

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO EM LINHAGENS DE CODORNA (*Coturnix
japonica*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
DE DESEMPENHO

Autor: Débora Sommer Marques
Orientador: Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino

MARINGÁ
Estado do Paraná
julho - 2009

POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO EM LINHAGENS DE CODORNA (*Coturnix
japonica*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
DE DESEMPENHO

Autor: Débora Sommer Marques
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Gasparino

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ
Estado do Paraná
julho - 2009

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M357p Marques, Débora Sommer
Polimorfismos no gene do hormônio do crescimento em linhagens de codorna (*Coturnix japonica*) e sua associação com características de desempenho / Débora Sommer Marques. -- Maringá : [s.n.], 2009.
70 f. : figs., tabs.

Orientador : Prof^a. Dr^a. Eliane Gasparino.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2009.

1. Codorna (*Coturnix japonica*) - Hormônio do crescimento (GH). 2. Codorna (*Coturnix japonica*) - Polimorfismo genético. 3. Codorna (*Coturnix japonica*) - Polimorfismo - Técnica PCR-RFLP. 4. Codorna (*Coturnix japonica*) - Desempenho. 5. Genética molecular - Codorna (*Coturnix japonica*). 6. Marcador molecular - Técnica PCR-RFLP - Codorna (*Coturnix japonica*). 7. Marcador molecular - Técnica PCR-RFLP - Hormônio do crescimento (GH). I. Gasparino, Eliane, orient. II. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 21.ed. 639.9786272



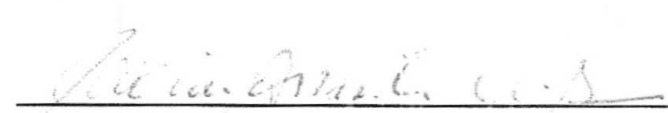
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO EM LINHAGENS DE CODORNAS
(*Coturnix japonica*) E SUA ASSOCIAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO**


Autora: Débora Sommer Marques
Orientadora: Prof^a Dr^a Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 27 de julho de 2009.


Prof^a Dr^a Maria Amélia
Menck Soares


Prof^a Dr^a Maria Aparecida
Fernandez


Prof^a Dr^a Eliane Gasparino
(Orientadora)

Aos
meus pais, Paulo e Cleusa
que são as pessoas que mais amo neste mundo,
sempre me deram força e estímulos....

Aos meus irmãos Arthur, Daniela e Denise

Aos meus sobrinhos, Arthur Gabriel, Vinicius e Miguel

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de viver, pela força para seguir em frente, pela segurança e pela ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos pais, pelas palavras acolhedoras, pelo incentivo de nunca desistir de meus sonhos, pelo amor dedicado durante todos esses anos. Vocês são as pessoas que mais amo e espero nunca ficar longe de vocês.

Aos meus irmãos, Daniela, Arthur e Denise, aos meus Cunhados Everton e Rômulo, e a minha cunhada Karoline, aos meus sobrinhos, Arthurzinho, Viny e Miguel, pelo apoio, pelos conselhos, pela conversas de incentivo e momentos de alegria. Adoro vocês!

A minha querida orientadora e amiga Eliane Gasparino, pelo tempo despendido, pelos esforços empenhados e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho. Por ter guiado e compartilhado sua sabedoria.

A minha eterna mãe científica, Maria Amélia, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho e por sempre estar ao meu lado, sinto muito sua falta!

Aos meus amigos Carol, Deb, Paty, Dani, Patricia, Fabiane, Denise, Darci, Rodrigo, Karen, Valério e toda galera do Lab., pela companhia, pelos momentos de descontração, pela ajuda, vocês foram fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A Universidade Estadual de Maringá, pelo apoio e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

DÉBORA SOMMER MARQUES, filha de Paulo Ademir Sant'ana Marques e Cleusa Maria Sommer Marques, nasceu em São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul, no dia 13 de setembro de 1983.

Em dezembro de 2006, concluiu o curso de Ciências Biológicas Bacharelado pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Em março de 2007, iniciou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Melhoramento Genético Animal.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Avicultura	11
1.2 Coturnix japonica.....	11
1.3 Marcador Molecular	13
1.4 Hormônio do crescimento em aves.....	15
1.5 Polimorfismos do gene GH e sua associação às características de produção.....	16
1.6 Referências.....	17
II. OBJETIVOS GERAIS	21
III. SEQUENCIAMENTO DE UM FRAGMENTO DO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM CODORNAS	22
Resumo	22
Growth Hormone fragment sequencing of quails	23
Abstract –.....	23
Introdução	24
Material e Métodos	26
Resultado e Discussão	28
Conclusão	35
Referências	36
IV. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E CARCAÇA EM CODORNAS	39
Resumo :.....	39
Association among the growth hormone gene polymorphism and carcass traits performance in quails	40
Abstract :	40
Introdução	41

Materiais e Métodos	43
Resultados	46
Discussão	49
Conclusão.....	51
Referências	52
V. APÊNDICE.....	54
Apêndice I: Normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.	54
Apêndice II: Normas da revista Genetics and Molecular Biology.	65

RESUMO

Estudos genéticos com codornas são menos frequentes do que os desenvolvidos para frangos, de postura ou corte. O hormônio do crescimento (GH) possui papel fundamental no desenvolvimento das aves, afeta a produção de ovos e participa no desenvolvimento ósseo e muscular esquelético, estimulando o crescimento muscular, sendo um gene candidato muito estudado. Em várias espécies, polimorfismos têm sido identificados no gene do GH e associados a características de interesse. Este trabalho teve como objetivo estudar um fragmento do gene do hormônio do crescimento em diferentes linhagens de codornas (três de postura e uma de corte), gerando sequências inéditas por intermédio de sequenciamento automático, e a utilização de programas gratuitos de análise de sequências nucleotídicas para verificar polimorfismos, possibilitando utilizar essa informação em programas de melhoramento. Outro objetivo foi detectar polimorfismos no gene GH, utilizando a técnica de PCR-RFLP, e associá-los as características de desempenho e carcaça. Para isso, 200 codornas (*Coturnix japonica*), pertencentes a dois grupos genéticos (linhagem de corte e cruzamento entre postura x corte) foram analisadas. Foi observada alta similaridade (85%) entre os fragmentos sequenciados e a sequência do mesmo gene em galinha, sendo verificadas mutações pontuais como transversões e transições, além de deleções e inserções de bases. Entre as linhagens de codornas foram verificados 20 polimorfismos, estando a maioria desses localizados nas regiões de íntrons. Entretanto, na região 5'UTR no éxon 1, foi detectada um importante polimorfismo (C/T), o qual pode ser utilizado em diversos estudos de associações com características de interesse econômico, visto que em outras espécies, polimorfismos nesta mesma região indicaram associação com características de produção. Com a utilização da enzima *PvuII*, foram obtidos três

genótipos (C/C, C/T, e T/T) para o polimorfismo T→C. A linhagem de corte apresentou os três genótipos, sendo que a maior frequência foi observada para o heterozigoto (C/T), 48,52%, enquanto o cruzamento apresentou apenas dois genótipos (C/C,C/T). A análise de variância revelou associação significativa entre os genótipos marcadores (GH-*PvuII*) e o RP para machos do cruzamento, com maior média para o genótipo C/C ($41,05 \text{ g} \pm 2,35\%$). Neste estudo observou-se também, efeito do genótipo marcador (GH-*PvuII*) sobre as características H e UH, sendo o genótipo C/C o que apresentou maior média para as características ($5,64 \pm 0,71 \text{ mm}$ e $94,66 \pm 3,26$, respectivamente).

ABSTRACT

Genetic studies with quails are less frequent than those with broiler or layer chicken. The growth hormone (GH) plays a fundamental role on the birds' development. The GH affects egg production and participates on the development of bone and skeletal muscle, stimulating muscle growth, thus making GH a very well studied candidate gene. On many species, polymorphisms have been identified in the GH gene and have been associated to characteristics of interest. This work had the objective of studying a fragment of the growth hormone gene on different lineages of quails (three layer lineages and one broiler lineage), generating unpublished sequences by automatic sequencing and the use of free software of nucleotide sequence analysis to verify polymorphisms, as well as enabling the use of this information in improvement programs. Another objective of this work was to detect GH gene polymorphisms in quails, using the PCR-RFLP technique and associate these polymorphisms to performance and carcass traits. For this, 200 quails (*Coturnix japonica*), belonging to two genetic groups (broiler lineage and crossing between layer x broiler lineages) were analyzed. It was observed high similarity (85%) among the sequenced fragments and the sequence of the same gene on chicken, although it was verified punctual mutations as transversions and transitions, and also deletions and insertions of bases. Among quails lineages were verified 20 polymorphisms, mostly located on intro regions. However, on the region 5'UTR of the exon 1, it was detected an important polymorphism (C/T), which can be used on several studies of associations with economical interest characteristics, because in other species, polymorphisms on this same region indicated an association with production characteristics. Using the PvuII enzyme, three genotypes were found (C/C, C/T and T/T) for the T→C polymorphism.

The broiler lineage presented the three distinct genotypes and the higher frequency was observed for the heterozygote (C/T), 48.52%, while the crossing lineage presented only two genotypes (C/C,C/T). The variance analysis revealed significant association between marking genotypes (GH-PvuII) and the RP on the males of the crossing lineage, with the highest average for the genotype C/C (41.05 g + 2.35%). On this study were also observed the effects of the marking genotype (GH-PvuII) on the characteristics H and UH, being the genotype C/C the one that presented the highest average for the characteristics ($5.64 \pm 0,71$ mm and 94.66 ± 3.26 , respectively).

I. INTRODUÇÃO

1.1 Avicultura

A avicultura é a criação comercial de aves voltada para produção de carne, ovos e subprodutos. Dentre as espécies criadas na avicultura, o frango destaca-se como a espécie mais apreciada pelos consumidores, e em menor escala também são criados patos, gansos, codornas, marrecos e avestruzes.

Segundo a Organização Mundial de Alimentos, a produção mundial de carne de frango é de $73,5 \times 10^9$ toneladas por ano, e a produção de ovos é de aproximadamente 59×10^9 toneladas. No Brasil as produções estimadas são de 94×10^5 e 18×10^5 para carne e ovos respectivamente, destacando o Brasil como terceiro no “ranking” dos países mais produtores de carne de frango e sétimo em produção de ovos (FAO, 2009).

A produção de aves, tanto de corte como postura, teve um crescimento enorme no século passado. Isso foi possível em razão das melhorias no manejo, nutrição, ambiente, instalações, sanidade e, principalmente, por causa dos progressos obtidos pelo melhoramento genético. O grande aumento do volume de produção e a eficiência de produção por ave são atribuídos, na sua maioria, ao desenvolvimento genético das linhagens das aves (Albers & Groot, 1998).

1.2 Coturnix japonica

As codornas pertencentes à ordem das Galináceas, família Faisácidas e gênero Coturnix, possuem altos índices de produtividade, rápido crescimento, pequeno porte, facilmente manipuláveis, ciclo reprodutivo curto, com postura regular. Todas essas vantagens fazem da codorna um animal muito utilizado como modelo para as aves domésticas em pesquisas laboratoriais (Oliveira, 2002).

A produção de codorna (*Coturnix japonica*) vem aumentando de maneira considerável, desde a sua implantação como atividade avícola econômica, em virtude do consumo em larga escala de carne e ovos por vários países do mundo, principalmente na China, Japão, Brasil, França e Espanha (Minvielle, 2004). As codornas também são muito utilizadas como modelos para experimentação animal e pesquisa, em diversas áreas, tais como, desenvolvimento embrionário (Creuzet et al, 2004), comportamento animal (Mignon-Grasteau, 2003), fisiologia (Balthazart et al, 2003), genética (Odeh et al., 2003) e biomedicina (Lin et al., 2002).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o plantel brasileiro de codorna teve um aumento de 5,3% no ano de 2007, chegando a mais de 7 milhões de animais. A produção de ovos foi estimada em mais de 131 milhões de dúzias produzidas por ano, caracterizando um aumento de 5,9% em relação ao ano anterior (IBGE, 2009).

A criação de codornas tem encontrado barreiras que por vezes inviabilizam a exploração econômica. Uma dessas barreiras é a falta de material genético que garanta o potencial de produção. A prática corrente tem sido a reprodução do material genético disponível que, pela deficiência de controle e falta de esquema de seleção adequados, sofre problemas de depressão pela consanguinidade, resultando em redução de postura, queda de fertilidade e aumento de mortalidade.

O ovo de codorna é uma fonte alimentar abundante em nutrientes essenciais, é constituído de 74,6% de água, 13,1% de proteína, 1,1% de minerais e 11,2% de lipídeos (Panda & Singh, 1990). Existem vários métodos para se determinar a qualidade do ovo, como por exemplo, a medida da altura da clara, a altura da gema, o diâmetro da clara, espessura de casca e vários outros (Wesley & Stadelman, 1959). Existem cinco métodos para estimar a qualidade interna do ovo, com bases quantitativas, relacionadas ao albume: altura da clara (Wilgus & Van Wagenen, 1936); índice do albume (Heiman & Carver, 1936); índice da área do albume (Parsons & Mink, 1937); percentagem da clara espessa e fina (Holts & Almiquist, 1932); e a unidade “Haugh” (Haugh, 1937).

O parâmetro mais utilizado para expressar a qualidade do albume é a unidade “Haugh”. A unidade “Haugh” é uma expressão matemática que correlaciona o peso do ovo com a altura da clara espessa (albume). De modo geral, quanto maior o valor da unidade “Haugh”, melhor a qualidade do ovo (Rodrigues, 1975). O uso da unidade “Haugh” tem sido geralmente, aceito como uma medida da qualidade do albume em diversas pesquisas sobre a qualidade de ovos (Alleoni & Antunes, 2001), e é

considerada uma medida padrão de qualidade e usada, praticamente, por toda a indústria avícola (Williams, 1992).

A carne de codorna é escura, macia, saborosa e pode ser preparada da mesma maneira que a de frango de corte. Pesquisas indicam que a carne de codorna é uma excelente fonte de vitamina B6, niacina, B1, B2, ácido pantotênico, bem como de ácidos graxos. A carne de codorna apresenta grandes concentrações de Ferro, Fósforo, Zinco e Cobre quando comparada à carne de frango. A quantidade de colesterol da carne de codorna atinge valores intermediários (76 mg) entre a carne de peito (64 mg) e da coxa e sobrecoxa (81 mg) do frango. A maioria dos aminoácidos encontrados na carne de codorna são superiores aos de frango. Vários autores concluíram que a idade, sexo, linhagem e nutrientes da dieta afetam a composição química da carcaça das aves.

Avaliando o rendimento de carcaças de codornas, de ambos os sexos, abatidas com 5, 6, 7, 8 e 9 semanas de idade, Yalcin et al. (1995) concluíram que estes valores foram da ordem de 73, 70, 69, 69, e 69%, respectivamente, mostrando que as aves ganham pouco peso de 6 a 9 semanas. O sexo afetou significativamente o peso corporal e o peso das vísceras, sendo estes valores maiores para as fêmeas do que para os machos em todas as idades. Ferreira et al. (2005), avaliaram o desempenho produtivo e o rendimento de carcaça em 4 grupos genéticos, no qual observaram que a partir dos 28 dias as fêmeas foram mais pesadas do que os machos, e partir dos 42 dias, as fêmeas tiveram maior consumo de ração, mas melhor conversão alimentar do que os machos. Da mesma forma Caron et al. (1990) mostraram que as fêmeas são mais pesadas do que os machos de mesma idade.

1.3 Marcador Molecular

Avanços significativos na produção animais vêm sendo obtidos por técnicas tradicionais de melhoramento. A biotecnologia vem trazer a possibilidade de utilização de novas ferramentas no processo de melhoramento animal. Aliadas as metodologias tradicionais, as novas técnicas deverão aumentar ainda mais o progresso genético que vem sendo observado nos animais domésticos. O uso de marcadores moleculares, principalmente de DNA, permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão e antes mesmo da expressão do fenótipo.

O termo polimorfismo genético é classicamente definido como a ocorrência de variações nucleotídicas em uma mesma população, com duas ou mais variantes alélicas,

resultantes de mutações pontuais ou rearranjos do DNA, tais como substituições, inserções, inversões e deleções.

Trabalhar com marcadores genéticos significa utilizar características herdáveis em indivíduos de uma dada população, considerando que todos os marcadores refletem diferenças nas sequências de DNA (Sunnucks, 2000). As variantes genéticas podem ser aplicadas como marcadores para diversos estudos em populações, como na identificação de espécies e híbridos, estabelecimento de filogenia, medida do nível de variação genética em populações cultivadas e selvagens, determinação do impacto da introdução de populações cultivadas em populações selvagens (Ferguson et al., 1995), determinação da qualidade do patrimônio genético de espécies de interesse econômico e como ferramenta auxiliar em programas de melhoramento genético.

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética, como o sequenciamento e os marcadores moleculares, capazes obter um número virtualmente ilimitado de polimorfismos, cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem estar localizados em regiões codificante ou não codificante, e podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética, quanto na prática de melhoramento de plantas e de animais (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

Uma importante ferramenta molecular, eficaz na identificação de variações genéticas são os marcadores RFLP (Restriction Fagment Length Polymorphism). Estes polimorfismos são de natureza bi-alelica e caracteristicamente codominantes, podem estar em regiões codificantes, em genes de cópias únicas. A técnica PCR-RFLP consiste na amplificação do gene alvo, seguida pela digestão de uma endonuclease de restrição, assim, variações são explicadas pela ocorrência ou não de mutações no sítio de restrição da enzima, resultando em diferentes tamanhos de fragmentos de restrição.

Genes candidatos para uma determinada característica são genes envolvidos nos principais mecanismos fisiológicos e vias metabólicas, direta ou indiretamente envolvidas na determinação de características de produção (exemplos: conversão alimentar, ganho de peso, reprodução, resistência a doenças, etc). Os genes candidatos são identificados na espécie de interesse e seus polimorfismos detectados. Os polimorfismos são associados com a característica de interesse através de análise estatística apropriada, utilizando-se dados provenientes de uma amostra de população comercial.

A utilização de técnicas moleculares aplicadas à genética, aliadas às técnicas tradicionais de melhoramento animal, poderá proporcionar maiores ganhos genéticos, o grande problema na prática da criação é descobrir indícios das modificações no nível dos progressos da seleção o mais cedo possível, para que se possa modificar o sistema de melhoramento antes que o mesmo se torne ultrapassado.

1.4 Hormônio do crescimento em aves

A secreção do hormônio do crescimento (GH) pelas células somatotróficas da hipófise anterior é modulada por influências hipotalâmicas estimulatórias e inibitórias. A secreção pulsátil de GH é determinada, principalmente, por uma complexa inter-relação entre dois peptídeos hipotalâmicos, o hormônio liberador de GH (GHRH) e a somatostatina (SRIF), que inibe a secreção de GH. Além do GHRH e da SRIF, diversos outros fatores interferem na secreção de GH, atuando diretamente sobre a hipófise ou sobre a liberação destes fatores hipotalâmicos, tais como neurotransmissores, hormônios periféricos, e fatores metabólicos (Lengyel, 2006).

O hormônio do crescimento (GH) é uma molécula proteica, composto por 191 aminoácidos e secretados pela hipófise anterior, possui papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de aves e de muitos outros animais, influencia diretamente em vários parâmetros fisiológicos, tais como crescimento e reprodução (Stephen et al., 2001). O GH também afeta a produção de ovos e está envolvido com a resistência a doenças (Kuhnlein, 1997), participa no desenvolvimento ósseo, além de modular a partição de nutrientes entre os tecidos adiposo e muscular esquelético, estimulando o crescimento muscular e reduzindo a deposição de gordura na carcaça (Etherton, 2001), sendo um gene candidato muito estudado.

A estrutura genômica do gene do GH tem sido estudada em diferentes animais, e sua estrutura tem se mostrado bastante similar entre as espécies. Em frangos, o gene GH foi primeiramente isolado e sequenciado por Lamb et al. (1988), e a partir de então, vários outros autores estudaram amplamente este gene. Tanaka et al. (1992) clonaram e sequenciaram o gene do GH em galinhas (*Gallus gallus*), e concluíram que o mesmo possuía um tamanho aproximado a 4.100 pares de bases (pb), e era composto 5 éxons e 4 íntrons. Entretanto, o tamanho do gene gGH era significativamente maior que o gene análogo em mamíferos, isto, em razão do tamanho dos íntrons que são bem maiores.

1.5 Polimorfismos do gene GH e sua associação às características de produção

Polimorfismos em genes que regulam a produção hormonal e, por conseguinte, regulam o metabolismo e o desempenho animal são interessantes e têm sido muito estudado. Os genes do eixo somatotrófico desempenham papel central na regulação do crescimento e desenvolvimento (Mao et al, 1997). Estudos recentes mostraram que polimorfismos encontrados nesses genes afetam a expressão gênica a nível transcricional e traducional (Lo et al., 2003; Wyszynska-Koko et al., 2006). Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em genes do eixo somatotrófico foram associados significativamente a características de crescimento (Qiu et al., 2006; Amills et al., 2003; Fang et al., 2006) e carcaça em galinhas (Lei, 2007).

Em um grande número de espécies, polimorfismos têm sido identificados neste gene e associados à características de interesse econômico. Em suínos os polimorfismos foram associados à performance e características de carcaça (Franco, 2005), em bovinos, foi associado à produção de leite (Lucy, 1993), e com características reprodutivas (Lechniak 2003), em peixes foi associado com peso de filé e rendimento de carcaça (Blanck, 2008 (Dados não publicados)).

A maioria dos polimorfismos encontrados no GH de frangos está localizada nas regiões de introns, podendo ser identificado por várias metodologias, tais como: RFLPs, SSCP e sequenciamento. Estudos com frango de corte utilizando RFLP mostraram que o gene GH é altamente polimórfico, e seus alelos já identificados possivelmente estão associados à gordura abdominal (Fotouhi et al., 1993) produção de ovos (Ip et al., 2001) e ganho de peso (Feng et al., 1997).

Tanaka et al. (1995), encontraram um fragmento adicional de 197 pb, localizado no íntron 1. Mou (1995) também sequenciou o gene gGH e encontrou o mesmo fragmento adicional, na posição +308 no íntron 1. Outros autores também encontraram polimorfismos neste gene, Fotouhi et al. (1993) identificou 4 sítios RFLPs, 1 para *Sac* I e 3 para *Msp* I, estes últimos localizados no íntrons 1, 2 e 4, respectivamente. Nie et al. (2002) detectaram uma deleção de 50 pb no íntron 4 em frangos nativos chineses. Nie et al. (2005) identificaram 46 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), sendo que 36 dos 46 estavam localizados em íntrons. Em codornas, não foram encontrados na literatura trabalhos que envolvessem associações entre polimorfismos genéticos e dados de produção.

1.6 Referências

ALBERRS, G.A.A.; GROOT, A. Future trends in poultry breeding. **World Poultry**. v.14, p.42-44, 1998.

ALLEONI, A.C.C.; ANTUNES, A.J. Unidade de Haugh como medida da qualidade de ovos de galinha armazenados sob refrigeração. **Scientia Agricola**, v.58, n.4, p.681-685, 2001.

BALTHAZART, J.; BAILLIEN, M.; CHARLIER, T.D.; CORNIL, C.A.; BALL, G.F: The neuroendocrinology of reproductive behavior in Japanese quail. **Domestic Animal Endocrinology**, v.25, p.69-82, 2003.

CARON, N.; MINVIELLE, F. Mass selections for 45- day body weight in Japanese quail: selection response carcass composition, cooking properties and sensory characteristics. **Poultry Science**, v.69, p.1037- 1045, 1990.

CREUZET, S.; SCHULER, B.; COULY, G.; LE D.N.M: Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. v.101, p.4843-4847, 2004.

ETHERTON, T.D. Porcine growth hormone: A central metabolic hormone involved in the regulation of adipose tissue growth. **Nutrition**, v.17, P.789–792, 2001.

FANG, M.; NIE, Q.; LUO, C.; ZHANG, D.X.; ZHANG, X.Q. An 8 bp indel in exon 1 of ghrelin gene associated with chicken growth. **Domestic Animal Endocrinology** V.32, p.216-225, 2006.

FAO: <https://www.fao.org.br/> acesso em 13 de junho de 2009.

FENG, X.P.; KUHNLEIN, U.; AGGREY, S.E.; GAVORA, J.S.; ZADWORNÝ, D. Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. **Poultry Science**, v.76, p1770-1775, 1997.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODÖHL, P.A.; MCMEEL, O., THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. Population and conservation. **Journal Biology**, v.47, p.103-126, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Brasília:Embrapa**, 3ª edição, 1996, 220p.

FOTOUHI, N.; KARATZAS, C.N.; KUHNLEIN, U.; ZADWORNÝ, D. Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens. **Theoretical and Applied Genetics**, v.85, p.931–936, 1993.

FRANCO, M.M.; ANTUNES, R.C.; 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.

HAUGH, R.R. The Haugh unit for measuring egg quality. **United States Egg Poultry Magazine**, v.43, p.552-555, 1937.

HEIMAN, V.; CARVER, J.S. The albumen index as a physical measurement of observed egg quality. **Poultry Science**, v.15, p.141-148, 1936.

HOLTS, W. F.; ALMQUIST, H.J. Measurement of deterioration in the stored hen's egg. **United States Egg Poultry Magazine**, v.38, p.70, 1932.

IBGE: <http://www.ibge.gov.br/> acesso em 10 de junho de 2009.

IP, S.C.Y.; ZHANG, X.; LEUNG, F.C. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native chinese chickens. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.5, p.458-462, 2001.

KUHNLEIN, U.; NI, L.; WEIGEND, S.; GAVORA, J.S.; FAIRFULL, R.W.; ZADWORNÝ, D. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, p.116-123, 1997.

LAMB, L.C.; GALEHOUSE, A.D.M.; FOSTER, D.N. Chicken growth hormone cDNA sequence. **Nucleic Acids Research**, v.16, p.9339, 1988.

LECHNIAK, D.; STRABEL, T.; BOUSQUET, D.; KING, W.A. Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, n.3, p.224-227, 2003.

LEI, M.; LUO, C.; PENG, X.; FANG, M.; NIE, Q.; ZHANG, D.; YANG, D.; ZHANG, X. Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chicken. **Poultry Science**, v.86, p.835-842, 2007.

LENGYEL, A. M. J. . From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 17-24, 2006.

LIN, C.Y.; HO, C.H.; HSIEH, Y.H.; KINKUCHI, T. Adeno-associated virus-mediated transfer of human acid maltase gene results in a transient reduction of glycogen accumulation in muscle of Japanese quail with acid maltase deficiency. **Gene Therapy**, v.9, p.554-563, 2002.

LUCY, M.C.; HAUSER, S.D.; EPPARD, P.J.; KRIVI, G.G.; CLARK, J.H.; BAUMAN, D.E.; COLLIER, R.J. Variants of somatotropin in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v.10, p.325-333, 1993.

MAO, J.N.C.; COGBURN, L.A.; BURNSIDE, J. Growth hormone down-regulates growth hormone receptor mRNA in chicken but developmental increases in growth hormone receptor mRNA occur independently of growth hormone action. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.16, p.135-143, 1997.

MIGNON-GRASTEAU, S.; ROUSSOT, O.; DELABY, C.; FAURE, J.M.; MILLS, A.; LETERRIER, C.; GUÉMENE, D.; CONSTANTIN, P.; MILLS, M.; LÉPAPE, G.; BEAUMONT, C. Factorial correspondence analysis of fear-related behavior traits in Japanese quail. **Behav Processes**, v.61, p.69-75, 2003.

MINVIELLE, F. The future of Japanese quail for research and production. **World's Poultry Science Journal**, v.60, p.500-507, 2004.

MOU, L.; LIU, N.; ZADWORN, D.; CHARLIFOUR, L.; KUHNLEIN, U. Presence of an additional *PstI* fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. **Gene**, v.160, n.2, p.313-314, 1995.

NIE, Q.; IP, S.C.Y.; ZHANG, X.; LEUNG, F.C.; YANG, G. New variations in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. **Journal of Heredity**, v.93, p.277-279, 2002.

NIE, Q.; SUN, B.; ZHANG, D.; LUO, C.; ISHAG, N.A.; LEI, M.; YANG, G. ZHANG, X. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. **Journal of Heredity**, v.96, n.6, p.698-703, 2005.

ODEH, F.M.; CADD, G.G.; SATTERLEE, D.G. Genetic characterization of stress responsiveness in Japanese quail. 1. Analyses of line effects and combining abilities by diallel crosses. **Poult Sci**, v.82, p.25-30, 2003.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M.; MENDES, A.A.; VEIGA, N.; DIAS, K. Desempenho produtivo de codornas para corte de ambos os sexos alimentadas com dietas com quatro níveis protéicos. **Archives of Veterinary Science**. Curitiba. v. 7, n. 2, p. 75 – 80, 2002.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M.; MENDES, A.A.; VEIGA, N.; DIAS, K. Desempenho produtivo de codornas para corte de ambos os sexos alimentadas com dietas com quatro níveis protéicos. **Archives of Veterinary Science**. Curitiba. v. 7, n. 2, p. 75 – 80, 2002.

OLIVEIRA, E.G.; ALMEIDA, M.I.M.; MENDES, A.A.; VEIGA, N.; DIAS, K. Desempenho produtivo de quatro grupos genéticos de codornas (*Coturnix* sp.) para corte. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 3, p. 33-37, 2005.

PANDA, B.; SINGH, R.P. Developments in processing quail meat and eggs. **World's Poultry Science Journal**. Ithaca, v.46 n.11, p.219-234, 1990.

PARSONS, C.H.; MINK, L.D. Correlation of methods for measuring the interior quality of eggs. **United States Egg Poultry Magazine**, v.43, p.484-489, 1937.

QIU, F.F.; NIE, Q.H.; LUO, C.L.; ZHANG, D.X.; LIN, S.M.; XANG, X.Q. Association of single nucleotide polymorphisms of the insulin gene with chicken early growth and fat deposition. **Poultry Science**, v.85, p.980-985, 2006.

RODRIGUES, P.C. Contribuição ao estudo da conversão de ovos de casca branca e vermelha. Piracicaba, 1975. 57p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

STEPHEN, C.Y.; IP, X.Q.; ZHANG, FREDERICK, C.L. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native Chinese chickens. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, p.458-46, 2001.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, v.15, p.199-203, 2000.

TANAKA, M.; HOSOKAMA, Y.; WATAHIKI, M.; NAKASHIMA, K. Structure of the chicken growth hormone – recoding gene and its promoter region. **Gene**, v.112, p.235-239, 1992.

TANAKA, M.; NAKASHIMA, K. The structure of intron 1 in the chicken growth hormone encoding gene. **Gene**, v.160, n.2, p.313-314, 1995.

WESLEY, R.L.; STADELMAN, W.J. Measurement of interior egg quality. **Poultry Science**, v.38, p.474–481, 1959.

WILGUS, H.S.; WAGENEN, A.V. The height of the firm albumen as a measure of its condition. **Poultry Science**, v.15, p.319-321, 1936.

WILLIAMS, K.C. Some factors affecting albumen quality with particular reference to Haugh unit score. **World's Poultry Science Journal**, v.48, p.5-16, 1992.

WYSZYNSKA-KOKO, J.; PIERZCHALA, M.; FLISIKOWSKI, K.; KAMYCZEK, M.; ROZYCKI, M.; KURY J. Polymorphisms in coding and regulatory region of the porcine MYF6 and MYOG gene and expression of the MYF6 gene in m. longissimus dorsi versus productive traits in pigs. **J. Applied Genetics**, v.47, p.131-138, 2006.

YALCIN, S.; OGUZ, I.; OTLES, S. Carcase characteristics of quail (*Coturnix coturnix japonica*) slaughtered at different ages. **British Poultry Science**, v.36, p.393-399, 1995.

II. OBJETIVOS GERAIS

Sequenciar um fragmento do gene do hormônio de crescimento em linhagens de postura e corte de codornas (*Coturnix japonica*), mantidas na Universidade Estadual de Maringá – PR, e por análise comparativa buscar por variantes alélicas no gene candidato GH, com potencial para estudos de associação com características de interesse econômico.

Detectar polimorfismos no gene do GH em codornas através do marcador molecular PCR – RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polimorphism*) e associar os polimorfismos a características de desempenho e carcaça.

III. SEQUENCIAMENTO DE UM FRAGMENTO DO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO EM CODORNAS

Resumo – Estudos genéticos com codornas são menos frequentes do que os desenvolvidos para frangos, de postura ou corte. Este trabalho teve como objetivo estudar um fragmento do gene do hormônio do crescimento em diferentes linhagens de codornas (três de postura e uma de corte), gerando sequências inéditas (acesso EU515188, EU515189, EU515190 e EU515190) por intermédio de sequenciamento automático e utilização de programas gratuitos de análise de sequências nucleotídicas para verificar polimorfismos, possibilitando utilizar essa informação em programas de melhoramento. Foi observada alta similaridade (85%) entre os fragmentos sequenciados e a sequência do mesmo gene em galinha, sendo verificadas mutações pontuais como transversões e transições, além de deleções e inserções de bases. Entre as linhagens de codornas foram verificados 20 polimorfismos, e um localizado em uma importante região gênica, a 5'UTR, onde a transição C/T ocorre entre linhagens e dentro da linhagem, podendo ser utilizados em diversos estudos de associações com características de interesse econômico, visto que em outras espécies, polimorfismos nesta mesma região indicaram associação com características de produção.

Termos para indexação: *Coturnix japônica*, GH, SNPs, marcadores moleculares, polimorfismo.

Growth Hormone fragment sequencing of quails.

Abstract – Genetic studies with quails are less frequent than those with broiler or layer chicken. This work had the objective of studying a fragment of the growth hormone gene on different lineages of quails (three layer lineages and one broiler lineage), generating unpublished sequences (access EU515188, EU515189, EU515190 and EU515190) by automatic sequencing and the use of free software of nucleotide sequence analysis to verify polymorphisms, enabling the use of this information in improvement programs. It was observed a high similarity (85%) among the sequenced fragments and the sequence of the same gene on chicken, although it was verified punctual mutations as transversions and transitions, and also deletions and insertions of bases. Among quails lineages were verified 20 polymorphisms, being one of them located on an important genic region, the 5'UTR, where the C/T transcription occurs among lineages and inside the same lineage, which can be used on several studies of associations with economical interest characteristics, because in other species, polymorphisms on this same region indicated an association with production characteristics.

Index Terms – *Coturnix japonica*, GH, SNPs, molecular marker, polymorphism.

Introdução

A criação de codornas vem aumentando, de maneira considerável, desde a sua implantação como atividade avícola. Contudo, essa expansão tem encontrado barreiras que por vezes inviabilizam sua exploração econômica. Uma dessas barreiras é a falta de material genético que garanta o potencial de produção. Não existe no Brasil qualquer programa de melhoramento genético de codorna desenvolvido em bases técnicas. A prática corrente tem sido a reprodução do material genético disponível que, pela deficiência de controle e falta de esquema de seleção adequado, sofre problemas de depressão pela consanguinidade, resultando em redução de postura, queda de fertilidade e aumento de mortalidade.

Da mesma maneira, informações moleculares para características de interesse econômico em codornas também são raras. A análise da estrutura genética populacional pode ser realizada por meio de técnicas moleculares, que atualmente têm passado por grandes avanços tecnológicos. Essas metodologias podem auxiliar a compreensão das relações evolutivas entre espécies, bem como auxiliar o estudo de divergência genética (Milligan et al., 1994; Fritsch & Rieseberg, 1996) e de associação de variantes alélicas a características quantitativas.

Existem algumas técnicas utilizadas para análise das variações no DNA, como o sequenciamento e marcadores moleculares, que auxiliam no conhecimento dos padrões de variação genética inter e intrapopulacionais, contribuindo para elaboração de estratégias em programas de melhoramento (seleção ou cruzamento).

Polimorfismos em genes que regulam a produção hormonal e, por conseguinte, regulam o metabolismo e o desempenho animal têm sido muito estudados por causa da importância de sua função, assim como os genes do eixo somatotrófico que desempenham papel central na regulação do crescimento e desenvolvimento (Mao et al., 1997). Estudos recentes mostraram que polimorfismos encontrados nesses genes afetam a expressão gênica a nível transcricional e traducional (Wyszynska-Koko et al., 2006). Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) em genes do eixo somatotrófico foram associados significativamente a características de crescimento (Amills et al., 2003; Fang et al., 2006; Qiu et al., 2006) e carcaça em galinhas (Lei et al., 2007).

O gene do hormônio de crescimento (GH) afeta uma grande variedade de parâmetros fisiológicos tais como controle de apetite, crescimento, composição corporal, envelhecimento e reprodução (Byatt et al., 1993; Vasilatos-Younken et al.,

1997). O gene do GH da galinha é composto por 5 éxons e 4 íntrons (Tanaka et al., 1992) semelhante ao encontrado em mamíferos (Woychik et al., 1982; Byrne et al., 1987), contudo os íntrons são maiores e altamente polimórficos (Ip et al., 2001).

A utilização de técnicas moleculares aplicadas à genética, aliadas às técnicas tradicionais de melhoramento animal, poderá proporcionar maiores ganhos genéticos, podem determinar o potencial do animal, antes mesmo que seu fenótipo seja expresso, o grande problema na prática da criação é descobrir indícios das modificações no nível dos progressos da seleção o mais cedo possível, para que se possa modificar o sistema de melhoramento antes que o mesmo se torne ultrapassado.

Com este estudo objetivou-se investigar, através da técnica de sequenciamento, um fragmento do gene do hormônio de crescimento em linhagens de postura e corte em codornas, mantidas na Fazenda Experimental da Universidade Estadual de Maringá – PR, e por análise comparativa entre as linhagens buscar por variantes alélicas no gene candidato GH, com potencial para estudos de associação com características de interesse econômico.

Material e Métodos

Neste trabalho, foram utilizados oito animais, pertencentes a quatro linhagens de codorna (*Coturnix japonica*), para obtenção de amostras de DNA a partir de células sanguíneas (duas aves de cada linhagem). As linhagens, denominadas pelas cores azul, vermelha, amarela (postura) e verde (corte), são mantidas pela Universidade Estadual de Maringá, na Fazenda Experimental de Iguatemi.

Foram coletados aproximadamente 0,5 mL de sangue de cada animal. Após a coleta, as amostras foram resfriadas a 4°C, e armazenadas no laboratório de Reprodução/Genética Molecular da Universidade Estadual de Maringá, até o momento da extração de DNA.

O DNA genômico foi obtido das células sanguíneas pela adição de 500 µL de tampão contendo cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) em tubos de 1,5 mL. As amostras foram mantidas por uma hora em banho-maria a 65°C, com agitações ocasionais. Em seguida, o DNA extraído foi deixado à temperatura ambiente por alguns minutos para resfriamento, quando foram adicionados 500 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) acompanhado por agitação. Após a centrifugação por 15 minutos a 1.3000 g, o sobrenadante foi transferido e precipitado com a adição de 250 µL de isopropanol, seguido por resfriamento a 4°C durante 30 minutos. O DNA precipitado foi centrifugado a 1.3000 g por 30 min. O pellet foi então lavado por duas vezes em etanol 75% e, após evaporação, o DNA foi dissolvido em tampão TE (Tris-HCL 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8) e quantificado a 260 nm e 280 nm. Esse protocolo foi desenvolvido a partir do protocolo proposto por Murray e Thompson (1980).

Para amplificar o fragmento referente ao gene do hormônio de crescimento em codorna, foi utilizada a sequência gênica de galinha, que, no início dos estudos, serviu como referência (Tanaka et al., 1992; número de acesso ao *GenBank* D10484), visto que na época em que os estudos foram iniciados em codorna, não havia uma sequência deste gene publicada com a espécie em estudo. Foram utilizados os mesmos *primers* desenhados por Kuhnlein et al. (1997), 5'-ATCCCCAGGCAAACATCCTC-3' e 5'-CCTCGACATCCAGCTCACAT-3' e programa de amplificação proposto pelos mesmos autores.

Os *primers* foram analisados quanto à fidelidade ao gene GH através do acesso ao banco de dados de sequência de nucleotídeos disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health-USA*). Os produtos de PCR

foram avaliados em gel de agarose 1%, revelados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). Os fragmentos de DNA adequadamente amplificados foram purificados (Kit PureLink Invitrogen), quantificados e sequenciados em sequenciador automático (MegaBACE 1000 Amersham life Science – USA), usando o Kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare, USA), pela técnica de terminação em cadeia (Sanger et al., 1977). As sequências geradas foram pareadas e analisadas comparativamente usando o programa Clustal W, tendo o gene GH de *Gallus gallus* (número de acesso ao *GenBank*: AY46184) como fonte de referência, uma vez que os *primers* foram desenhados tendo esse genoma como modelo.

Após o sequenciamento, vários polimorfismos foram verificados nas sequências analisadas e um deste polimorfismo foi testado utilizando a enzima de restrição *Pst*I (Invitrogen) em 200 codornas. Após a clivagem, nova análise foi realizada em eletroforese em gel de poliacrilamida. Esta análise permitiu identificar animais portadores ou não de polimorfismos genéticos para o gene analisado.

Resultado e Discussão

Como produto da PCR foram obtidos fragmentos de aproximadamente 700 pares de bases (pb), utilizando *primers* específicos para o gene do hormônio do crescimento (GH) de galinha. Os fragmentos obtidos nas quatro linhagens, compreenderam a região promotora do gene, o éxon 1 (onde está incluída a região 5'UTR) e grande parte do íntron 1, conforme comparação com a sequência de referência AY461843 (Figura 1). Os fragmentos amplificados foram sequenciados, resultando, após edição, em um fragmento de 686 pb (Figura 2). As sequências do GH de codorna da linhagem vermelha, verde, azul e amarela, foram depositadas no *GenBank*, sob número de acesso EU515188, EU515189, EU515190 e EU515191, respectivamente.

O sequenciamento de bases realizado nas amostras de DNA das quatro linhagens de *Coturnix japonica*, por comparação com a sequência de referência utilizando o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), possibilitou detectar polimorfismos entre estas duas espécies. Um pareamento estatisticamente significativo, com alta similaridade, 85%, foi verificado com a sequência depositada por Sun et al. em 2003, número de acesso AY461843, que na análise dos resultados foi a sequência utilizada como referência por ter apresentado maior similaridade quando comparada com a sequência depositada por Tanaka et al. (1992) que apresentou 84% de similaridade.

```

Verde      CATCTCCGTATAAATCGACTACAATTGAGGTGGCGCCATGGCGAACACACCTGCATTTAT
Amarela   CATCTCCGTATAAATCGACTACAATTGAGGTGGCGCCATGGCGAACACACCTGCATTTAT
Azul      CATCTCCGTATAAATCGACTACAATTGAGGTGGCGCAC-ATGGCGAACACACCTGCATTTAT
Vermelha  CATCTCCGTATAAATCGACTACAATTGAGGTGGCGCCATGGCGAACACACCTGCATTTAT
Ref. 331   CATCTCCGTATAAAT-GACTACAAT-GAGGTAGCACCATGGCGAACACACTCTGCATTTAT
*****
          340      350      360      370      380
Verde      GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGATCGTGATCACCCCCATCCATTTTAAACAG
Amarela   GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGATCGTGATCACCCCCATCCATTTTAAACAG
Azul      GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGATCGTGATCACCCCCATCCATTTTAAACAG
Vermelha  GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGATCGTGATCACCCCCATCCATTTTAAACAG
Ref. 389   GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGTGTATCAGGACCCCCATCCATTTTAAACAG
*****
          390      400      410      420      430      440
Verde      ACCCCAGCTATATAAAGGGGG-TCTCACCTGCCAGCATCACTCG-ATGAAAGGAGGAAA
Amarela   ACCCCAGCTATATAAAGGGGG-TCTCACCTGCCAGCATCACTCG-ATGAAAGGAGGAAA
Azul      ACCCCAGCTATATAAAGGGGGTCTCACCTGCCAGCATCACTCG-ATGAAAGGAGGAAA
Vermelha  ACCCCAGCTATATAAAGGGGG-TCTCACCTGCCAGCATCACTCG-ATGAAAGGAGGAAA
Ref. 449   ACCCCAGCTATATAAAGGGGTG-TCTCACCTGTTATCATCACCTGGTGGGGGGGG
*****
          450      460      470      480      490      500
Verde      CATTCAAGAGACACCCGAGCAACTCTCCCGCAGGAATGGCTCCAGGTACTTTGCTTTAT
Amarela   CATTCAAGAGATACCCGAGCAACTCTCCCGCAGGAATGGCTCCAGGTACTTTGCTTTAT
Azul      CATTCAAGAGATACCCGAGCAACTCTCCCGCAGGAATGGCTCCAGGTACTTTGCTTTAT
Vermelha  CATTCAAGAGACACCCGAGCAACTCTCCCGCAGGAATGGCTCCAGGTACTTTGCTTTAT
Ref. 508   CGTTGAGGACACCTGAGCAACTCTCCCGCAGGAATGGCTCCAGGTACTTTGCTTTAT
* ***** * ** *****
          510      520      530      540      550      560
Verde      CTCAGTT----GGATGTGCCAATGCTGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGTGATGGAG
Amarela   CTCAGTT----GGATGTGCCAATRCTGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGTGATGGAG
Azul      CTCAGTT----GGATGTGCCAATGCTGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGTGATGGAG
Vermelha  CTCAGTT----GGATGTGCCAATGCTGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGTGATGGAG
Ref. 571   CTCAGTTCTAATGGGTGTTCCATGCTGCTGCATGCTTTGGGTGATGGGATACGATGGTG
***** * ** *****
          570      580      590      600      610      620
Verde      GGGTGGTGGTGGGCTG-CAAACACAGTGTGCTGCTGCTGAAATTCAAA-----
Amarela   GGGTGGTGGTGGGCTG-CAAACACAGTGTGCTGCTGCTGAAATTCAAA-----
Azul      GGGTGGTGGTGGGCTG-CAAACACAGTGTGCTGCTGCTGAAATTCAAA-----
Vermelha  GGGTGGTGGTGGGCTG-CAAACACAGTGTGCTGCTGCTGAAATTCAAA-----
Ref. 628   GGGTGGTGGTGGGCTGACACACAGCAGAGCCGGCTCTGAAATAAAATGTGGCAACT
***** *****
          630      640      650      660      670      680
Verde      --CAGATCAATGACAAAGGAAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACT
Amarela   --CAGATCAATGACAAAGGAAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACT
Azul      --CAGATAAATGACAAAGGAAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACT
Vermelha  --CAGATCAATGACAAAGGAAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACT
Ref. 687   TACAGATCAGTACAAAGGATCTCCTTCCCTACAGTGCACCTCAAACCATGAGCTGACT
***** *****
          690      700      710      720      730      740
Verde      CAGGTAAACCTGAGCTTACCTTGGT-AAGGGGCAGGAATGAGCTGCGGAATACAAAGAA
Amarela   CAGGTAAACCTGAGCTTAACTTGGT-AAGGGGCAGGAATGAGCTGCGGAATACAAAGAA
Azul      CAGGTAAACCTGAGCTTACCTTGGT-AAGGGGCAGGAACGAGCTGCGGAATACAAAGAA
Vermelha  CAGGTAAACCTGAGCTTACCTTGGT-AAGGGGCAGGAATGAGCTGCGGAATACAAAGAA
Ref. 747   CAGGTAAACCTGAGCTTAACTTGGT-AAGGGGCAGGAATGAGCTGCGGAATACAAAGAA
***** *****
          750      760      770      780      790      800
Verde      GGCCTGGCTGAAAAGCAGCTTCAAAGACCATTTACTTTCCAAACCCCTGCACCTTGTCCCCA
Amarela   GGCCTGGCTGAAAAGCAGCTTCAAAGACCATTTACTTTCCAAACCCCTGCACCTTGTCCCCA
Azul      GGCCTGGCTGAAAAGCAGCTTCAAAGACCATTTACTTTCCAAACCCCTGCACCTTGTCCCCA
Vermelha  GGCCTGGCTGAAAAGCAGCTTCAAAGACCATTTACTTTCCAAACCCCTGCACCTTGTCCCCA
Ref. 924   GGCCTGGCTGAAAAGCAGCTTCAAAGATCACCTAATTTCAAACCCCTGCACCTTGTCCC--A
**** * * *****
          930      940      950      960      970      980
Verde      AGTCCTGCAGGCTCCAGGGCAGCTCCTCCACTGATGTTCACTCCA
Amarela   AGTCCTGCAGGCTCCAGGGCAGCTCCTCCACTGATGTTCACTCCA
Azul      AGTCCTGCAGGCTCCAGGGCAGCTCCTCCACTGATGTTCACTCCA
Vermelha  AGTCCTGCAGGCTCCAGGGCAGCTCCTCCACTGATGTTCACTCCA
Ref. 982   AGTCCTGCAGGCTCCAGGGCAGCTCCTCCACTGAAAGTTAAACCCCTA
*****
          990      1000      1010      1020

```

Figura 1 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos (ClustalW) de um fragmento do gene do hormônio do crescimento. Verde: Linhagem de corte de codorna. Amarelo, Azul e vermelha: linhagens de postura de codornas. Ref.: sequência de referência da mesma região gênica em galinha (AY461843). Sublinhado maior: região do éxon 1 que inicia a tradução dos 3 primeiros aminoácidos (MAP) da sequência sinal. Sublinhado menor: Sítio de restrição da enzima *PstI*, encontrado na sequência de galinha. Abaixo do alinhamento, os asteriscos indicam que as bases são iguais em todas as linhagens.

Com o alinhando das sequências do GH, observaram-se duas deleções maiores, uma de cinco e outra de 12 nucleotídeos no gene da codorna em relação ao gene da galinha, iniciando na posição 575 e 677, respectivamente, além de várias inserções, transições e transversões de base única ou poucas bases consecutivas, identificadas, assim como nos casos anteriores, pela ausência de asterisco abaixo de cada alinhamento (Figura 1). Sem contar os dois primeiros casos (deleções maiores), foram identificadas 87 diferenças entre as sequências das codornas em relação à sequência da galinha, sendo 52 transições (60%), 25 transversões (29%), 7 inserções (8%) e 3 deleções (3%). As variações entre as duas espécies, mas que também variaram entre as sequências das codornas, não foram consideradas nesta contagem.

Segundo Sun et al. (2003), em *Gallus gallus* a região estudada apresenta dois sítios de reconhecimento para a enzima *Pst*I, a qual identifica a sequência 5'...CTGCA▼G...3' como seu sítio para corte. Nos 200 fragmentos de codorna submetidos a digestão com a mesma enzima, verificou-se que um dos sítios não estava presente em nenhuma das amostras e o polimorfismo verificado em galinha não foi confirmado em codorna. No presente estudo, o sequenciamento propiciou verificar uma transição de G por A, na posição 793 (Figura 1), modificando o sítio de reconhecimento da enzima. Assim, embora estas espécies compartilhem muito da estrutura genômica, elas apresentam diferenças de bases únicas (ou poucas bases contíguas) em seu genoma, o que representa o tipo mais comum de variação que podemos encontrar entre os genomas de várias espécies. Estes polimorfismos podem ser utilizados como marcadores moleculares no estudo de genética de populações, assim como em estudos de associação de polimorfismos e seus efeitos no fenótipo (Rafalski, 2002) e podem gerar ou eliminar sítios de restrição que são reconhecidos por várias enzimas.

Na análise comparativa considerando-se apenas as sequências de codornas, foram encontrados 20 polimorfismos entre as linhagens, estes podendo ser possíveis sítios de corte para várias enzimas, salientando que as linhagens; amarela, vermelha e azul são de postura e a linhagem verde é de corte (Figura 2 e Tabela 1). A linhagem azul concentrou a maior quantidade de polimorfismos entre as linhagens estudadas sendo que dos 20 locais polimórficos, sete deles estavam presentes apenas nesta linhagem.

```

AMARELA      CATCTCCGTATAAAATCGACTACAATTGAGGTGGCCCATGGCGAACACACCTGCATTTAT
VERMELHA     CATCTCCGTATAAAATCGACTACAATTGAGGTGGCCCATGGCGAACACACCTGCATTTAT
VERDE        CATCTCCGTATAAAATCGACTACAATTGAGGTGGCCCATGGCGAACACACCTGCATTTAT
AZUL         CATCTCCGTATAAAATCGACTACAATTGAGGTGGCC-ATGGCGAACACACCTGCATTTAT
*****
          10      20      30      40      50      60
AMARELA      GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGGATCGTGAATCACC CC CATCCATT TTAACACAG
VERMELHA     GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGGATCGTGAATCACC CC CATCCATT TTAACACAG
VERDE        GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGGATCGTGAATCACC CC CATCCATT TTAACACAG
AZUL         GCAAGGAGGGGATATGGAGAGGTGGCAGCGGATCGTGAATCACC CC CATCCATT TTAACACAG
*****
          70      80      90      100     110     120
AMARELA      ACCCCAGCTATATAAGGGGGG-TCTCACCTGTCAGCAT CNCTCGATGAAGGAGGAAAC
VERMELHA     ACCCCAGCTATATAAGGGGGG-TCTCACCTGTCAGCAT CNCTCGATGAAGGAGGAAAC
VERDE        ACCCCAGCTATATAAGGGGGG-TCTCACCTGTCAGCAT CNCTCGATGAAGGAGGAAAC
AZUL         ACCCCAGCTATATAAGGGGGG-TCTCACCTGTCAGCAT CNCTCGATGAAGGAGGAAAC
*****
          130     140     150     160     170     180
AMARELA      RTTCAGAGACACCCGAGC AMCTCTCCCGGAGGARTGGCTCCAGGTACTTTGCTTTATC
VERMELHA     RTTCAGAGACACCCGAGC AMCTCTCCCGGAGGARTGGCTCCAGGTACTTTGCTTTATC
VERDE        RTTCAGAGACACCCGAGC AMCTCTCCCGGAGGARTGGCTCCAGGTACTTTGCTTTATC
AZUL         RTTCAGAGACACCCGAGC AMCTCTCCCGGAGGARTGGCTCCAGGTACTTTGCTTTATC
*****
          190     200     210     220     230     240
AMARELA      TCACTTGGATGTGCCAATTCGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGCTGATGGAGGGGTGG
VERMELHA     TCACTTGGATGTGCCAATTCGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGCTGATGGAGGGGTGG
VERDE        TCACTTGGATGTGCCAATTCGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGCTGATGGAGGGGTGG
AZUL         TCACTTGGATGTGCCAATTCGCTGCATGCTTTGGGTGAGGGGATGCTGATGGAGGGGTGG
*****
          250     260     270     280     290     300
AMARELA      TGCTGAGGTGGCTGCAAAACACAGTGTGAGCTCTGAAATCAAACAGATCAATGACAAAGG
VERMELHA     TGCTGAGGTGGCTGCAAAACACAGTGTGAGCTCTGAAATCAAACAGATCAATGACAAAGG
VERDE        TGCTGAGGTGGCTGCAAAACACAGTGTGAGCTCTGAAATCAAACAGATCAATGACAAAGG
AZUL         TGCTGAGGTGGCTGCAAAACACAGTGTGAGCTCTGAAATCAAACAGATCAATGACAAAGG
*****
          310     320     330     340     350     360
AMARELA      AAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACTCAGGTAACCTGAGCTTAA
VERMELHA     AAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACTCAGGTAACCTGAGCTTCA
VERDE        AAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACTCAGGTAACCTGAGCTTCA
AZUL         AAATCTCTCCCTACAGCGTGGCTATAAACCATGAGCTGACTCAGGTAACCTGAGCTTCA
*****
          370     380     390     400     410     420
AMARELA      CCTTGGT-AAGGGCCAGGAATGAGCTGCGGAAATCAAAGAACAAGCCAAAGCAGAGTTGT
VERMELHA     CCTTGGT-AAGGGCCAGGATGAGTTGCGGAAATCAAAGAACAAGCCAAAGCAGAGTTGT
VERDE        CCTTGGT-AAGGGCCAGGAACGAGCTGCGGAAATCAAAGAACAAGCCAAAGCAGAGTTGT
AZUL         CCTTGGT-AAGGGCCAGGAACGAGCTGCGGAAATCAAAGAACAAGCCAAAGCAGAGTTGT
*****
          430     440     450     460     470     480
AMARELA      AATAGTTATGCTCTCATATATGAAGCCAGGAACATTAAAATCAATTCGAGGCTTTAA
VERMELHA     AATAGTTATGCTCTCATATATGAAGCCAGGAACATTAAAATCAATTCGAGGCTTTAA
VERDE        AATAGTTATGCTCTCATATATGAAGCCAGGAACATTAAAATCAATTCGAGGCTTTAA
AZUL         AATAGTTATGCTCTCATATATGAAGCCAGGAACATTAAAATCAATTCGAGGCTTTAA
*****
          490     500     510     520     530     540
AMARELA      ACAGGGATCGGGGTGATGTCTGATCATAGACTCATAGAAATGGCC TGGCTTGAAAAGCAC
VERMELHA     ACAGGGATCGGGGTGATGTCTGATCATAGACTCATAGAAATGGCC TGGCTTGAAAAGCAC
VERDE        ACAGGGATCGGGGTGATGTCTGATCATAGACTCATAGAAATGGCC TGGCTTGAAAAGCAC
AZUL         ACAGGGATCGGGGTGATGTCTGATCATAGACTCATAGAAATGGCC TGGCTTGAAAAGCAC
*****
          550     560     570     580     590     600
AMARELA      TCAAAGACCATTACTTTC CAACCCTGCACTTG TCCCAAGTCCTG CAGGC TC CAGGGC
VERMELHA     TCAAAGACCATTACTTTC CAACCCTGCACTTG TCCCAAGTCCTG CAGGC TC CAGGGC
VERDE        TCAAAGACCATTACTTTC CAACCCTGCACTTG TCCCAAGTCCTG CAGGC TC CAGGGC
AZUL         TCAAAGACCATTACTTTC CAACCCTGCACTTG TCCCAAGTCCTG CAGGC TC CAGGGC
*****
          610     620     630     640     650     660
AMARELA      ACTCC TCACTGATGTTCACTCCA
VERMELHA     ACTCC TCACTGATGTTCACTCCA
VERDE        ACTCC TCACTGATGTTCACTCCA
AZUL         ACTCC TCACTGATGTTCACTCCA
*****
          670     680

```

Figura 2 - Alinhamento das sequências (ClustalW) do gene do hormônio das 4 linhagens de codornas. Em negrito a região correspondente ao éxon 1. Abaixo do alinhamento, os asteriscos indicam que as bases são iguais em todas as linhagens.

A análise de restrição destes polimorfismos, realizada em banco de dados, resultou em um grande número de enzimas que poderão ser utilizadas para estudos de associações (Tabela 1).

Tabela 1- Polimorfismos encontrados entre as linhagens de codornas (*Coturnix japonica*).

Posição	Região	Polimorfismo	Enzimas sugeridas
35 e 37	Promotor	G/A e deleção de C	<i>Bsh</i> NI, <i>Acy</i> I, <i>Eco</i> 130I, <i>Hae</i> II
143	Promotor	Inserção (G)	<i>Hph</i> I, <i>Alu</i> I, <i>Bsm</i> AI, <i>Taq</i> I
153	Promotor	Transição (T/C)	<i>Cac</i> 8I, <i>Bsp</i> MI
191	5'UTR	Transição (C/T)	<i>Alw</i> 26I, <i>Bsm</i> AI
245	Íntron 1	Transição (T/C)	<i>Alu</i> I, <i>Pvu</i> II, <i>Mwo</i> I
259	Íntron 1	Transição (G/A)	Sem sugestão
349	Íntron 1	Transversão (C/A)	<i>Sau</i> 3AI, <i>Nde</i> II, <i>Mbo</i> I, <i>Dpn</i> I
419	Íntron 1	Transversão (C/A)	<i>Hph</i> I, <i>Mse</i> I, <i>Tru</i> 9I, <i>Tru</i> 1I
428	Íntron 1	Inserção (C)	<i>Eco</i> NI, <i>Bsl</i> II, <i>Bsi</i> YI, <i>Bsc</i> 4I
439/441/445	Íntron 1	Transições e transversões	<i>Alu</i> I, <i>Bst</i> 71I, <i>Bbv</i> I, <i>Bsp</i> MI
479	Íntron 1	Transição (G/A)	Sem sugestão
483/489	Íntron 1	Transição (T/C)	<i>Mae</i> III, <i>Alw</i> NI
530	Íntron 1	Transição (C/T)	<i>Bse</i> DI, <i>Bsa</i> JI, <i>Bst</i> DEI, <i>Dde</i> I
590	Íntron 1	Transversão (T/A)	<i>Bfa</i> I, <i>Mae</i> I
610	Íntron 1	Transição (A/G)	Sem sugestão
680	Íntron 1	Transversão (C/A) e Transição (C/G)	<i>Hph</i> I, <i>Mn</i> II, <i>Cvi</i> J1, <i>Alu</i> i

Com relação à única região codificadora do fragmento analisado, a maior parte do éxon 1 constitui sequência 5'UTR, onde foi identificada uma transição de base T/C (posição 191) entre as linhagens de codorna, único polimorfismo observado neste éxon. A transição observada nesta região pode ser identificada pelas enzimas *Alw*26I e *Bsm*AI, que reconhecem o alelo C. Este polimorfismo pode ser útil para estudos de associações genéticas, visto que em bovinos um polimorfismo observado na região 5'UTR do GH foi correlacionado significativamente com rendimento de carcaça (Cheong et al., 2006). No final do éxon 1, são codificados apenas três aminoácidos: metionina, alanina e prolina (MAP), correspondendo aos 3 primeiros aminoácidos da sequência sinal do hormônio do crescimento. Holland et al. (2001) sugerem que polimorfismos dentro das regiões 5'UTR e éxons tem efeito sobre a adaptação de uma determinada espécie, talvez devido a estabilização e transporte do RNA mensageiro. Deste modo pequenas variações em regiões não codificadores podem ter efeito, mesmo

que pequeno, na adaptação do animal. Neste sentido, polimorfismos nestas regiões necessitam de mais estudos para levantamento de sua frequência entre codornas e possíveis relações com características produtivas para avaliar seu potencial de utilização.

Efeitos significativos de polimorfismos na região 5'UTR foram observados por Cheong et al. (2006) sobre o peso da carcaça fria e área de olho de lombo em bovinos. As regiões UTRs estão envolvidas com a regulação dos processos pós-transcricionais, controlando a localização, estabilidade, iniciação e eficiência da síntese proteica. Os eventos pós-transcricionais têm papel importante, entretanto, pouco conhecido (Conklin et al., 2002).

Holland et al. (2001), estudaram a diversidade genética em íntrons, éxons e regiões promotoras de genes em algumas espécies vegetais cultivadas e detectaram um grande nível de sequências polimórficas em regiões não codificadoras de genes. Os autores discutem que sequências promotoras e íntronicas não são necessariamente seletivamente neutras em todos os casos. Laurie & Stam (1994) observaram que polimorfismo dentro de um íntron do gene do álcool desidrogenase em *Drosophila melanogaster* tem um efeito na quantidade de proteína presente. Isto sugere que algumas variações dentro das regiões não codificadoras têm implicações no fenótipo do animal, constituindo em marcadores com potencial para a seleção de espécies, desde que verificada sua parcela na determinação do fenótipo.

Alguns polimorfismos que não modificam a sequência de aminoácidos da proteína e não interfiram em sítios de *splicing* podem ser úteis na seleção de animais portadores de características de interesse, como relatado em Pareek et al., (2008) ao estudar um polimorfismo no íntron 4 do gene da osteopontina. Ao analisar alguns casos de associação, pode-se supor simplesmente que estes polimorfismos podem estar marcando um haplótipo específico e por este motivo podem ser utilizados para esta finalidade.

Embora as variações sejam de apenas uma única base, esses polimorfismos podem representar grande efeito nas características produtivas. Laere et al. (2003) mostraram que um *locus* de característica quantitativa (QTL) para crescimento muscular em suínos estava associado a uma substituição de um único nucleotídeo no íntron 3 do gene *IGF2* (insulin-like factor 2). Três SNPs foram identificados em galinhas nos genes *IGF1* e *IGF2* associados com o crescimento e o consumo de ração (Amills et al., 2003). SNPs localizado no íntron 4 do GH da galinha também foi associado a taxa de gordura abdominal e peso do peito (Yan et al., 2003). Kansaku et al. (2003) estudando a mesma

região do GH avaliada neste trabalho, encontrou associação significativa de SNPs a produção de ovos em galinhas.

Conclusão

As quatro sequências nucleotídicas referentes a um fragmento do gene do hormônio do crescimento em codorna (*Coturnix japonica*), apresentou 85% de identidade com a mesma região gênica de frangos (*Gallus gallus*) e compreende a região promotora, exon 1 e parte do intron 1.

A comparação das quatro sequências geradas, referentes a 4 linhagens de codorna, sendo 3 de postura e uma de corte, possibilitou identificar polimorfismos entre as linhagens e dentro das linhagens. Foram encontrados quatro polimorfismos na região promotora, 1 polimorfismo no éxon 1 (5'URT) e 15 polimorfismos no íntron 1. Todos com potencial para exploração na busca por marcadores de características de interesse.

Referências

AMILLS, M.; JIMENEZ, N.; VILLALBA, D.; TOR, M.; MOLINA, E.; CUBILO, D.; MARCOS, C.; FRANCESCH, A.; SANCHEZ, A.; ESTANY, J. Identification of three single nucleotide polymorphisms in the chicken insulin-like growth factor 1 and 2 genes and their associations with growth and feeding traits. **Poultry Science**, v.82, p.1485-1493, 2003.

BYATT, J.C.; STATEN, N.R.; SALSGIVER, W.J.; KOSTELE, J.C.; COLLIER, R.J. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. **Animal Journal Physiologic**, v.264, p.986-992, 1993.

BYRNE, C.R.; WILSON, B.W.; WARD, K.A. The isolation and characterization of the ovine growth hormone gene. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.40, p.459-468, 1987.

CHEONG, H.S.; YOON, D.H.; KIM, L.H.; PARK, B.L.; CHOI, Y.H.; CHUNG, E.R.; CHO, Y.M.; PARK, E.W.; CHEONG, I.C.; OH, S.J.; YI, S.G.; PARK, T.; SHIN, H.D. Growth hormone-releasing hormone (GHRH) polymorphisms associated with carcass traits of meat in Korean cattle. **BMC Genetics**, v.7, p.7-35, 2006.

Clustal W: <http://clustalw.genome.ad.jp/>

CONKLIN, D.; JONASSEN, I.; AASLAND, R.; TAYLOR, W.R. Association of nucleotide patterns growth hormone gene in Chinese native chickens. **Journal of Heredity** v.93, p.277-279, 2002.

FANG, M.; NIE, Q.; LUO, C.; ZHANG, D.X.; ZHANG, X.Q. An 8 bp indel in exon 1 of ghrelin gene associated with chicken growth. **Domestic Animal Endocrinology** V.32, p.216-225, 2006.

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

FRITSCH, P.; RIESEBERG, L.H. The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in conservation genetics. In: **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. (eds. Smith, T.B.; Wayne, R.K.). Oxford Press University, New York, 1996.

HOLLAND, J.B.; HELLAND, S.J.; SHAROPOVA, N.; RHYNE, D.C. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. **Genome**, v.44, p.1065-1076, 2001.

IP, S.C.Y.; ZHANG, X.; LEUNG, F.C. Genomic growth hormone gene polymorphisms in native chinese chickens. **Experimental Biology and Medicine**, v.226, n.5, p.458-462, 2001.

KANSAKU N.; NAKADA A.; OKABAYASHI H.; GUEMENÉ D.; KUHNLEIN U.; ZADWORNÝ D.; SHIMADA K. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: association with egg production. **Animal Science Journal**, v.74, p.243-244, 2003.

KUHNLEIN, U.; NI, L.; WEIGEND, S.; GAVORA, J.S.; FAIRFULL, R.W.; ZADWORNÝ, D. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. **Animal Genetics**, v.28, p.116-123, 1997.

LAERE, A.V.; NGUYEN, M.; BRAUNSCHWEIG, M.; NEZER, C.; COLLETTE, C.; MOREAU, L.; ARCHIBALD, A.L.; HALEY, C.S.; BUYS, N.; TALLY, M.; ANDERSSON, G.; GEORGES, M.; ANDERSSON, L. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig, **Nature**, v.425, p.832–836, 2003.

LAURIE, C. C.; STAM, L. F. The effect of an intronic poly- morphism on alcohol dehydrogenase expression in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.138, p.379–385, 1994.

LEI, M.; LUO, C.; PENG, X.; FANG, M.; NIE, Q.; ZHANG, D.; YANG, D.; ZHANG, X. Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chicken. **Poultry Science**, v.86, p.835-842, 2007.

MAO, J.N.C.; COGBURN, L.A.; BURNSIDE, J. Growth hormone down-regulates growth hormone receptor mRNA in chicken but developmental increases in growth hormone receptor mRNA occur independently of growth hormone action. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.16, p.135-143, 1997.

MILLIGAN, B.G.; LEEBENS-MACK, J.; STRAND, A.E. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. **Molecular Ecology**, v.3, p.423-435, 1994.

MURRAY, M. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, n.19, p.4321-4326, 1980.

PAREEK, C.S.; CZARNIK, U.; PIERZCHAŁA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (SPP1) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v.26, n.4, p.251-257, 2008.

QIU, F.F.; NIE, Q.H.; LUO, C.L.; ZHANG, D.X.; LIN, S.M.; XANG, X.Q. Association of single nucleotide polymorphisms of the insulin gene with chicken early growth and fat deposition. **Poultry Science**, v.85, p.980-985, 2006.

RAFALSKI, A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.94–100, 2002.

TANAKA, M.; HOSOKAMA, Y.; WATAHIKI, M.; NAKASHIMA, K. Structure of the chicken growth hormone – recoding gene and its promoter region. **Gene**, v.112, p.235-239, 1992.

SANGER, F.; NICKLEN S.; COULSO; A.R.. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.74, p. 5463-5467, 1977.

SUN, B.; NIE, Q.; LEI, M.; ZHANG, X. Single nucleotide polymorphisms of chicken whole growth hormone gene and their relation to growth traits. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 14 de novembro de 2008.

VASILATOS-YOUNKEN, R.; DUNNINGTON, E.A.; SIEGEL, P.B.; MCMURTRY, J.P. Tissue-specific alterations in insulin-like growth factor-1 concentrations in response to 3,3_,5-triiod-L-thyronine supplementation in the growth hormone receptor-deficient sex-linked dwarf chicken. **General and Comparative Endocrinology**, v.105, p.31–39, 1997.

WOYCHIK, R.P.; CAMPER, S.A.; LYONS, R.H.; HOROWITZ, S.; GOODWIN, E.C.; ROTTOMAN, F.M. Cloning and nucleotide sequencing of the bovine growth hormone gene. **Nucleic Acids Research**, v.10, p.7192-7210, 1982.

WYSZYNSKA-KOKO, J.; PIERZCHALA, M.; FLISIKOWSKI, K.; KAMYCZEK, M.; ROZYCKI, M.; KURY J. Polymorphisms in coding and regulatory region of the porcine MYF6 and MYOG gene and expression of the MYF6 gene in m. longissimus dorsi versus productive traits in pigs. **J. Applied Genetics**, v.47, p.131-138, 2006.

YAN, B.; DENG, X.; FEI, J.; HU, X.; WU, C.; LI, N. Single Nucleotide polymorfism analysis in chicken growth hormone gene and its association with growth and carcass traits. **Chinese Science Bulletin**, V.48, n.15, p.1561-1564, 2003.

IV. ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO E CARÇAÇA EM CODORNAS

Resumo: O hormônio do crescimento (GH) possui papel fundamental no desenvolvimento das aves, afeta a produção de ovos e participa no desenvolvimento ósseo e muscular esquelético, estimulando o crescimento muscular, sendo um gene candidato muito estudado. Em várias espécies, polimorfismos têm sido identificados no gene do GH e associados à características de interesse. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo detectar polimorfismos no gene do GH em codornas, utilizando a técnica de PCR-RFLP e associar os polimorfismos a características de desempenho e carcaça. Para isso, 200 codornas (*Coturnix japonica*), pertencentes a dois grupos genéticos (linhagem de corte e cruzamento entre postura x corte) foram analisadas. Com a utilização da enzima *PvuII*, foram obtidos três genótipos (C/C, C/T, e T/T) para o polimorfismo T→C. A linhagem de corte apresentou os três genótipos, sendo que a maior frequência foi observada para o heterozigoto (C/T), 48,52%, enquanto o cruzamento apresentou apenas dois genótipos (C/C, C/T). A análise de variância revelou associação significativa entre os genótipos marcadores (GH-*PvuII*) e o RP para machos do cruzamento, com maior média para o genótipo C/C (41,05 g ± 2,35%). Neste estudo observou-se também, efeito do genótipo marcador (GH-*PvuII*) sobre as características H e UH, sendo o genótipo C/C o que apresentou maior média para as características (5,64 ± 0,71 mm e 94,66 ± 3,26, respectivamente).

Termos para indexação: *Coturnix japonica*, GH, SNPs, PCR-RFLP, polimorfismo.

Association among the growth hormone gene polymorphism and carcass traits performance in quails

Abstract: The growth hormone (GH) plays a fundamental role on the development of birds. The GH affects egg production and participates on the development of bone and skeletal muscle, stimulating muscle growth, thus making GH a very well studied candidate gene. On many species, polymorphisms have been identified in the GH gene and have been associated to characteristics of interest. Therefore, the present work had the objective of detecting GH gene polymorphisms in quails, using the PCR-RFLP technique and to associate these polymorphisms to performance and carcass traits. For this, 200 quails (*Coturnix japonica*), belonging to two genetic groups (broiler lineage and crossing between layer x broiler lineages) were analyzed. Using the *PvuII* enzyme, three genotypes were found (C/C, C/T and T/T) for the T→C polymorphism. The broiler lineage presented the three distinct genotypes and the highest frequency was observed for the heterozygote (C/T), 48.52%, while the crossing lineage presented only two genotypes (C/C, C/T). The variance analysis revealed significant association between marking genotypes (GH-*PvuII*) and the RP on the males of the crossing lineage, with the highest average for the genotype C/C (41.05 g ± 2.35%). On this study were also observed the effects of the marking genotype (GH-*PvuII*) on the characteristics H and UH, being the genotype C/C the one that presented the highest average for the characteristics (5.64 ± 0,71 mm e 94.66 ± 3,26, respectively).

Index Terms: *Coturnix japonica*, GH, SNPs, PCR-RFLP, polymorphism.

Introdução

O hormônio do crescimento (GH) é uma molécula proteica, composta por 191 aminoácidos e secretados pela hipófise anterior, possui papel fundamental no crescimento e desenvolvimento de aves e de muitos outros animais, pois influencia diretamente vários parâmetros fisiológicos, tais como crescimento e reprodução (Ip *et al.*, 2001).

O GH também afeta a produção de ovos e está envolvido com a resistência a doenças (Kuhnlein *et al.*, 1997), participa no desenvolvimento ósseo, além de modular a partição de nutrientes entre os tecidos adiposo e muscular esquelético, estimulando o crescimento muscular e reduzindo a deposição de gordura na carcaça, sendo um gene candidato muito estudado.

A estrutura genômica do gene do GH tem sido estudada em diferentes animais, e tem se mostrado bastante similar entre as espécies. Em frangos, o gene GH foi primeiramente isolado e sequenciado por Lamb *et al.* (1988), e a partir de então, vários outros autores estudaram amplamente este gene. Tanaka *et al.* (1992) clonaram e sequenciaram o gene GH em galinhas (*Gallus gallus*) (gGH), e concluíram que o mesmo possuía tamanho aproximado a 4.100 pares de bases (pb) e era composto por cinco éxons e quatro íntrons. Entretanto, o tamanho do gene gGH era significativamente maior que o gene análogo em mamíferos, por causa do tamanho dos íntrons, ser bem maior nas aves.

Em um grande número de espécies, polimorfismos têm sido identificados neste gene e associados à características de interesse econômico. Em suínos os polimorfismos foram associados à performance e características de carcaça (Franco *et al.*, 2005), em bovinos foi associado à produção de leite (Lucy *et al.*, 1993) e com características reprodutivas (Lechniak, 2003), em peixes foi associado com peso de filé e rendimento de carcaça (Blanck, 2008, dados não publicados).

A maioria dos polimorfismos encontrados no GH de frangos está localizada em regiões de íntrons, podendo ser identificados por várias metodologias, tais como: RFLPs, SSCP e sequenciamento. Estudos com frango de corte utilizando RFLP, mostraram que o gene GH é altamente polimórfico nas regiões de íntrons, e seus alelos já identificados possivelmente estão associados à gordura abdominal (Fotouhi *et al.*, 1993), produção de ovos (Ip *et al.*, 2001) e ganho de peso (Nie *et al.*, 2002).

Tanaka *et al.* (1995), encontraram um fragmento adicional de 197 pb, localizado no íntron 1. Mou (1995) também sequenciou o gene gGH e encontrou o mesmo fragmento adicional, na posição 308 no íntron 1. Outros autores também encontraram polimorfismos neste gene, Fotouhi *et al.* (1993) identificaram quatro sítios RFLPs, um para *SacI* e três para *MspI*, estes últimos localizados no íntrons 1, 2 e 4. Nie *et al.* (2002) detectaram uma deleção de 50 pb no íntron 4 em frangos nativos chineses e três anos depois (Nie *et al.*, 2005), identificaram 46 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), sendo que 36 estavam localizados em íntrons.

A detecção de polimorfismos usando SSCP e sequenciamento é relativamente difícil e possuem parâmetros limitantes tais como o tamanho da região estudada, quantidade de sequências analisadas, custo da técnica empregada, restringindo sua utilização comercial em larga escala. Sob este aspecto, o presente trabalho teve como objetivo detectar polimorfismos no gene do GH em codornas utilizando a técnica de PCR-RFLP e associar os polimorfismos a características de desempenho e carcaça.

Materiais e Métodos

Foram utilizadas 200 codornas (*Coturnix japonica*), pertencentes a dois grupos genéticos, sendo 100 codornas da linhagem de corte e 100 codornas obtidas pelo cruzamento entre a linhagem de corte (EU515189) e linhagem de postura (EU515188), pertencentes ao programa de desenvolvimento de linhagens de codornas da Universidade Estadual de Maringá – PR, alojadas na Fazenda Experimental Iguatemi – UEM.

Os animais com um dia de idade foram alojados em galpão convencional, disposto no sentido leste-oeste, com cobertura de telha francesa, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,50m de altura, completadas com tela de arame até o telhado. O galpão é dividido em boxes de 2,5 m².

A ração utilizada foi formulada, de acordo com o NRC (1994), com 28 % de proteína bruta com nível energético de 2.900 Kcal de Energia Metabolizável (EM) por Kg de ração. Os comedouros utilizados foram do tipo bandeja até aos 10 dias, sendo substituído por comedouros pendulares, e os bebedouros utilizados foram tipo infantil até aos 10 dias, sendo substituídos por bebedouros pendulares. O fornecimento de água e ração para as codornas foi *ad libitum* por todo o período experimental. O manejo geral foi realizado de acordo com Albino (2003).

Aos 28 dias de idade, as aves foram separadas por sexo. As fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais e os machos foram abatidos. Estas fêmeas tiveram suas produções totais e parciais monitoradas durante 120 dias, foram coletados os ovos de cada fêmea aos 90 dias, dos quais foram anotados o peso do ovo, espessura de casca e altura de albúmen. A qualidade interna do ovo foi medida, pela unidade “Haugh”, por meio da fórmula:

$$UH = 100 \log \left[H - \frac{\sqrt{G(30W^{0,37} - 100)}}{100} + 1,9 \right]$$

em que: H = altura de albúmen (milímetros); G = constante gravitacional de valor 32; W = peso do ovo (gramas) (Brant *et al.*; 1951).

O abate dos machos foi realizado por meio de deslocamento cervical. Estes foram pesados no início e no final do período experimental (38 dias), avaliando-se ganho de peso, rendimento das carcaças inteiras e rendimento dos cortes nobres (coxa +

sobrecoxa e peito). Os dados foram utilizados para a obtenção de estimativas de correlações entre genótipo e fenótipo.

Para a caracterização das variantes genéticas foram utilizadas 200 amostras de sangue, correspondentes às codornas já mencionadas. As amostras de sangue, com aproximadamente 500 μ L, foram coletados da circulação periférica (veia braquial), estocado em papel de alta absorção e armazenado a temperatura ambiente.

Isolamento do DNA:

O DNA genômico foi obtido das células sanguíneas retidas no papel absorvente pela adição de 500 μ L de tampão contendo cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) em tubos de 1,5 mL. As amostras foram mantidas por uma hora em banho-maria a 65°C, com agitações ocasionais. Em seguida, o material extraído foi deixado à temperatura ambiente por alguns minutos para resfriamento, quando foram adicionados 500 μ L de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) acompanhado por agitação. Após a centrifugação por 15 minutos a 1.3000 g, o sobrenadante foi transferido para tubos a precipitação do DNA foi realizada com a adição de 250 μ L de isopropanol, seguido por resfriamento a 4°C durante 30 minutos. Logo após o DNA precipitado foi centrifugado a 1.3000 g por 30 minutos, o pellet foi então lavado por duas vezes em etanol 75% e, após evaporação, o DNA foi dissolvido em tampão TE (Tris-HCL 10mM, pH 7,4 e EDTA 1mM, pH 8) e quantificado a 260 nm e 280 nm. Este protocolo foi desenvolvido a partir do protocolo proposto por Murray e Thompson (1980).

Para amplificação do gene do hormônio do crescimento, foi utilizado o par de *primers* desenhado por Kuhnlein *et al.* (1997) 5'-ATCCCCAGGCAAACATCCTC-3' e 5'-CCTCGACATCCAGCTCACAT-3'. O sistema de amplificação foi composto de 0,85 μ M de primers, 0,3 mM de dNTPs, 1 unidade de *Taq* DNA polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, água ultrapura e DNA genômico, em um volume final de 15 μ L. O programa de amplificação utilizado foi de desnaturação inicial a 94°C por dois minutos; 35 ciclos, de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 63°C e 45 segundo a 72°C; e um passo final de extensão a 72°C por sete minutos.

Após a amplificação, o DNA foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% e corado com nitrato de prata. Este procedimento permitiu verificar se cada fragmento de DNA foi suficiente e especificamente amplificado. Os fragmentos de DNA que foram adequadamente amplificados foram clivados com enzimas de restrição *PvuII* (Invitrogen), para detecção dos polimorfismos. Após a clivagem, nova

análise foi realizada em eletroforese em gel de poliacrilamida. Esta análise permitiu identificar animais portadores ou não de polimorfismos genéticos para o gene analisado.

Análise estatística:

Foram avaliadas as seguintes características:

Fêmeas: peso vivo (PV), peso aos 7 dias (P7), peso aos 14 dias (P14), peso aos 21 dias (P21), peso aos 28 dias (P28), número de ovos (NO), peso do ovo (PO), altura de albúmen (H), Unidade Haugh (UH) e espessura da casca (EC).

Machos: peso vivo (PV), peso aos 7 dias (P7), peso aos 14 dias (P14), peso aos 21 dias (P21), peso aos 28 dias (P28), peso aos 38 dias (P38), peso da carcaça (PC), rendimento de carcaça (RC), peso do peito (PP), rendimento de peito (RP), peso de coxa + sobrecoxa (PCS) e rendimento de coxa + sobrecoxa (RCS).

Os dados foram analisados através do procedimento GLM do SAS. As variáveis avaliadas foram analisadas de acordo com o modelo:

$$y = \mu + L + G + S + (L \times G) + (G \times S) + e$$

em que: y = valor observado para as características de desempenho e carcaça; μ = média geral ou constante; L = efeito fixo do grupo genético; G = efeito fixo associado a cada genótipo; S = efeito fixo do sexo; LxG = interação entre grupo genético e genótipo; GxS = interação entre genótipo e sexo; e = erro aleatório.

As interações quando não significativas foram retiradas das análises. As médias das variáveis foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Resultados

Fragments de 776 pb foram obtidos através da amplificação de parte do gene do hormônio de crescimento (GH) em dois grupos genéticos de codorna, um composto por uma linhagem de corte e outro composto pelo cruzamento entre uma linhagem de corte e de postura. Após a amplificação, os fragmentos foram submetidos à clivagem com a enzima de restrição *PvuII*, que reconhece a sequência 5'...CAG[▼]CTG...3' como seu sítio de corte, localizado do íntron 1 do gene GH de codorna. Esta enzima foi selecionada com base no sequenciamento do gene do GH realizado por esta equipe em quatro linhagens de codornas, que revelou um polimorfismo (T/C) entre e dentro da linhagem vermelha (nº de acesso no GenBank: *EU515188*).

Com a utilização da *PvuII*, os produtos da PCR foram digeridos em dois fragmentos de aproximadamente 500 pb e 270 pb. Foram obtidos três genótipos, C/C (homozigotos para corte), C/T (heterozigoto para corte) e T/T (homozigoto para não corte). A linhagem de corte apresentou os três genótipos, 42 animais C/C, 47 animais C/T e 4 T/T, enquanto o cruzamento apresentou apenas dois genótipos, 48 animais C/C e 47 animais C/T.

O polimorfismo da *PvuII* foi correlacionado com características de desempenho e carcaça de machos e fêmeas. Ao considerar o PV em função da idade e dos genótipos para a linhagem de corte e para o cruzamento (Figura 2 a e b), observou-se que o genótipo T/T, foi o que apresentou maior peso em todas as idades para o corte. No entanto, genótipo T/T foi excluído das análises estatísticas em virtude do baixo número de observações.

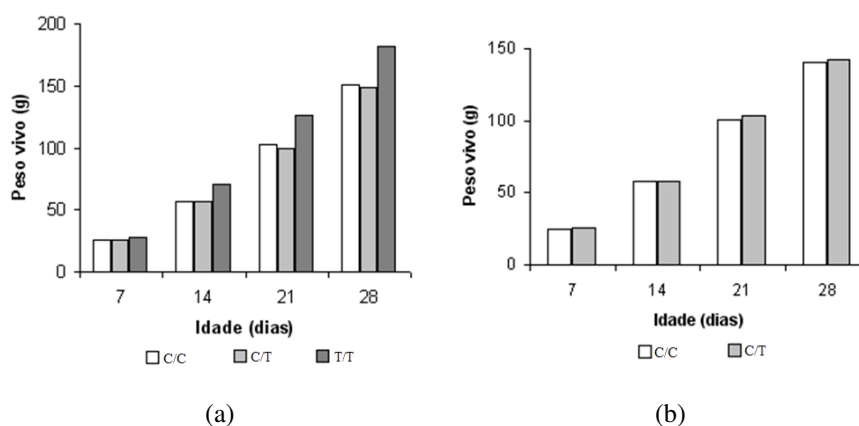


Figura2- a) Peso vivo (g) de codornas da linhagem de corte considerando as diferentes idades de pesagens e os genótipos GH-*PvuII*. b) Peso vivo (g) do cruzamento entre as linhagens de codornas de corte e postura considerando as diferentes idades de pesagens e os genótipos GH-*PvuII*.

Para P7, P14, P21 e P28 não foram observadas diferenças significativas para os dois genótipos analisados (C/C,C/T). Considerando os grupos genéticos, foi encontrada diferença significativa apenas para P28, no qual a linhagem de corte apresentou maior média de peso, $149,90 \pm 44,22$ g. Com relação ao sexo foi verificada diferença significativa para todos os dados de pesagens (Tabela 1).

Tabela.1- Médias e desvio-padrões dos genótipos GH-*PvuII*, linhagem de corte e cruzamento postura x corte de ambos os sexos de codornas.

Idades	Genótipos GH- <i>PvuII</i>		Grupos genéticos		Sexo	
	C/C (95) ^a	C/T- (97)	Linhagem de corte (94)	Cruzamento postura x corte (98)	Macho (92)	Fêmea (100)
P7	25,09 ± 5,07	25,50 ± 6,05	25,29 ± 6,07	25,31 ± 5,09	23,97 ± 5,60 ^b	26,74 ± 5,23 ^a
P14	57,18 ± 15,37	57,02 ± 17,79	56,55 ± 22,30	57,62 ± 8,06	48,23 ± 14,82 ^b	66,74 ± 12,59 ^a
P21	101,62 ± 25,75	101,48 ± 26,67	100,90 ± 35,24	102,18 ± 12,46	87,95 ± 24,35 ^b	116,34 ± 19,14 ^a
P28	145,51 ± 32,63	145,80 ± 33,94	149,90 ± 44,22 ^a	141,58 ± 16,20 ^b	130,20 ± 30,58 ^b	162,46 ± 27,38 ^a

() = número de animais analisados; Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Na Tabela 2, são apresentados os dados referentes a características de postura, onde é possível observar que houve interação significativa entre os grupos genéticos, para a característica NO, portanto, a interação foi desdobrada e está apresentada na Tabela 3.

Tabela 2 – Médias e desvio-padrão para número de ovos, peso do ovo, altura de albúmen e espessura da casca de ovos de codornas de dois grupos genéticos e dois genótipos para GH-*PvuII*.

	Grupo genético			
	Linhagem de Corte		Cruzamento postura x corte	
	Genótipos			
	C/C <i>PvuII</i>	C/T <i>PvuII</i>	C/C <i>PvuII</i>	C/T <i>PvuII</i>
Número de ovos	114,90 ± 26,62 ^a	95,57 ± 30,57 ^b	107,38 ± 17,67 ^a	109,75 ± 20,61 ^a
Peso dos ovos (g)	13,21 ± 1,21	13,03 ± 1,10	12,04 ± 0,66	11,83 ± 1,13
Altura de albúmen (mm)	5,85 ± 0,69	5,59 ± 0,67	5,43 ± 0,66	5,21 ± 0,67
UH*	95,35 ± 3,23	94,15 ± 3,16	94,00 ± 3,16	93,00 ± 3,59
Espessura de casca (mm)	0,22 ± 0,017	0,21 ± 0,016	0,22 ± 0,014	0,21 ± 0,010

* Unidade Haugh

Letras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Com o desdobramento da interação foi possível observar que houve diferenças significativas para PO, H e UH entre os grupos genéticos, estando a linhagem de corte com as maiores médias, $13,12 \pm 1,15$ g, $5,72 \pm 0,698$ mm e $82,07 \pm 4,45$, respectivamente. Levando em consideração o genótipo dos indivíduos, foi observada diferença significativa para as características, NO, H e UH, destacando o genótipo C/C como mais produtivo.

Tabela 3 – Médias e desvio-padrão para número de ovos, peso do ovo (g), altura de albúmen (mm), Unidade Haugh e espessura da casca de ovos (mm) de codornas de dois grupos genéticos e dois genótipos para GH-*PvuII*.

		Características				
		Número de ovos	Peso dos ovos (g)	Altura de albúmen (mm)	UH*	Espessura de casca (mm)
Grupo Genético	Corte (92)**	104,89 ± 26,62	13,12 ± 1,15 ^a	5,72 ± 0,69 ^a	82,07 ± 4,45 ^a	0,22 ± 0,018
	Cruzamento (96)	108,56 ± 19,56	11,94 ± 0,93 ^b	5,32 ± 0,67 ^b	79,76 ± 4,71 ^b	0,22 ± 0,013
Genótipo	C/C (94)	110,72 ± 18,02 ^a	12,62 ± 1,13	5,64 ± 0,71 ^a	94,66 ± 3,26 ^a	0,22 ± 0,017
	C/T (94)	102,81 ± 26,79 ^b	12,42 ± 1,27	5,39 ± 0,69 ^b	93,57 ± 3,41 ^b	0,21 ± 0,013
CV(%)		20,84	8,38	12,22	5,40	7,04

* Unidade Haugh; **() Número de observações

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Para os machos, as características de produção e rendimento de carcaça são apresentados na Tabela 4, sendo observada diferença significativa para PP, entre os genótipos da linhagem de corte, destacando o genótipo C/T por apresentar menor média, 39,5 ± 2,03 g.

Tabela 4 – Médias, desvio-padrão e coeficiente de variação para peso aos 38 dias (g), peso da carcaça (g), rendimento de carcaça (%), peso do peito (g), rendimento de peito (%), peso de coxa + sobrecoxa (g) e rendimento de coxa + sobrecoxa (%) nos dois grupos genéticos e dois genótipos para GH-*PvuII* em macho de codorna.

Características	Grupo genético				CV%
	Linhagem de corte		Cruzamento postura x corte		
	C/C	C/T	C/C	C/T	
Peso aos 38 dias(g)	172,36 ± 43,57	170,28 ± 41,57	156,65 ± 33,55	149,95 ± 34,89	23,77
Peso da carcaça (g)	114,63 ± 31,89	112,28 ± 30,11	106,73 ± 22,80	100,75 ± 26,33	25,73
Rendimento da carcaça (%)	66,80 ± 13,24	65,80 ± 4,72	68,15 ± 2,18	67,06 ± 5,75	11,28
Peso do peito (g)	47,58 ± 15,06	44,78 ± 13,50	41,85 ± 9,60	40,42 ± 11,64	28,83
Rendimento de peito (%)	41,05 ± 2,35 ^a	39,50 ± 2,03 ^b	39,12 ± 2,26 ^a	39,93 ± 2,39 ^a	3,66
Peso da coxa + sobrecoxa (g)	26,16 ± 7,16	26,02 ± 6,48	25,65 ± 5,59	24,96 ± 6,46	25,03
Rendimento de coxa + sobrecoxa	22,89 ± 1,08	23,31 ± 1,21	24,14 ± 2,21	24,83 ± 1,11	6,29

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os genótipos identificados como CC, C/T e T/T apresentaram frequências iguais a 44,55%, 48,52 e 6,93%, respectivamente, para a linhagem de corte. Para o cruzamento entre as linhagens de corte e postura, não foi observada a presença do genótipo T/T e as frequências para os genótipos C/C e C/T foram 51,02% e 48,98%.

Discussão

Os estudos de associações de polimorfismos observados em genes candidatos e características produtivas proporcionam maior entendimento do efeito dos genes sobre a expressão fenotípica. O *GH* tem sido muito utilizado como gene alvo em trabalhos de associação de variantes alélicas com características quantitativas em aves (Ip *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2007) e em outros animais (Lagziel *et al.*, 1999; Lechniak *et al.*, 1999). Este interesse se justifica em razão deste gene fazer parte dos genes do eixo somatotrófico e estar envolvido em uma grande variedade de parâmetros fisiológicos de interesse econômico.

O polimorfismo detectado no gene do GH de codorna através do sequenciamento, foi confirmado com o uso da enzima *PvuII*, que reconhece a mutação T→C, localizado no íntron 1, gerando três genótipos distintos. Na linhagem de corte verificou-se a presença dos três, sendo que a maior frequência foi observada para o heterozigoto (C/T) (48,52%). No cruzamento o genótipo T/T não foi encontrado. Dado a ausência do genótipo T/T no cruzamento entre as linhagens de corte e postura e os valores observados na linhagem de corte, pode-se inferir que a frequência do alelo C é baixa na linhagem de postura. Sua presença apenas na linhagem de corte, pode estar associada à seleção, uma vez que as médias de pesos nas diferentes idades foram maiores para o genótipo T/T, embora estatisticamente esse fato não pode ser confirmado.

A análise de variância revelou associação significativa entre os genótipos marcadores com as características NO, H, UH entre as fêmeas e RP para machos do cruzamento. A maior média entre os dois genótipos considerados nas análises para RP foi observado para o genótipo C/C (41,05 ± 2,35%). Talvez a retirada o genótipo T/T das análises, em virtude da pouca representatividade possa ter interferido no resultado, sendo, desta forma, necessária a genotipagem de um maior número de animais ou o uso de outras metodologias de análises de dados para confirmação dos resultados.

Uma mutação de C→T no íntron 4 do GH de galinha também foi associada significativamente com a taxa de crescimento de peito em frangos (Yan *et al.*, 2003). Polimorfismos em íntrons no gene do GH em aves Leghorn, verificados com uso da técnica de RFLP e as enzimas *MspI* e *SacI*, apresentaram efeito significativo sobre a produção de ovos e resistência a doenças (Kuhnlein *et al.*, 1997) e conteúdo de gordura abdominal (Fotouhi *et al.*, 1993). Mutações em outros genes do eixo somatotrófico ou próximos a eles, como o IGF-I, também foram associadas a diferenças no peso,

espessura da casca do ovo (Nagajara *et al.*, 2000), peso corporal e gordura abdominal em galinhas (Feng *et al.*, 1997).

Embora pouco ainda se saiba a respeito das interações que podem ocorrer entre os SNPs, a busca pela sua localização e a identificação de enzimas que reconhecem essas variações são etapas iniciais e de importância fundamental para o avanço das pesquisas.

Atualmente muitos SNPs têm sido identificados e seus alelos associados a características de desempenho e carcaça em aves. Lei *et al.* (2008) estudando associação de haplótipos em aves envolvendo seis SNPs no IGF-1, verificaram para uma das combinações de SNPs, efeito significativo para peso da carcaça eviscerada, peso vivo aos 28, 35 e 56 dias de idade. Os genes GH, seu receptor e o IGF-1 possuem características conservadas entre as espécies, entretanto, muita diversidade de nucleotídeos tem sido observada nas suas sequências, e em aves parece existir uma grande incidência de SNPs e outros polimorfismos.

Neste estudo observou-se efeito do genótipo marcador (GH-*PvuII*) sobre as características altura de albúmen (H) e unidade Haugh (UH), sendo o genótipo C/C o que apresentou maior média para as duas características ($5,64 \pm 0,71$ mm e $94,66 \pm 3,26$, respectivamente). Na literatura não foram encontrados relatos de associação de SNPs no gene do GH de codorna envolvendo essas características. Ressalta-se que dentre as características analisadas neste estudo, as maiores médias verificadas com relação ao peso do ovo ocorreram nos genótipos C/C ($12,62 \pm 1,13$ g), embora estas diferenças não tenham sido significativas, estando esta característica significativamente relacionada ao grupo genético, sendo mais pesados os ovos da linhagem de corte, o que pode estar relacionado ao maior peso corporal. Trabalhos de associação entre SNPs no GH e características de interesse econômico em aves e em outros animais auxiliam na varredura de polimorfismos dentro de genes candidatos tentando encontrar variações favoráveis que poderiam ser utilizadas em programas de seleção. Existem vários resultados, semelhantes ou divergentes quando se trata de estudos de associações de SNPs e características quantitativas no GH e em outros genes. Na maioria das vezes cada autor elege uma região do gene que deseja estudar e avalia seus polimorfismos, separadamente ou em composições de haplótipos, desta maneira muitas informações se acumulam, e os SNPs mais promissores poderão ser investigados em diferentes populações, sob diferentes condições ambientais.

Conclusão

Foi verificada associação do polimorfismo GH-*PvuII* com algumas características de desempenho e carcaça nas linhagens estudadas, como número de ovos, altura de albúmen e unidade de Haugh, sendo maiores no genótipo C/C. Entretanto, as duas últimas características também são significativamente influenciadas pelo grupo genético e o peso do ovo foi significativamente mais pesado na linhagem de corte, provavelmente por estar correlacionado ao maior tamanho das aves. Essa associação é indicativa de que alterações na sequência de nucleotídeos, mesmo que em regiões de íntrons, podem alterar a expressão do gene GH em codornas ou estar marcando algum haplótipo específico, com as melhores combinações gênicas para uma determinada característica. Estudos adicionais são necessários para verificar o real efeito superior do genótipo T/T, observado nesse experimento apenas na linhagem de corte.

Referências

Brant AW, OTTE AW and Norris KH (1951) Recommend standards for scoring and measuring opened egg quality. *Food Technology* 5:356-361.

Feng XP, Kuhnlein U, Aggrey SE, Gavora JS and Zadworny D (1997) Trait association of genetic markers in the growth hormone and the growth hormone receptor gene in a White Leghorn strain. *Poultry Sci* 76:1770-1775.

Fotouhi N, Karatzas CN, Kuhnlein U and Zadworny D (1993) Identification of growth hormone DNA polymorphisms which respond to divergent selection for abdominal fat content in chickens. *Theor Appl Genetic* 85:931-936.

Franco MM, Antunes RC and Silva HD, Goulart LR (2005) Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. *J Appl Genet* 46(2):195-200.

GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Ip SCY, Zhang X and Leung, FC (2001) Genomic growth hormone gene polymorphisms in native chinese chickens. *Experimental Biology and Medicine* 226(5):458-462.

Kuhnlein U, Ni L, Weigend S, Gavora JS, Fairfull RW and Zadworny D (1997) DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. *Animal Genetics* 28:116-123.

Lagziel A, Lipkin E, Ezra E, Soller M and Weller JI (1999) An MspI polymorphism at the Bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. *Anim Genet* 30(4):296-299.

Lamb LC, Galehouse DM and Foster DN (1988) Chicken growth hormone cDNA sequence. *Nucleic Acids Research* 16:9339.

Lechniak D, Machnik G, Szydlowski M and Switonski M (1999) Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. *Theriogenology* 52:1145-1152.

Lechniak D, Strabel T, Bousquet D and King WA (2003) Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 38(3):224-227.

Lei M, Peng X, Zhou M, Fang M, Nie Q, Zhang D, Yang D and Zhang X Luo C (2007) Polymorphism of growth-correlated genes associated with fatness and muscle fiber traits in chicken. *Poultry Science* 86:835-842.

Lei M; Peng X; Zhou M; Luo C; Nie Q; Zhang X (2008) Polymorphism of IGF I R gene and their genetic effects on chicken early growth and carcass traits. *BMC Genetics* 9:70-79.

Lucy MC, Hauser SD, Eppard PJ, Krivi GG, Clark JH, Bauman DE and Collier RJ (1993) Variants of somatotropin in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domestic Animal Endocrinology* 10:325-333.

Luiz Fernando Teixeira Albino e Sérgio Luiz de Toledo Barreto (2003) Criação de Codornas Para Produção de Ovos e Carne. 1ª edição. Aprenda Fácil Editora, Viçosa, 290 p.

Mou L, Liu N, Zadworny D, Chalifour L and Kuhnlein U (1995) Presence of an additional *Pst*I fragment in intron 1 of the chicken growth hormone-encoding gene. *Gene* 160(2):313-314.

Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8(19):4321-4326.

Nagaraja SC, Aggrey SE, Yao J, Zadworny D, Fairfull RW and Kuhnlein U (2000). Trait association of a genetic marker near the IGF-I gene in egg-laying chickens. *J Hered* 91:150-156.

Nie Q, Ip SCY, Zhang X, Leung FC and Yang G. (2002) New variations in intron 4 of growth hormone gene in Chinese native chickens. *Journal of Heredity* 93:277-279.

Nie Q, Sun B, Zhang D, Luo C, Ishag NA, Lei M, Yang G and Zhang X (2005) High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. *Journal of Heredity* 96(6):698-703.

NRC – National Research Council (1994) Nutrient requirements of poultry. 9th ed. National Academy Press, Washington, 176 p.

Tanaka M, Hosokama Y, Watahiki M and Nakashima K (1992) Structure of the chicken growth hormone – recoding gene and its promoter region. *Gene* 112:235-239.

Tanaka M and Nakashima K (1995) The structure of intron 1 in the chicken growth hormone encoding gene. *Gene* 160(2):313-314.

Yan B, Deng X, Fei J, Hu X, Wu C and Li N (2003) Single Nucleotide polymorphism analysis in chicken growth hormone gene and its association with growth and carcass traits. *Chinese Science Bulletin* 48(15):1561-1564.

V. APÊNDICE

Apêndice I: Normas da revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos e não podem ter sido encaminhados a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

A Comissão Editorial faz análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como: escopo; apresentação do artigo segundo as normas da revista; formulação do objetivo de forma clara; clareza da redação; fundamentação teórica; atualização da revisão da literatura; coerência e precisão da metodologia; resultados com contribuição significativa; discussão dos fatos observados frente aos descritos na literatura; qualidade das tabelas e figuras; originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério só é aplicado aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas, Novas Cultivares e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

O texto deve ser digitado no editor de texto Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, margens de 2,5 cm, com páginas e linhas numeradas.

APRESENTAÇÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível. A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

Artigos em português – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.

Artigos em inglês – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.

Artigos em espanhol – Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Material y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.

O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título

* Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.

* Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

* Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como "efeito" ou "influência".

* Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.

* Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.

* As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

* Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção "e", "y" ou "and", no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.

* O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à respectiva chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

* São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.

* Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.

* Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

* O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.

* Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.

* Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos empregados na pesquisa, os resultados e a conclusão.

* O objetivo deve estar separado da descrição de material e métodos.

* Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.

* O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

* A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.

* Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.

* Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.

* Não devem conter palavras que componham o título.

* Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.

Introdução

* A palavra Introdução deve ser centralizada na página e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.

* Deve ocupar, no máximo, duas páginas.

* Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

* O último parágrafo deve expressar o objetivo, de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

* A expressão Material e Métodos deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.

* Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.

* Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.

* Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.

* Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.

* Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.

* Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.

* Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.

* Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

* Pode conter tabelas e figuras.

Resultados e Discussão

* A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada na página e grafada em negrito; Os termos Resultados e Discussão devem ser grafados com letras minúsculas, exceto a letra inicial.

* Deve ocupar quatro páginas, no máximo.

* Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.

* As tabelas e figuras são citadas sequencialmente.

* Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos frente aos apresentados por outros autores.

- * Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- * Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- * As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- * Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.
- * As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- * O termo Conclusões deve ser centralizado na página e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo, e elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- * Não podem consistir no resumo dos resultados.
- * Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- * Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- * A palavra Agradecimentos deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser breves e diretos, iniciando-se com "Ao, Aos, À ou Às" (pessoas ou instituições).
- * Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- * A palavra Referências deve ser centralizada na página e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- * Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- * Devem ser normalizadas de acordo com as normas vigentes da ABNT.
- * Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.

- * Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- * Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- * Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- * Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- * Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

Teses e dissertações

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em:

'<http://www.cpa0.embrapa.br/publicacoes/ficha.php?tipo=DOC&num=66&ano=2004>.
Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

* Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados.

* A autocitação deve ser evitada.

Redação das citações dentro de parênteses

* Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.

* Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.

* Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.

* Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.

* Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.

* Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão "citado por" e da citação da obra consultada.

* Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

* Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

* Fórmulas, expressões, símbolos ou equações matemáticas, escritas no editor de equações do programa Word, devem ser enviadas também em arquivos separados, no programa Corel Draw, gravadas com extensão CDR.

* No texto, devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.

* Não devem apresentar letras em itálico ou negrito.

Tabelas

* As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após referências.

* Devem ser auto-explicativas.

* Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.

* Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.

* O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

* No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.

* Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.

* Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.

* Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.

* Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.

* Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares.

* Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.

* As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

* Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.

* Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.

* Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ^{ns} (não-significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

* São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.

* Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

* O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.

* Devem ser auto-explicativas.

* A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.

* Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.

* Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.

* O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração.

* As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

* Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

* Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.

* As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

* Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.

* Devem ser gravadas no programa Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição em possíveis correções.

* Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.

* No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).

* Não usar negrito nas figuras.

* As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.

* Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

NOTAS CIENTÍFICAS

* Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

APRESENTAÇÃO DE NOTAS CIENTÍFICAS

* A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão), Referências, tabelas e figuras.

As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

* Resumo com 100 palavras, no máximo.

* Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.

* deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).

NOVAS CULTIVARES

* Novas Cultivares são breves comunicações de cultivares que, depois de testadas e avaliadas pelo Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária (SNPA), foram superiores às já utilizadas e serão incluídas na recomendação oficial.

APRESENTAÇÃO DE NOVAS CULTIVARES

Deve conter: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, título em inglês, Abstract, Introdução, Características da Cultivar, Referências, tabelas e figuras. As normas de apresentação de Novas Cultivares são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:

- * Resumo com 100 palavras, no máximo.
- * Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras.
- * deve apresentar, no máximo, 15 referências e quatro ilustrações (tabelas e figuras).
- * A introdução deve apresentar breve histórico do melhoramento da cultura, indicando as instituições envolvidas e as técnicas de cultivo desenvolvidas para superar determinado problema.
- * A expressão Características da Cultivar deve ser digitada em negrito, no centro da página.
- * Características da Cultivar deve conter os seguintes dados: características da planta, reação a doenças, produtividade de vagens e sementes, rendimento de grãos, classificação comercial, qualidade nutricional e qualidade industrial, sempre comparado com as cultivares testemunhas.

OUTRAS INFORMAÇÕES

- Não há cobrança de taxa de publicação.
- Os manuscritos aprovados para publicação são revisados por no mínimo dois especialistas.
- O editor e a assessoria científica reservam-se o direito de solicitar modificações nos artigos e de decidir sobre a sua publicação.
- São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos.
- Os trabalhos aceitos não podem ser reproduzidos, mesmo parcialmente, sem o consentimento expresso do editor da PAB.
- **Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231 e 3273-9616, fax: (61)3340-5483, via e-mail: pab@sct.embrapa.br ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica, Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB, Caixa Postal 040315, CEP 70770-901 Brasília, DF.**

Apêndice II: Normas da revista *Genetics and Molecular Biology*.

Genetics and Molecular Biology (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Although **Genetics and Molecular Biology** is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board, are reviewed by the Associate Editor and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante , Editor-in-Chief *Genetics and Molecular Biology* By
Postal Address: Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 736 14025-670 Ribeirão Preto, SP – Brazil

Or by Electronic Address: editor@gmb.org.br

2.A submission package sent to the Editorial Office must contain

a) The manuscript that must be submitted by the Corresponding Author, this being the person who will also check the page proofs, and arranges for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) An accompanying cover letter stating that the data have not being published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. It must also inform the e-mail addresses of all other authors so that they can be contacted by the Editorial Office for confirmation of the submission. Possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must be disclosed.

c) An electronic copy of the text, tables and figures, including supplementary material to be published online only. Formats for text are Word or RTF in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures, see detailed instructions in 3.1.h). Mailed CD-ROMs must be labeled with the first author's last name, platform and software.

d) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; formatted to A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person who submits the manuscript, checks the page proofs, and arranges for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section

The text includes the following elements:

Introduction –Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion –The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section:references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by ISI Web of Knowledge or PubMed.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X₁X₁X₂X₂:X₁X₂Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) Genetics and Origin of Species. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. Plos Biol 2:194-205.<http://www.plosbiology.org> .

f) Internet Resources Section

this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation :

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM

Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2005)

g) Tables: must be inserted at the end of the main text file, each table starting on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a new page that immediately follows the tables. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale resolution yielding 300 dpi, color figures should be at 600 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustration can be accepted, but authors may be asked to defray the cost.

i) Nomenclature should adhere to current international standards.

j) Sequences may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

m) Supplementary Material: Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the published version, can be submitted as Supplementary Material. This material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. For online access, supplementary material should be in PDF, JPEG or GIFF formats.

In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement: *Supplementary material - the following online material is available for this article:*

- *Table S1 – < short title >*

- *Figure S1 – < short title >*

This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>

3.2 Short Communications

Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles

Review Articles are welcome.

3.5 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories

Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs and Copyright Transfer

Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval. A form of consent to publish and transfer of copyright will have to be signed by the corresponding author, also on behalf of any co-authors.

5. Reprints

Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.