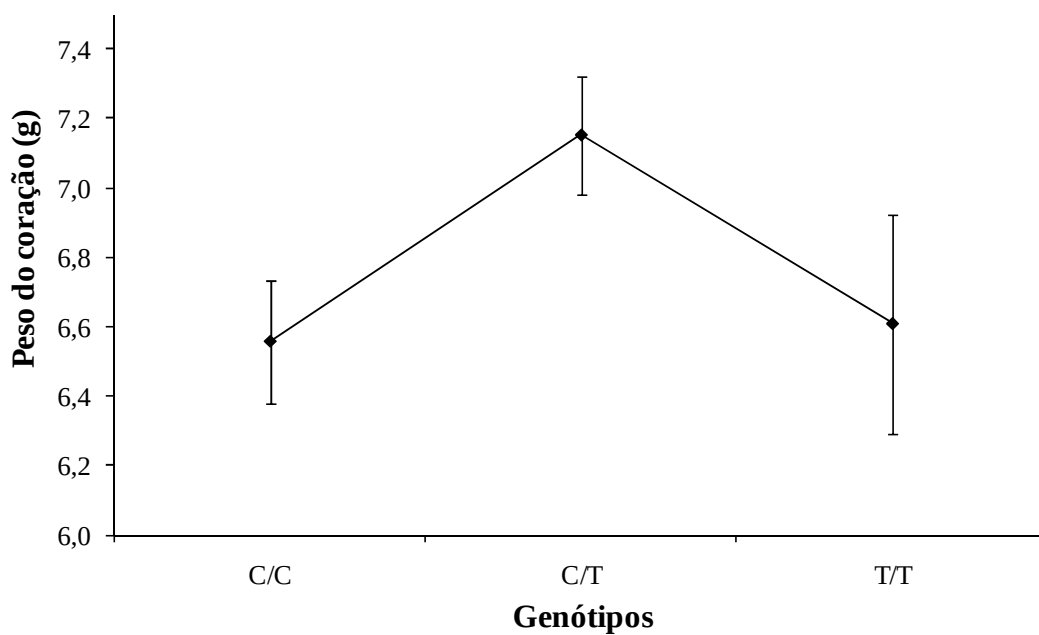


Figura 13 - Peso do coração de aves F₂ da população TCTC, de acordo com os genótipos C/C, C/T e T/T do polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*).

Os resultados da análise de variância das características de desempenho e órgãos, quando o diplótipo foi incluído no modelo, indicaram que houve efeito de incubação sobre a maioria das características avaliadas, exceto Ppul e Rpul. Foi detectado efeito de família apenas sobre o PV35 e PV41 e de sexo sobre a maioria das características, exceto Rcor e Rpul (Tabela 13). Não houve associação do diplótipo com as características avaliadas. Foi observada uma associação entre PV41 e a interação sexo x diplótipo, indicando que o diplótipo exerce efeitos distintos sobre o PV41 em fêmeas e machos (Figura 14).

Tabela 13 - Probabilidades de erro do tipo I na análise de variância das características de desempenho e órgãos quando o diplótipo foi incluído no modelo

Característica ¹	Incubação	Família	Sexo	Diplótipo	Sexo x Diplótipo
PV35 (g)	0,0014	0,0209	<,0001	NS	NS
PV41 (g)	0,0265	0,0089	<,0001	NS	0,0202
Pcor (g)	<,0001	NS	<,0001	NS	NS
Ppul (g)	NS	NS	<,0001	NS	NS
Rcor (%)	<,0001	NS	NS	NS	NS
Rpul (%)	NS	NS	NS	NS	NS

¹Peso aos 35 (PV35) e 41 dias (PV41), peso do coração (Pcor), peso dos pulmões (Ppul), rendimento do coração (Rcor) e dos pulmões (Rpul). $P > 0,05$.

Machos com os diplótipos H1H1(ACAC), H1H2 (ACAT), H1H3 (ACGC) e H1H4 (ACGT) apresentaram PV41 superior ao das fêmeas com os mesmos diplótipos conforme esperado, no entanto, machos e fêmeas com o diplótipo H2H2 (ATAT) apresentaram PV41 semelhantes (Figura 14). Isto sugere que a presença de pelo menos um haplótipo H1 (AC) pode estar envolvida na determinação da diferença de peso entre machos e fêmeas. Nos quatro diplótipos H1H1(ACAC), H1H2 (ACAT), H1H3 (ACGC) e H1H4 (ACGT) existe em comum a presença do alelo C, ausente no diplótipo H2H2. Este alelo é oriundo do gene *JARID1A* e foi o mais freqüente nos animais analisados (Tabela 8). Este alelo, que está localizado numa região de exon do gene *JARID1A* (Figura 7, Tabela 4), pode ser o responsável, em parte, pela diferença de peso entre machos e fêmeas.

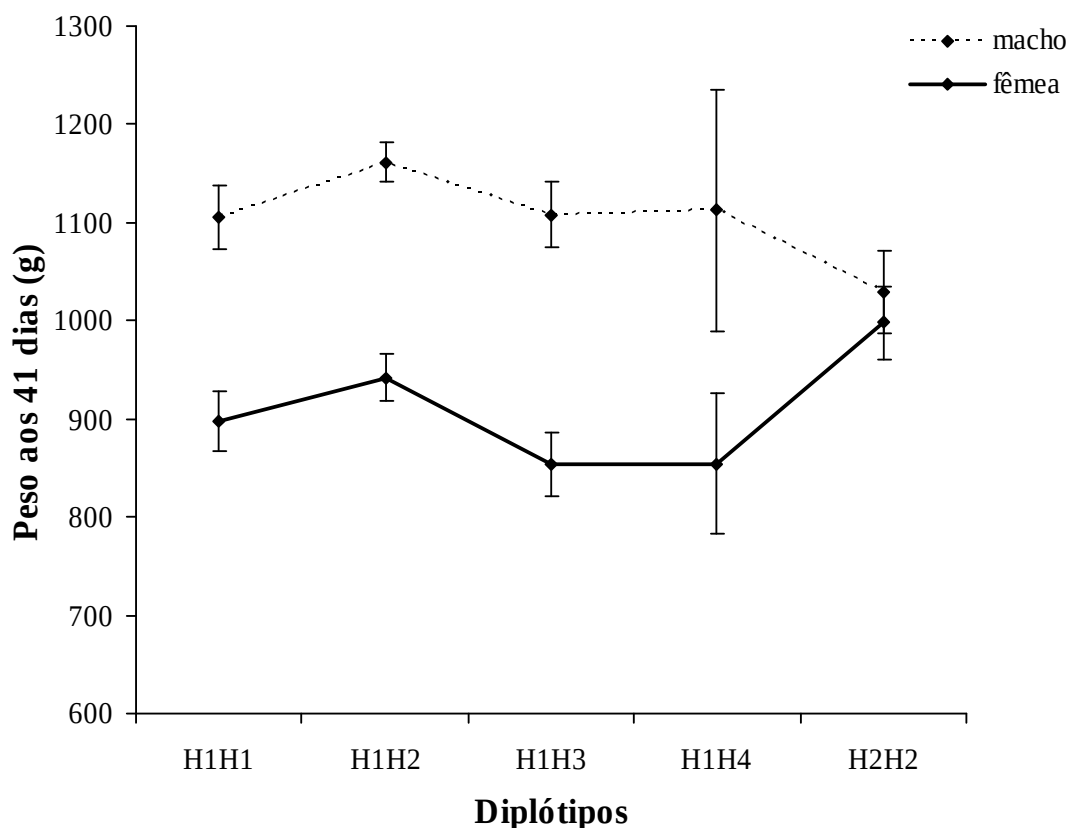


Figura 14 - Peso vivo aos 41 dias de idade de machos e fêmeas F₂ da população TCTC, de acordo com os diplótipos H1H1 (ACAC), H1H2 (ACAT), H1H3 (ACGC), H1H4 (ACGT) e H2H2 (ATAT). Sendo os primeiros haplótipos referentes ao gene *IGF1* e os segundos referentes ao *JARID1A*.

Foram detectados vinte e quatro polimorfismos de uma única base (SNP) no gene *IGF1*, numa região de intron. Vinte deles foram encontrados em todos os animais parentais e F₁. No gene *JARID1A* foram detectados nove polimorfismos em seis regiões distintas, sendo que quatro deles estão em regiões de exons.

Para os dois polimorfismos avaliados nos genes *IGF1* (47920G>A) e *JARID1A* (34208C>T) foram encontradas associações entre as características PV41 e peso do coração. Além disso, para o polimorfismo 34208C>T (*JARID1A*) foi observada associação da interação genótipo x sexo e PV41.

Zhou et al. (2005) encontraram associação de um polimorfismo detectado na região promotora do *IGF1*, com as características de peso vivo as 2, 4, 6 e 8 semanas e porcentagem do peso do coração. Bian et al. (2008) associaram haplótipos dos três polimorfismos identificados em regiões de exons do *IGF1* com peso vivo e peso da

carcaça em galinhas. Estes estudos somam-se aos QTLs para peso vivo identificados na mesma região do cromossomo 1, onde este gene está localizado e aos resultados do presente estudo, como evidências da relação do *IGF1* com o peso vivo em aves.

O peso vivo e do coração são características importantes em frangos de corte. Pesquisadores têm buscado identificar os genes ou regiões responsáveis por elas através de estudos de mapeamento de QTLs (Kerje et al. 2003; Navarro et al., 2005; Zhou et al., 2006; Ambo et al., 2009). Quanto ao peso do coração, a seleção intensa direcionada para ganho de peso e melhor conversão alimentar pode ter ocasionado desenvolvimento desproporcional desse órgão e, conseqüente, desequilíbrio cardio-respiratório, explicando, em parte, a incidência de alterações metabólicas em frangos de corte com crescimento rápido (Berchieri Júnior e Macari, 2000; Gaya et al., 2004).

Em galinhas já foram identificados inúmeros polimorfismos no gene *JARID1A*. Porém, este estudo foi o primeiro a identificar associações de polimorfismos deste gene com características de interesse na avicultura, como peso vivo e peso do coração. Segundo Klose et al. (2007), o *JARID1A* pode agir como um ativador ou repressor da transcrição. A proteína codificada por este gene contém um domínio JMJC (jumonji), definido como uma histona demetilase. As modificações nas histonas (metilação e demetilação) são processos que regulam a expressão gênica e têm papel importante na proliferação e diferenciação celular por suas ações na estrutura da cromatina (Xiang et al., 2007).

Peng et al. (2009) estudaram a expressão de doze genes envolvidos com modificações de histonas durante a diferenciação e proliferação da musculatura esquelética em embriões de suínos. O gene *JARID1A* foi diferentemente expresso na musculatura de embriões com 33, 65 e 90 dias. O estudo revelou que este gene é um promissor gene candidato para o estudo de características de crescimento.

Conclusões

Foram detectados vinte e quatro polimorfismos de uma única base (SNP) no gene *IGF1*, numa única região de intron. Quatro deles apresentaram genótipos diferentes na população analisada, por isso são importantes em estudos de associação com características de interesse na avicultura. No gene *JARID1A* foram detectados nove

polimorfismos em seis regiões distintas, quatro deles estão em regiões de exons, porém não acarretaram modificação do aminoácido e da proteína.

Os dois polimorfismos analisados, um no gene *IGF1* e outro no *JARID1A*, foram associados com peso vivo aos 41 dias e peso do coração, características fundamentais em frangos de corte, mostrando a relevância destes achados. A interação diplótipo x sexo apresentou associação com PV41. Machos com o alelo C do gene *JARID1A*, apresentaram PV41 superior ao das fêmeas. O alelo C foi também o mais freqüente nas aves analisadas. Este alelo pode ser, em parte, responsável pela diferença de peso aos 41 dias entre machos e fêmeas.

Agradecimentos

Este projeto recebeu auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A primeira autora recebeu bolsa que foi concedida pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

Referências Bibliográficas

- AMBO, M. et al. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, v.40, n. 2, p. 200-208, 2009.
- ARKDB, Chicken. Disponível em: <<http://www.thearkdb.org>>. Acesso em: 15 abr. 2006.
- BERCHIERI JÚNIOR, A.J.; MACARI, M. **Doenças das aves**. Campinas: Facta, 2000, 490 p.
- BIAN, L.H. et al. Variation at the insulin-like growth factor 1 gene and its association with body weight traits in the chicken. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 125, n. 4, p.265-270, 2008.
- CHICKEN VARIATION DATABASE (ChickVD). Disponível em: <<http://chicken.genomics.org.cn>>. Acesso em: 26 jan. 2009.
- DUCLOS, M.J.; BECCA VIN, C.; SIMON, J. Genetic models for the study of insulin-like growth factors (IGF) and muscle development in birds compared to mammals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 17, p. 231-243, 1999.
- EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.
- FIGUEIREDO, E.A.P.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C. et al. Genetic gain in egg production and egg weight in White Legorn Embrapa 011. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2003, Porto Alegre. **Proceedings...** Porto Alegre: 2003a. (CD-ROM).

- FIGUEIREDO, E.A.P.; ROSA, P.S.; SCHEUERMANN, G.N. et al. 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., REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO LATINOAMERICANA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2003, Porto Alegre. **Proceedings...** Porto Alegre: 2003b. (CD-ROM).
- FLORINI, J.R., EWTON, D.Z., COOLIGAN, S.A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, p. 481-517, 1996.
- GALKINA, S. et al. FISH on avian lampbrush chromosomes produces higher resolution gene mapping. **Genetica**, v. 128, n. 1-3, p. 241-51, 2006.
- GAYA, L.G. et al. Estimativa de parâmetros genéticos do peso do coração em linhagem macho de frangos de corte. SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5, 2004, Pirassununga. **Proceedings...** Pirassununga: 2004.
- GLAZIER, A.M.; NADEAU, J.H.; AITMAN, T. J. Finding genes that underlie complex traits. **Science**, v. 298, p. 2345-2349, 2002.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v. 8, p. 195-202, 1998.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95-98, 1999.
- KELLY, P.A. Growth Hormone and Prolactin. In: Baulieu, E-E., Kelly, P.A. (Ed.), **Hormones From molecules to disease**. Herman Publishers in Arts and Science. 1990.
- KERJE, S. et al. The twofold difference in adult size between the red junglefowl and white leghorn chickens is largely explained by a limited number of QTLs. **Animal Genetics**, v. 34, n. 4, p. 264-274, 2003.
- KLEIN, S. et al. Genetic and physical mapping of the chicken IGF-I gene to chromosome 1 and conservation of synteny with other vertebrate genomes. **Journal of Heredity**, v.87, n.1, p.10-14, 1996.
- KLOSE, R.J. et al. The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 889-900, 2007.
- MACHIDA, S.; BOOTH F. W. Insulin-like growth factor-I and muscle growth: implications for satellite cell proliferation. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 63, p. 337-340, 2004.
- MACKAY, T.F.C. Quantitative trait loci in *Drosophila*. **Nature Reviews**, v. 2, p. 11-20, 2001.
- NAVARRO, P. et al. Mapping of quantitative trait loci affecting organ weights and blood variables in a broiler layer cross. **British Poultry Science**, v. 46, n. 4, p. 430-442, 2005.
- NCBI National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acessos em: 27 de março de 2008, 1 de julho de 2008, 22 fevereiro de 2009 e 20 de maio de 2009.
- NONES, K. et al. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, v. 37, n. 2, p. 95-100, 2006.

- PENG Y.B.; YERLE, M.; LIU, B. Mapping and expression analyses during porcine foetal muscle development of 12 genes involved in histone modifications. **Animal Genetics**, v. 40, n. 2, p. 242-246, 2009.
- SAS INSTITUTE. SAS user's guide: Statistics Cary, p.955, 2003.
- SCHMID, C. Insulin-like growth factors. **Cell Biology International**, v. 19, n. 5, p.445-457, 1995.
- SCHMID, M. et al. First report on chicken genes and chromosomes 2000. **Cytogenetic Cell Genetics**, v. 90, n. 3-4, p. 169-218, 2000.
- SCHMID, M. et al. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. **Cytogenetic Genome Research**, v. 109, p. 415-479, 2005.
- XIANG, Y. et al. JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. **The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 49, p. 19226-31, 2007.
- ZHOU, H., et al. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. **Poultry Science**, v. 4, p. 212-21, 2005.
- ZHOU, H. et al. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. II. Body composition. **Poultry Science**, v. 85, p. 12-21, 2006.

CAPÍTULO 4

IMPLICAÇÕES

A região no GGA1 entre os marcadores *LEI0146* e *LEI0174*, onde foram mapeados vários QTLs e estão localizados o gene *IGF1* e o centrômero do cromossomo, é uma região importante, que deve ser mais bem estudada na busca de outros genes ou polimorfismos responsáveis pelas características de peso vivo, peso do coração e pulmões. Para refinar a região estudada pode-se buscar outros polimorfismos (SNPs) ou microssatélites e tentar reduzir o intervalo de confiança do mapeamento de QTLs. Além disso, é possível analisar outras características que não foram estudadas, como composição de carcaça e deposição de gordura. As diferentes análises conduzidas permitiram selecionar dois casais F₁ (duas famílias de irmãos completos). As demais famílias podem ser genotipadas e testadas quanto às associações genótipo x características.

O mapa de ligação obtido com a inserção dos dois polimorfismos como marcadores: 47920G>A (*IGF1*) e 34208C>T (*JARID1A*) (Anexo III), pode ser utilizado para a realização de uma nova análise de mapeamento de QTLs.

As associações encontradas entre os polimorfismos 47920G>A e 34208C>T e as características de peso vivo aos 41 dias e peso do coração devem ser validadas em populações comerciais de galinhas. Se forem confirmadas, o polimorfismo pode ser a mutação causal responsável pela característica estudada (ou estar estreitamente ligado a ele) e, assim, poderia ser utilizado na seleção assistida por marcadores (MAS). Estudar a expressão dos genes *IGF1* e *JARID1A* em machos e fêmeas das linhagens parentais da EMBRAPA poderá auxiliar no esclarecimento das associações encontradas entre polimorfismos nestes dois genes e características de PV41 e Pcor.

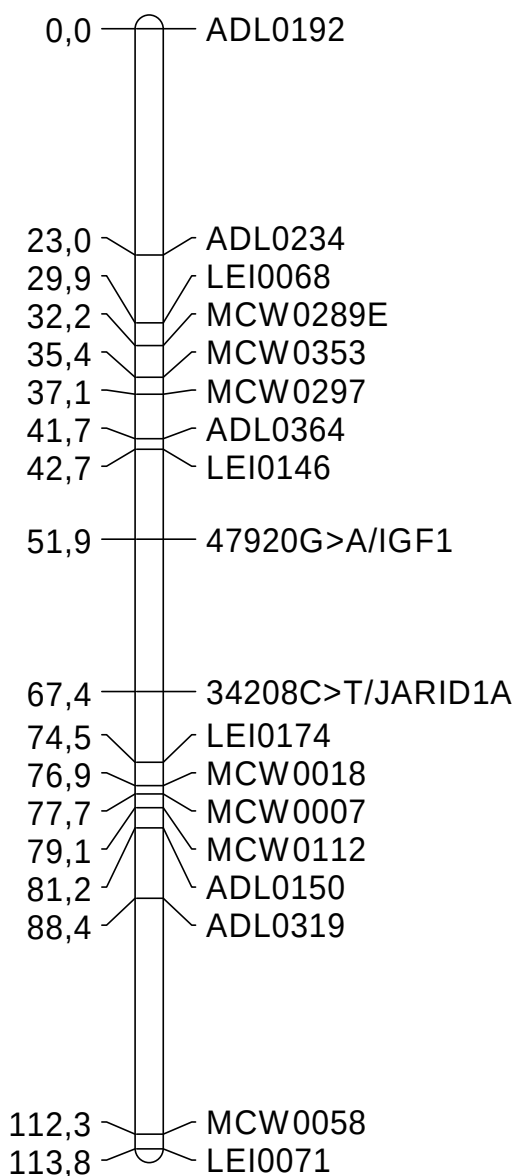
Também se pode buscar por outros genes no intervalo onde foram mapeados os QTLs ou nos intervalos próximos que estejam associados com características de crescimento no intuito de detectar polimorfismos e realizar novos testes de associação ou estudá-los através da análise de expressão gênica.

ANEXOS

I) Posições dos marcadores microssatélites no mapa de ligação do GGA1, correspondência no mapa Consenso (2005) e no genoma da galinha

Marcadores	Posição em cM (ajustado) ²	Posição no Mapa Consenso (2005)	Posição no genoma em Mb (ajustado) ³
<i>ADL0192</i> ¹	0,0 (155,0)	155,0	0,00 (52,85)
<i>ADL0234</i>	23,0 (178,0)	151,0	7,84 (60,70)
<i>LEI0068</i>	29,9 (184,9)	151,0	10,19 (63,05)
<i>MCW0289</i> ¹	32,2 (187,2)	151,0	10,98 (63,83)
<i>MCW0353</i> ¹	35,4 (190,4)	163,0	12,07 (64,93)
<i>MCW0297</i>	37,1 (192,1)	162,0	12,65 (65,51)
<i>ADL0364</i> ¹	41,7 (196,7)	169,0	14,22 (67,07)
<i>LEI0146</i>	42,7 (197,7)	169,0	14,56 (67,41)
<i>LEI0174</i>	71,5 (226,5)	205,0	24,38 (77,23)
<i>MCW0018</i>	73,9 (228,9)	205,0	25,20 (78,05)
<i>MCW0007</i> ¹	74,8 (229,8)	215,0	25,51 (78,36)
<i>MCW0112</i> ¹	76,1 (231,1)	205,0	25,95 (78,80)
<i>ADL0150</i>	78,2 (233,2)	205,0	26,67 (79,52)
<i>ADL0319</i>	85,4 (240,4)	204,0	29,12 (81,98)
<i>MCW0058</i>	109,3 (264,3)	241,0	37,27 (90,13)
<i>LEI0071</i>	110,8 (265,8)	242,0	37,78 (90,64)

¹Marcadores adicionados. ²Posição de acordo com o mapa de ligação ajustada em relação ao marcador *ADL0192* posicionado no Mapa Consenso 2005 (Schmid et al., 2005) a 155 cM. ³A relação adotada entre cM:Mb foi de 1:0,341 de acordo com ArkDB (<http://www.thearkdb.org>; Schmid et al., 2005) e NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



III) Mapa de ligação da região estudada do GGA1 obtido com a adição de seis marcadores microssatélites e dois SNPs dos genes *IGF1* (47920G>A) e *JARID1A* (34208C>T), contendo as posições em centiMorgans (cM). Para a representação gráfica deste mapa foi utilizado o programa *MapChart*, versão 2.1 (Voorrips, 2002). O primeiro marcador foi o *ADL0192* posicionado a 155 cM no Mapa Consenso (Schmid et al., 2005).