

Regiões genômicas associadas a características de desempenho e carcaça no cromossomo 5 de linhagens brasileiras de galinha

Fernanda Eliza de Jesus Silva⁽¹⁾, Luiza Nicolosi Guido⁽¹⁾, Rodrigo Gazaffi⁽²⁾, Antonio Augusto Franco Garcia⁽²⁾, Mônica Corrêa Ledur⁽³⁾, Luiz Lehmann Coutinho⁽¹⁾ e Millor Fernandes do Rosário⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade de São Paulo (USP), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (Esalq), Departamento de Zootecnia, Caixa Postal 9, CEP 13418-900 Piracicaba, SP. E-mail: fejsilva@esalq.usp.br, lu_guido@hotmail.com, llcoutin@esalq.usp.br, millor@usp.br ⁽²⁾USP, Esalq, Departamento de Genética, Caixa Postal 83, CEP 13400-970 Piracicaba, SP. E-mail: rgazaffi@gmail.com, aafgarci@esalq.usp.br ⁽³⁾Embrapa Suínos e Aves, Caixa Postal 21, CEP 89700-000 Concórdia, SC. E-mail: mledur@cnpas.embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente, e construir o mapa de ligação e mapear locos associados a características quantitativas (QTL) de desempenho e carcaça no cromossomo 5 de linhagens brasileiras galinhas. Utilizou-se uma população F₂ CTCT, resultante do acasalamento entre machos da linhagem de postura CC e fêmeas da linhagem de corte TT. Um total de 356 animais foi genotipado com 11 marcadores microssatélites. A caracterização genotípica foi realizada pela estimação dos seguintes parâmetros genotípicos: conteúdo de informação polimórfica (0,45–0,69), heterozigosidades observada (0,48–1,00) e esperada (0,48–0,74), e número de alelos por loco (3–5). Empregou-se o mapeamento por intervalo combinado à modelagem fenotípica por modelo misto, no mapeamento de QTL. O comprimento do mapa de ligação foi de 174,7 cM. Não foram constatadas inversões entre o mapa obtido, o mapa consenso e o genoma. Foram mapeados nove QTL, dos quais sete foram sugestivos ("log of odds", LOD≤1,5) e dois significativos ao nível cromossômico (LOD>3,0). Seis destes QTL são inéditos: conversão alimentar e eficiência alimentar dos 35 aos 41 dias de idade (significativo), pesos de cabeça e fígado, e triglicerídeos e triglicerídeos+colesterol. A população CTCT apresenta variabilidade genotípica, o mapa de ligação é similar ao mapa consenso e ao genoma, e novos QTL foram mapeados.

Termos para indexação: avicultura, mapeamento por intervalo, marcadores microssatélites, locos de características quantitativas.

Genomic regions associated with performance and carcass traits on chromosome 5 of Brazilian chicken lines

Abstract – The objective of this work was to genotype, construct the linkage map and map quantitative trait loci (QTL) associated with performance and carcass on chromosome 5 of Brazilian chickens lines. It was used a F₂ CTCT chicken population, resulting from the crossing of males from a CC layer line with females from a TT broiler line. A total of 356 animals were genotyped with 11 microsatellite markers. Genotypic characterization was carried out by the estimation of the following genotypic parameters: polymorphic information content (0.45–0.69), observed (0.48–1.00) and expected (0.48–0.74) heterozygosities, and number of alleles per locus (3–5). QTL mapping used interval mapping combined with phenotypic modeling via mixed model. The length of the linkage map was 174.7 cM. No inversions were found between the obtained map, the consensus map, and the genome. Nine QTL were mapped, of which seven were suggestive (log of odds, LOD≤1.5) and two significant at the chromosome level (LOD>3.0). Six of these QTL are original: feed conversion and feed efficiency from 35 to 41 days of age (significant), weight of head and liver, and triglycerides and triglycerides+cholesterol. The CTCT population shows genotypic variability, the linkage map is similar to consensus map and genome, and new QTL were mapped.

Index terms: poultry, interval mapping, microsatellite markers, quantitative trait loci.

Introdução

Locos associados a características quantitativas ("quantitative trait loci", QTL) podem ser mapeados em populações segregantes, em que o desequilíbrio de ligação entre marcadores de DNA é utilizado para

construir mapas de ligação, e o desequilíbrio entre marcadores de DNA e QTL, para mapear QTL (Zhu et al., 2001). A galinha se enquadra nas populações parcialmente endogâmicas ("outbred"), que apresentam algumas limitações para o mapeamento de QTL (Van der Beek et al., 1995), tais como: locos associados

a características de seleção, que podem apresentar frequências extremas ou estar fixados dentro das populações, o que reduz o conteúdo de informação de marcadores e QTL; fases de ligação entre QTL e marcadores, que podem variar entre as famílias e, portanto, a associação entre marcadores e QTL deve ser analisada separadamente para cada família; análise estatística mais complexa, pois até quatro alelos por loco podem segregar para cada QTL dentro de uma família; e, por fim, os efeitos dos QTL em populações "outbred" são estimados a partir das variações genéticas (Zhu et al., 2001). Assim, o poder para a detecção de QTL é reduzido quando comparado às populações endogâmicas ("inbred").

Essas desvantagens podem ser superadas por varredura do genoma com locos microssatélites. A informatividade destes locos pode ser estimada pelo conteúdo de informação polimórfica (PIC) e pela heterozigiosidade. Embora a descrição genotípica das populações experimentais possa variar entre elas, em virtude da composição genética, a informatividade dos locos microssatélites pode ajudar na seleção inicial de marcadores e famílias mais informativas em novos estudos de QTL (Rosário et al., 2009).

A informação dos genótipos dos parentais e de suas progênes é necessária para a construção de mapas de ligação nas famílias segregantes. O mapa consenso foi obtido a partir da integração de três mapas de ligação oriundos das populações referência de "Compton", "East Lansing" e "Wageningen" (Groenen et al., 2000; Schmid et al., 2005; ArkDB, 2010). Esses mapas são essenciais para que QTL e genes candidatos associados às características de produção possam ser localizados no genoma.

De acordo com a base de dados ChickenQTLdb (2010), especificamente no cromossomo 5, que perfaz 5% de todo o genoma da galinha (Schmid et al., 2005), já foram mapeados 177 QTL, associados, por exemplo, ao peso corporal (McElroy et al., 2006), à gordura abdominal (McElroy et al., 2006; Zhou et al., 2006; Le Mignon et al., 2009) e ao peso do peito (Le Mignon et al., 2009; Nadaf et al., 2009), entre outros.

No Brasil, a Embrapa Suínos e Aves e a Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz iniciaram, em 1999, estudos sobre o genoma da galinha, cujo objetivo principal tem sido mapear QTL para características de desempenho e carcaça. Foram desenvolvidas duas populações F_2 (CTCT e TCTC), específicas para estudos

genômicos, a partir do cruzamento recíproco de duas linhagens fenotipicamente divergentes: uma de corte (TT) e outra de postura (CC). Essas duas linhagens foram desenvolvidas em condições brasileiras de clima, manejo, sanidade e nutrição. Diversos trabalhos têm sido conduzidos para varredura do genoma com marcadores microssatélites na população TCTC (Nones et al., 2006; Ambo et al., 2009; Campos et al., 2009; Baron et al., 2011) e alguns na população CTCT (Rosário et al., 2009, 2010), somente para os cromossomos 1, 3 e 4.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente, construir o mapa de ligação e mapear locos associados a características quantitativas (QTL) de desempenho e carcaça, no cromossomo 5 de galinhas.

Material e Métodos

A partir de cruzamentos entre duas linhagens desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves, uma de postura (CC) e outra de corte (TT), foi gerada a população F_2 CTCT para mapear QTL associados ao desempenho e à carcaça. Sete machos CC foram cruzados com sete fêmeas TT, e foram gerados aproximadamente 50 animais F_1 CT, dos quais foi selecionado um macho para três fêmeas de cada progênie. Cada macho F_1 foi acasalado com três fêmeas F_1 não aparentadas, tendo-se produzido a geração F_2 CTCT, que totalizou aproximadamente 2.100 animais, ao longo de 17 incubações em oito meses. Das 21 famílias de irmãos completos, foram selecionadas as quatro mais informativas genotipicamente e que tiveram suas progênes F_2 genotipadas, o que totalizou 356 animais (Rosário et al., 2010).

Foram mensuradas as seguintes características na geração F_2 : peso vivo (g) aos 35, 41 e 42 dias de idade; e ganho de peso (g), consumo de ração (g), e conversão alimentar (valor absoluto) e eficiência alimentar (inverso da conversão alimentar) dos 35 aos 41 dias de idade. Aos 42 dias de idade, as aves foram abatidas de acordo com as normas sanitárias e de bem-estar animal para a obtenção dos pesos (g) das partes e dos órgãos: cabeça, pés, asas, pernas (coxas e sobrecoxas), peito (com pele e osso), dorso, gordura abdominal, fígado, coração, moela, pulmões e comprimento do intestino (cm). O peso da carcaça eviscerada (sem pés, cabeça, pescoço e gordura abdominal) foi obtido

pela soma das partes. Também foram avaliadas as seguintes características sanguíneas: hematócrito (%), colesterol (mg dL⁻¹), triglicerídeos (mg dL⁻¹) e triglicerídeos+colesterol (mg dL⁻¹). As médias, os desvios-padrão e os valores máximos e mínimos dessas características, para os 356 animais F₂, foram obtidos por meio do procedimento Proc Means do programa SAS (SAS Institute, 2007), e encontram-se na Tabela 1.

O DNA genômico da geração F₂ foi extraído a partir de amostras de sangue com o reagente DNAzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EUA). Onze marcadores microssatélites, localizados no cromossomo 5, foram utilizados na genotipagem dos 356 animais. Desses onze marcadores microssatélites, sete (LEI0082, MCW0193, MCW0090, LEI0145, LEI0149, ADL0233 e ADL0298) foram selecionados de acordo com Ambo et al. (2009) e genotiparam cerca de 600 animais F₂ da população recíproca TCTC. Os outros quatro marcadores (MCW0214, MCW0238, MCW0223 e ADL0239) foram escolhidos em razão da proximidade com os outros sete, conforme a posição

no mapa consenso. Assim, foi possível saturar a região inicialmente proposta do genoma da galinha.

Cada reação de PCR teve um volume final de 15 µL constituído por: água Milli-Q (q.s.p. 15,0 µL); tampão (10X), 1,5 µL (concentração final de 1X); MgCl₂ (50 mmol L⁻¹), 1,2 µL (concentração final de 4,0 mmol L⁻¹); dNTP (10 mmol L⁻¹), 0,6 µL (concentração final de 0,4 mmol L⁻¹); iniciador reverso e iniciador direto (2,5 µmol L⁻¹ cada), 2,4 µL (concentração final de 0,4 µmol L⁻¹); Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹), 0,3 µL (concentração final de 0,1 U µL⁻¹); DNA (20 ng µL⁻¹), 3,0 µL (concentração final de 4 ng µL⁻¹).

O DNA genômico foi amplificado em termociclador de acordo com o seguinte programa: desnaturação inicial a 94°C por 2 min; 94°C por 1 min; 1 min à temperatura de anelamento (que variou de 50 a 59°C); 2 min a 72°C para extensão; repetição dos passos 2 e 3 por 29 ciclos; e, após os 30 ciclos, 10 min a 72°C. As genotipagens foram realizadas no sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) em placas de 96 poços. Os produtos de PCR, com até quatro marcadores por canaleta, foram agrupados,

Tabela 1. Descrição fenotípica da população F₂ CTCT de galinhas (n = 356).

Característica	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Peso vivo aos 35 dias (g)	860,18	139,26	420,00	1.360,00
Peso vivo aos 41 dias (g)	1.099,05	183,77	583,00	1.736,00
Peso vivo aos 42 dias (g)	1.054,14	181,30	444,00	1.696,00
Ganho de peso aos 35-41 dias (g)	238,87	63,02	59,00	420,00
Consumo de ração aos 35-41 dias (g)	622,39	128,52	291,00	1.056,00
Conversão alimentar aos 35-41 dias (valor absoluto)	2,70	0,65	1,24	9,61
Eficiência alimentar aos 35-41 dias (inverso da conversão alimentar)	0,38	0,06	0,10	0,81
Cabeça (g)	36,29	6,88	23,00	58,00
Pés (g)	40,96	8,91	22,00	71,00
Asas (g)	85,63	14,14	19,00	146,00
Pernas (g)	228,61	40,66	125,00	360,00
Peito (g)	172,26	35,28	72,00	314,00
Dorso (g)	204,29	38,59	87,00	359,00
Gordura (g)	19,22	7,86	2,00	44,00
Fígado (g)	26,45	4,87	16,00	49,00
Coração (g)	6,61	1,65	2,00	13,00
Moela (g)	25,56	4,03	16,00	39,00
Pulmão (g)	8,49	2,23	3,00	16,00
Intestino (g)	162,25	14,84	119,00	212,00
Peso da carcaça (g)	690,80	122,80	303,00	1.179,00
Hematócrito (%)	27,98	2,88	11,00	38,00
Colesterol (mg dL ⁻¹)	99,50	18,06	56,49	192,41
Triglicerídeos (mg dL ⁻¹)	34,57	18,61	6,73	134,43
Triglicerídeos+colesterol (mg dL ⁻¹)	134,18	31,11	78,78	294,08

segundo padrões distintos de tamanho e marcação (fluorescência), com o padrão interno GS-500 ROX (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA), que foi utilizado como referência no cálculo do tamanho dos fragmentos.

Os parâmetros genotípicos – PIC, heterozigosidades observada (H_{obs}) e esperada (H_{esp}), e número de alelos – dos 356 animais F_2 foram estimados com o programa Cervus 3.0 (Marshall et al., 1998) no modo "Allele Frequency Analysis", tendo-se assumido a frequência mínima dos genótipos de 0%.

Os dados fenotípicos foram modelados por meio do Proc Mixed do SAS (SAS Institute, 2007), tendo-se considerado o modelo misto completo, ou seja, os efeitos fixos de família (4) e sexo (2) e aleatório de incubação (14). As possíveis interações que incluíram o efeito de incubação foram consideradas como mistas e as demais como fixas.

O efeito de incubação foi considerado aleatório, não pelo processo em si, que é controlado (temperatura, umidade e tempo de rotação dos ovos), mas pelo efeito da idade da mãe entre as posturas. No decorrer de seu desenvolvimento, as fêmeas apresentam uma curva de postura em que os pintos nascidos no início desta curva são mais leves do que aqueles nascidos no final, pois o tamanho dos ovos é menor no início da postura do que a partir do pico da curva (McLoughlin & Gous, 2000). Como os animais F_2 foram gerados ao longo de 14 incubações quinzenais (sete meses) e a mensuração dos fenótipos foi realizada em tempos adjacentes, há correlação maior entre os animais obtidos no início, no pico e no final da curva de postura, o que está de acordo com o conceito de medidas repetidas no tempo. É possível minimizar o efeito dessa correlação intrínseca, ao considerar, além do erro, a incubação como efeito aleatório, o que possibilita modelar a estrutura da matriz de variância e covariância para esses efeitos. Assim, as análises são flexibilizadas e se tornam mais realistas.

As matrizes de variância e covariância para os efeitos aleatórios de incubação e do erro foram definidas como $G\sigma^2$ e $R\sigma^2$, respectivamente. Essas duas matrizes foram modeladas de acordo com sete estruturas: componentes de variância (CV), autorregressiva de primeira ordem (AR1), autorregressiva heterogênea de primeira ordem (ARH1), simetria composta (CS), simetria composta heterogênea (CSH), Toeplitz (TOEP) e Toeplitz heterogênea (TOEPH). Foi selecionada a que

apresentou o menor valor para o critério de informação bayesiana (Schwarz, 1978). O modelo final conteve os efeitos de família, sexo e incubação, além da média e do erro. Para a matriz G, a estrutura de variância e covariância selecionada foi AR1, e para a matriz R foi CV. A estrutura AR1 se ajustou à estrutura dos dados fenotípicos, pois considera que a correlação entre cada incubação adjacente é reduzida ao longo do tempo ($r^1, r^2, r^3, \dots, r^{14}$), ou seja, que há uma maior correlação entre quaisquer duas incubações adjacentes e uma menor correlação entre quaisquer duas incubações distantes.

Para a construção do mapa de ligação, utilizou-se o programa Crimap (Green et al., 1990) por meio de estimativas multiponto, com "log of odds" (LOD) igual a 3, tendo-se considerado um mapa médio de ambos os sexos. A posição do primeiro loco foi dada em função de sua respectiva posição no mapa consenso. Os mapas foram representados pelo programa MapChart (Voorrips, 2002). O mapa de ligação CTCT foi comparado ao mapa consenso e à posição dos locos descrita pelo UniSTS (National Center for Biotechnology Information, 2010b) na sequência do genoma da galinha (Hillier et al., 2004), com base nos critérios: ordem dos locos, comprimento do mapa obtido e distância entre os locos adjacentes. Para comparar os três mapas, foi adotada a relação de 1 centiMorgan (cM) para 0,2828 mega pares de bases (Mpb), de acordo com Hillier et al. (2004), Schmid et al. (2005), ArkDB (2010) e National Center for Biotechnology Information (2010a).

Os preditores genéticos, ou seja, as combinações lineares das probabilidades condicionais dos diferentes genótipos dos QTL (QQ, Qq, qQ e qq) em função dos genótipos dos marcadores moleculares (Haley et al., 1994), foram calculados por meio do programa QTL Express (Seaton et al., 2002) a cada cM do cromossomo 5.

Para o mapeamento de QTL, foi utilizado o mapeamento por intervalo expandido para as populações parcialmente endogâmicas (Haley et al., 1994), combinado ao modelo misto e às estruturas de variância e covariância AR1 (incubação) e CV (erro). Os efeitos aditivos, ou seja, $a = (QQ - qq)/2$, e de dominância, $d = [Qq - (QQ + qq)/2]$, dos QTL, bem como a percentagem da variância fenotípica explicada pelos QTL, foram estimados para todos os QTL identificados.

As covariáveis empregadas foram peso vivo aos 35 dias de idade, para ganho de peso, consumo de ração, conversão alimentar, e eficiência alimentar dos 35 aos 41 dias de idade e peso vivo aos 42 dias de idade, para os pesos de cabeça, pés, asas, pernas, peito, dorso, gordura abdominal, fígado, coração, moela, pulmão, comprimento do intestino e peso de carcaça.

Assumiu-se como hipótese de nulidade a não existência de QTL associado à cada característica. O nível de significância foi determinado pelo teste de permutação (Churchill & Doerge, 1994), com modificação proposta por Chen & Storey (2006). Foi definido LOD significativo de 3,0 e sugestivo de 1,5, ambos ao nível cromossômico. A percentagem da variância fenotípica explicada pelos QTL foi definida como R^2 , dado em função de $R^2 = (QMR_r - QMR_c / QMR_r) \times 100$, em que QMR_r é o quadrado médio residual do modelo reduzido (sem o QTL) e QMR_c é o quadrado médio residual do modelo completo (com o QTL). Todas as análises foram implementadas pelo programa R (The R Foundation for Statistical Computing, 2010), no qual códigos próprios foram desenvolvidos.

Resultados e Discussão

A geração F_2 apresentou variabilidade genotípica de acordo com todos os parâmetros estimados. A informatividade dos marcadores apresenta relação direta com o seu grau de polimorfismo (Tabela 2). Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), os marcadores podem ser considerados muito informativos

Tabela 2. Conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_{obs}) e esperada (H_{esp}), e número de alelos da população F_2 CTCT de galinhas ($n = 356$).

Marcador	PIC	H_{obs}	H_{esp}	Número de alelos
ADL0233	0,56	0,77	0,62	4,0
ADL0239	0,58	0,90	0,66	3,0
ADL0298	0,67	0,69	0,72	4,0
LEI0082	0,53	0,53	0,60	3,0
LEI0145	0,69	0,83	0,74	5,0
LEI0149	0,61	1,00	0,67	4,0
MCW0090	0,62	0,77	0,68	4,0
MCW0193	0,62	0,62	0,69	4,0
MCW0214	0,60	0,76	0,66	4,0
MCW0223	0,51	0,52	0,59	3,0
MCW0238	0,45	0,48	0,48	4,0
Média	0,59	0,72	0,64	3,8

(PIC superior a 0,5), mediamente informativos (PIC entre 0,25 e 0,5) e pouco informativos (PIC inferior a 0,25). Assim, dos 11 marcadores avaliados, dez foram altamente informativos e apenas um moderadamente informativo (MCW0238).

Os valores de H_{obs} variaram entre 0,48 (MCW0238) e 1,00 (LEI0149). Os marcadores podem ser altamente polimórficos em uma linhagem e monomórficos em outra, o que indica a necessidade de análises preliminares com base no polimorfismo dentro das linhagens que serão utilizadas, em estudos de construção de mapas de ligação e de mapeamento de QTL (Crooijmans et al., 1996). A seleção de animais com maior heterozigosidade aumenta o poder de detecção de QTL e melhora a precisão dos mapas de ligação e a determinação da fase de ligação (Zhu et al., 2001). Os 11 marcadores exibiram o total de 42 alelos, e o número de alelos por loco variou de 3,0 (ADL0239, LEI0082 e MCW0223) a 5,0 (LEI0145), com média de $3,8 \pm 0,18$.

O comprimento do mapa construído foi de 174,7 cM (Figura 1), e foi assumido 32 cM como posição inicial do primeiro marcador, LEI0082. O número médio de meioses informativas de fase conhecida "a posteriori" foi 440, com variação de 174 (LEI0082) a 595

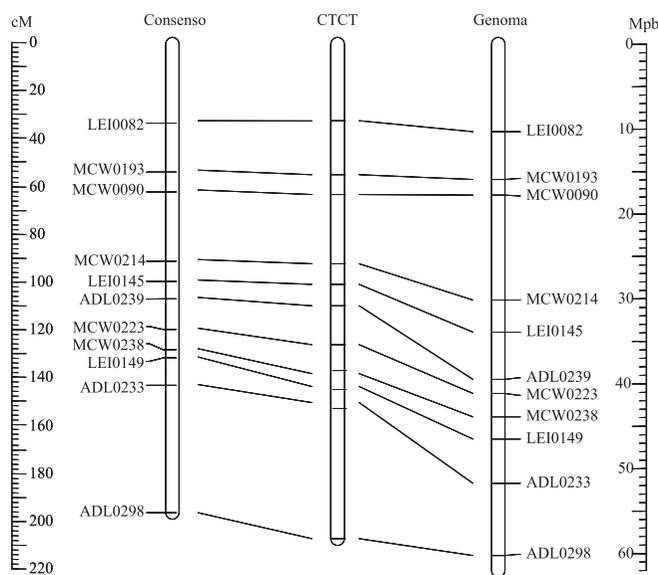


Figura 1. Representação dos mapas consenso (Schmid et al., 2005; ArkDB, 2010) (esquerda) e CTCT em centiMorgans (cM), e posição dos marcadores no genoma da galinha (Hillier et al., 2004; National Center for Biotechnology Information, 2010b) (direita) em mega pares de bases (Mpb).

(MCW0214). O intervalo médio entre os marcadores foi de 17,4 cM. A maior distância entre os marcadores foi de 56,9 cM, entre ADL0233 e ADL0298, o que aumentou o intervalo médio. Na população TCTC, o mapa de ligação para o cromossomo 5, construído por Ruy (2004), apresentou comprimento total de 150,6 cM, com o uso de sete marcadores microssatélites com distância média entre locos de 25,1 cM.

Não foram constatadas inversões entre o mapa da população CTCT e o mapa consenso. As diferenças verificadas entre esses mapas podem ser atribuídas à composição genética dos animais que foram genotipados em cada estudo. A linhagem TT foi composta pelas raças "New Hampshire", "White Cornish" e "White Plymouth Rock", enquanto a CC foi composta pela "White Leghorn" (Rosário et al., 2009). O mapa consenso foi obtido por meio de três populações: "East Lansing" ("Jungle Fowl" e "White Leghorn"), "Compton" ("White Leghorn") e "Wageningen" ("White Plymouth Rock") desenvolvidas por Groenen et al. (2000) e atualizadas por Schmid et al. (2005) e ArkDB (2010). Outros fatores também podem explicar essas diferenças, como, por exemplo, delineamento experimental da população (F_2 ou retrocruzamento), tamanho da população, número de marcadores moleculares disponíveis, número de meioses informativas de fase conhecida, padrão de segregação dos locos, erros de genotipagem, número de genótipos perdidos e sexo (Hackett & Broadfoot, 2003). Esses fatores podem dificultar a comparação entre os mapas de ligação de diferentes estudos. Portanto, de acordo com Rosário et al. (2010), a adoção de medidas de precisão das estimativas, tais como intervalos de confiança para as distâncias genéticas nos mapas, pode ser útil para mensurar a precisão em cada mapa e facilitar comparações com mapas oriundos de outros estudos.

Ao comparar-se o mapa CTCT e o genoma, os marcadores apresentaram a mesma ordem, mas as distâncias entre os locos, a partir do quarto marcador, foram maiores no genoma do que no mapa CTCT, pois as linhas que unem os locos homólogos apresentavam-se inclinadas para baixo (Figura 1). O intervalo médio entre os marcadores (17,7 cM) e o comprimento total do mapa (177,2 cM), entre os locos LEI0082 a ADL0298, foi maior no genoma do que no mapa CTCT, tendo-se assumido 32 cM como posição inicial para o primeiro marcador.

Dos nove QTL mapeados, sete foram sugestivos ($LOD \leq 1,5$) e dois significativos ($LOD > 3,0$), ambos ao nível cromossômico. Os QTL sugestivos foram associados à conversão alimentar, aos pesos de cabeça, pernas, peito e fígado, e aos triglicerídeos e aos triglicerídeos+colesterol. Os QTL significativos foram associados à eficiência alimentar e ao peso da gordura abdominal. O efeito aditivo foi positivo para o peso da gordura abdominal, o que indica que os alelos favoráveis ao incremento desta característica tiveram como origem a linhagem de corte (TT). Para eficiência alimentar, pesos de cabeça, pernas, peito e fígado, e triglicerídeos e triglicerídeos+colesterol, esses alelos tiveram origem na linhagem de postura (CC). Também foram detectados efeitos de dominância para conversão alimentar e peso do peito (efeito negativo, ou seja, animais heterozigóticos apresentaram média inferior aos parentais), eficiência alimentar, e peso de pernas (efeito positivo, isto é, animais heterozigóticos apresentaram média superior aos parentais).

Os QTL associados à eficiência alimentar e aos pesos de pernas e peito apresentaram efeitos aditivo e de dominância. Assim, para peso de peito, pode-se explorar o efeito de aditividade pela seleção dos alelos favoráveis oriundos de CC, sendo obtido um aumento médio de 2,64 g frente à redução de 6,39 g dos heterozigotos pelos cruzamentos. Para as características eficiência alimentar (0,02) e peso de pernas (5,86 g), o efeito de dominância pode ser explorado pelo emprego de cruzamentos. A percentagem da variância fenotípica explicada pelos QTL variou de 1,51 a 9,33% (Tabela 3).

Os QTL para pesos de pernas e peito foram mapeados em regiões flanqueadas pelos mesmos marcadores (ADL0233-ADL0298) (Tabela 3), o que, provavelmente, indica a presença de apenas um QTL com efeito pleiotrópico que atua no controle de várias características. O mesmo foi observado para os QTL mapeados para triglicerídeos e triglicerídeos+colesterol, mas entre os marcadores MCW0214-LEI0145. Contudo, para verificar se esses dois QTL apresentam efeito pleiotrópico ou de ligação é preciso utilizar modelos multivariados.

A busca por QTL na população CTCT concentrou-se em regiões já associadas a QTL na etapa de genotipagem seletiva da população TCTC (Ambo et al., 2009). Entretanto, somente foi possível validar um QTL em TCTC associado ao peso da gordura abdominal, que

foi mapeado por Campos et al. (2009). Para as demais características (conversão e eficiência alimentar, pesos de cabeça, pernas, peito e fígado, e triglicerídeos e triglicerídeos+colesterol), não foram mapeados QTL na população TCTC, no cromossomo 5 (Ambo et al., 2009; Campos et al., 2009; Baron et al., 2011). É provável que essas diferenças sejam atribuídas ao fato de estes autores terem empregado significância dos QTL ao nível genômico, ao analisar cerca de 550 animais F₂. Outros QTL foram mapeados para conversão alimentar (Ambo et al., 2009) e percentagem de gordura (Campos et al., 2009) na população TCTC, nesse cromossomo.

Dos 11 marcadores microssatélites utilizados, nove (81,8%) flanquearam pelo menos um QTL (Tabela 3). Portanto, para delimitar as regiões em que os QTL foram mapeados, utilizou-se a estratégia dos marcadores flanqueadores. As regiões de QTL delimitadas foram comparadas às de QTL associados a características similares às estudadas no presente trabalho no banco de dados ChickenQTLdb (2010). O marcador teve sua posição definida no genoma por meio da mesma relação utilizada na comparação dos mapas de ligação, ou seja, 1:0,2818 cM:Mpb. O posicionamento dos marcadores flanqueadores no genoma é mais realista, pois os mapas genéticos apresentam diferenças na posição e na distância dos marcadores em diferentes estudos, principalmente em decorrência do tipo e da origem genética da população e do número de marcadores utilizados (Rosário et al., 2010). Embora as posições dos marcadores em mapas de ligação diferentes não sejam comparáveis em virtude da falta de associação das medidas de variação, a sequência do genoma da

galinha está disponível e fornece informação genômica mais detalhada.

Nesse contexto, foram detectados QTL ainda não descritos, nas regiões entre ADL0239-MCW0223, associados à eficiência alimentar (LOD>3,0); entre MCW0223-MCW0238, associados à conversão alimentar; entre MCW0090-MCW0214, associados ao peso da cabeça; entre LEI0149-ADL0233, associados ao peso do fígado; e entre MCW0214-LEI0145, associados aos triglicerídeos e aos triglicerídeos+colesterol (LOD≤1,5). Contudo, outros QTL também foram relatados nessas regiões. De Koning et al. (2004) e Nadaf et al. (2009) mapearam, entre MCW0090-MCW0214, QTL associados a características de conformação das pernas. Ainda nesse intervalo, De Koning et al. (2004) mapearam QTL para peso vivo aos 40 dias, e Nadaf et al. (2009) aos 63 dias. Características relacionadas ao escore corporal (De Konig et al., 2004), peso da moela (Tercic et al., 2009) e gordura abdominal (Le Mignon et al., 2009) também foram relatadas nessa região. Um QTL para peso do osso da coxa foi mapeado por De Koning et al. (2004) no intervalo entre MCW0223-MCW0238. Na região entre ADL0239-MCW0233, foram descritos QTL associados ao peso das asas (Ikeobi et al., 2004) e ao peso do peito (De Konig et al., 2004). QTL foram associados ao peso do coração (Tercic et al., 2009) no intervalo entre LEI0149-ADL0233.

O QTL mapeado entre LEI0145-ADL0239 associado ao peso da gordura abdominal confirmou o descrito por Nadaf et al. (2009). Essa característica é importante para a avicultura, pois o mercado consumidor tem

Tabela 3. Locos associados a características quantitativas (QTL) mapeados no cromossomo 5 da população F₂ CTCT de galinhas.

Característica	Posição (cM) ⁽¹⁾	Marcadores flanqueadores	LOD	A ⁽²⁾	D ⁽³⁾	R ² (⁴)
Conversão alimentar	127	MCW0223-MCW0238	1,64*	0,03	-0,18*	1,55
Eficiência alimentar	125	ADL0239-MCW0223	3,08**	-0,01**	0,02**	3,36
Cabeça	79	MCW0090-MCW0214	1,69*	-0,75*	0,15	1,61
Pernas	179	ADL0233-ADL0298	1,61*	-1,80*	5,86*	1,51
Peito	187	ADL0233-ADL0298	1,68*	-2,64*	-6,39*	1,59
Gordura abdominal	105	LEI0145-ADL0239	8,01**	2,41**	-0,10	9,33
Fígado	145	LEI0149-ADL0233	1,88*	-0,55*	-0,04	1,85
Triglicerídeos	93	MCW0214-LEI0145	2,27*	-4,31*	0,84	2,34
Triglicerídeos+colesterol	93	MCW0214-LEI0145	2,02*	-6,21*	3,41	2,03

⁽¹⁾Posição do primeiro loco, obtida em função do mapa consenso (Schmid et al., 2005; ArkDB, 2010): 32 cM. *QTL sugestivo, LOD≤1,5; **QTL significativo, LOD>3,0. ⁽²⁾Efeito aditivo: valores negativos e positivos correspondem à origem do alelo na linhagem de postura (CC) e na linhagem de corte (TT), respectivamente. ⁽³⁾Efeito de dominância: valores negativos e positivos correspondem aos heterozigotos inferiores e superiores à média de seus parentais, respectivamente. ⁽⁴⁾Percentagem da variância fenotípica explicada pelo QTL.

preferido alimentos com menores teores de gordura. Os programas de melhoramento genético têm focado na redução do teor de gordura nas carcaças de frangos de corte, especialmente da gordura abdominal. Porém, por se tratar de uma característica que está correlacionada positivamente ao peso vivo, reduzi-la implicaria em resposta negativa em termos de ganho de peso ou crescimento. Portanto, a estratégia de mapeamento de QTL pode trazer informações adicionais ao processo de seleção, já que esta estratégia é o primeiro passo na busca pelos genes que controlam a deposição de gordura. Um QTL associado à conversão alimentar também foi mapeado nessa região (De Koning et al., 2004).

Em um mesmo intervalo (ADL0233-ADL0298), foram mapeados dois QTL, um associado ao peso de pernas e outro ao peso de peito. O primeiro QTL confirma o evidenciado por Zhou et al. (2007) e o segundo o por Tercic et al. (2009). Nesse intervalo, já foram mapeados outros QTL associados a diversas características como, por exemplo, o peso vivo aos 42 dias (Tercic et al., 2009) e o peso da gordura abdominal (Zhou et al., 2006).

As regiões em que os QTL foram mapeados, principalmente as regiões ainda não descritas na literatura e associadas à conversão alimentar e à eficiência alimentar dos 35 aos 41 dias de idade, aos pesos da cabeça e do fígado, e aos triglicerídeos e aos triglicerídeos+colesterol, poderão ser utilizadas para realizar buscas "in silico" por genes candidatos posicionais e funcionais. Outras abordagens genômicas, como o mapeamento fino, a identificação de polimorfismos de base única do tipo "single nucleotide polymorphism" (SNP) ou em genes candidatos na população CTCT e a validação destes polimorfismos em populações comerciais poderão antecipar a seleção assistida por marcadores na avicultura.

Conclusões

1. A população CTCT é apropriada para a construção do mapa de ligação e o mapeamento de locos associados a características quantitativas no cromossomo 5.

2. O mapa de ligação do cromossomo 5 é similar ao mapa consenso e ao genoma, e pode ser empregado no mapeamento de locos associados a características quantitativas.

3. Novos locos associados a características quantitativas no cromossomo 5 são detectados entre ADL0239-MCW0223, associados à eficiência alimentar dos 35 aos 41 dias de idade; entre MCW0223-MCW0238, associados à conversão alimentar dos 35 aos 41 dias de idade; entre MCW0090-MCW0214, associados ao peso da cabeça; entre LEI0149-ADL0233 associados ao peso do fígado; e entre MCW0214-LEI0145, associados aos triglicerídeos e aos triglicerídeos+colesterol.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas; ao Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologia Agropecuária para o Brasil, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, pela constituição da população experimental; e à especialista em laboratório Nirlei Aparecida da Silva, pelo apoio nas análises laboratoriais.

Referências

- AMBO, M.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.B.; BARON, E.E.; RUY, D.C.; NONES, K.; CAMPOS, R.L.R.; BOSCHIERO, C.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci for performance traits in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*, v.40, p.200-208, 2009.
- ARKDB. *ArkDB [home page]*. Available at: <<http://www.thearkdb.org/>>. Accessed on: 10 May 2010.
- BARON, E.E.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; PINTO, L.F.; BOSCHIERO, C.; RUY, D.C.; NONES, K.; ZANELLA, E.L.; ROSÁRIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. QTL for percentage of carcass and carcass parts in a broiler x layer cross. *Animal Genetics*, v.42, p.117-124, 2011.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.
- CAMPOS, R.L.R.; NONES, K.; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; PINTO, L.F.; AMBO, M.; BOSCHIERO, C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; NINOV, K.; ALTENHOFEN, C.A.B.; SILVA, R.A.M.S.; ROSÁRIO, M.F.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Quantitative trait loci associated with fatness in a broiler-layer cross. *Animal Genetics*, v.40, p.729-736, 2009.
- CHEN, L.; STOREY, J.D. Relaxed significance criteria for linkage analysis. *Genetics*, v.173, p.2371-2381, 2006.
- CHICKENQTLDB. *ChickenQTLdb [home page]*. Available at: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb/chicken.html>>. Accessed on: 10 Sept. 2010.

- CHURCHILL, G.A.; DOERGE, R.W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. **Genetics**, v.138, p.963-971, 1994.
- CROOIJMANS, R.P.M.A.; GROEN, A.F.; VAN KAMPEN, A.J.A.; VAN DER BEEK, S.; VAN DER POEL, J.J.; GROENEN, M.A.M. Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines using pooled blood samples. **Poultry Science**, v.75, p.904-909, 1996.
- DE KONING, D.J.; HALEY, C.S.; WINDSOR, D.; HOCKING, P.M.; GRIFFIN, H.; MORRIS, A.; VINCENT, J.; BURT, D.W. Segregation of QTL for production traits in commercial meat-type chickens. **Genetical Research**, v.83, p.211-220, 2004.
- GREEN, P.; FALLS, K.; CROOKS, S. **CRI-MAP documentation**. Version 2.4. Saint Louis: Washington University School of Medicine, 1990. Available at: <<http://linkage.rockefeller.edu/soft/crimap/>>. Accessed on: 10 Aug. 2010.
- GROENEN, M.A.M.; CHENG, H.H.; BUMSTEAD, N.; BENKEL, B.F.; BRILES, W.E.; BURKE, T.; BURT, D.W.; CRITTENDEN, L.B.; DODGSON, J.; HILLEL, J.; LAMONT, S.; PONCE DE LEON, A.; SOLLER, M.; TAKAHASHI, H.; VIGNAL, A. A consensus linkage map of the chicken genome. **Genome Research**, v.10, p.137-147, 2000.
- HACKETT, C.A.; BROADFOOT, L.B. Effects of genotyping errors, missing values and segregation distortion in molecular marker data on the construction of linkage maps. **Heredity**, v.90, p.33-38, 2003.
- HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; ELSEEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.136, p.1195-1207, 1994.
- HILLIER, L.W. et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v.432, p.695-716, 2004.
- IKEOBI, C.O.N.; WOOLLIAMS, J.A.; MORRICE, D.R.; LAW, A.; WINDSOR, D.; BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Quantitative trait loci for meat yield and muscle distribution in a broiler layer cross. **Livestock Production Science**, v.87, p.143-151, 2004.
- LE MIGNON, G.; PITEL, F.; GILBERT, H.; LE BIHAN-DUVAL, E.; VIGNOLES, F.; DEMEURE, O.; LAGARRIGUE, S.; SIMON, J.; COGBURN, L.A.; AGGREY, S.E.; DOUAIRE, M.; LE ROY, P. A comprehensive analysis of QTL for abdominal fat and breast muscle weights on chicken chromosome 5 using a multivariate approach. **Animal Genetics**, v.40, p.157-164, 2009.
- MARSHALL, T.C.; SLATE, J.; KRUIK, L.E.B.; PEMBERTON, J.M. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v.7, p.639-655, 1998.
- MCELROY, J.P.; KIM, J.J.; HARRY, D.E.; BROWN, S.R.; DEKKERS, J.C.M.; LAMONT, S.J. Identification of trait loci affecting white meat percentage and other growth and carcass traits in commercial broiler chickens. **Poultry Science**, v.85, p.593-605, 2006.
- MCLOUGHLIN, L.; GOUS, R.M. Efecto del tamaño del huevo en el crecimiento pre y post natal de pollitos de engorde. **Avicultura Profesional**, v.18, p.24-29, 2000.
- NADAF, J.; PITEL, F.; GILBERT, H.; DUCLOS, M.J.; VIGNOLES, F.; BEAUMONT, C.; VIGNAL, A.; PORTER, T.E.; COGBURN, L.A.; AGGREY, S.E.; SIMON, J.; LE BIHAN-DUVAL, E. QTL for several metabolic traits map to loci controlling growth and body composition in an F₂ intercross between high- and low-growth chicken lines. **Physiological Genomics**, v.38, p.241-249, 2009.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Map viewer**. 2010a. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/>>. Accessed on: 10 Aug. 2010.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **UniSTS**. 2010b. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unists/>>. Accessed on: 10 May 2010.
- NONES, K.; LEDUR, M.C.; RUY, D.C.; BARON, E.E.; MELO, C.M.; MOURA, A.S.A.M.T.; ZANELLA, E.L.; BURT, D.W.; COUTINHO, L.L. Mapping QTLs on chicken chromosome 1 for performance and carcass traits in a broiler x layer cross. **Animal Genetics**, v.37, p.95-100, 2006.
- ROSÁRIO, M.F. do; LEDUR, M.C.; MOURA, A.S.A.M.T.; COUTINHO, L.L., GARCIA, A.A.F. Genotypic characterization of microsatellite markers in broiler and layer selected chicken lines and their reciprocal F₁s. **Scientia Agricola**, v.66, p.150-158, 2009.
- ROSÁRIO, M.F. do; MARGARIDO, G.R.A.; BOSCHIERO, C.; MOURA, A.S.A.M.T.; LEDUR, M.C.; COUTINHO, L.L.; GARCIA, A.A.F. Precision of distances and ordering of microsatellite markers in consensus linkage maps of chromosomes 1, 3 and 4 from two reciprocal chicken populations using bootstrap sampling. **Genetic and Molecular Research**, v.9, p.1357-1376, 2010.
- RUY, D.C. **Mapeamento de QTL para desempenho e características de carcaça, nos cromossomos 3 e 5 de Gallus gallus**. 2004. 122p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT user's Guide**. Version 9.13. Cary: SAS Institute, 2007.
- SCHMID, M. et al. Second report on chicken genes and chromosomes 2005. **Cytogenetic and Genome Research**, v.109, p.415-479, 2005.
- SCHWARZ, G. Estimating the dimension of a model. **The Annals of Statistics**, v.6, p.461-464, 1978.
- SEATON, G.; HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; KEARSEY, M.; VISSCHER, P.M. QTL Express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. **Bioinformatics**, v.18, p.339-340, 2002.
- TERCIC, D.; HOLCMAN, A.; DOVC, P.; MORRICE, D.R.; BURT, D.W.; HOCKING, P.M.; HORVAT, S. Identification of chromosomal regions associated with growth and carcass traits in an F(3) full sib intercross line originating from a cross of chicken lines divergently selected on body weight. **Animal Genetics**, v.40, p.743-748, 2009.
- THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **The R project for statistical computing**. Available at: <<http://www.r-project.org/>>. Accessed on: 10 June 2010.
- VAN DER BEEK, S.; VAN ARENDONK, J.A.M.; GROEN, A.F. Power of two and three-generation QTL mapping

experiments in an outbred population containing full-sib or half-sib families. **Theoretical and Applied Genetics**, v.91, p.1115-1124, 1995.

VOORRIPS, R.E. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. **Journal of Heredity**, v.93, p.77-78, 2002.

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

ZHOU, H.; DEEB, N.; EVOCK-CLOVER, C.M.; MITCHELL, A.D.; ASHWELL, C.M.; LAMONT, S.J. Genome-wide linkage analysis to identify chromosomal regions affecting phenotypic traits in the chicken. III. Skeletal integrity. **Poultry Science**, v.86, p.255-266, 2007.

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

Recebido em 3 de novembro de 2010 e aprovado em 5 de fevereiro de 2011