

Maurício Borges

MON
577-21-
B732m
TES/MEM

**Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características
quantitativas de bovinos de corte**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia, como
parte das exigências do Curso
de Mestrado em Genética
e Bioquímica, para obtenção
do título de "Mestre"

Orientador
Luiz Ricardo Goulart Filho

DIRBI/UFU



1000162704

Uberlândia
Minas Gerais-Brasil
1997



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas de bovinos de corte

2 - ALUNO: Maurício Borges

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Luiz Ricardo Goulart Filho

4 - DATA: 29/ 08/ 97

5 - BANCA EXAMINADORA:

<i>Titular</i>	<u>Luiz Ricardo Goulart Filho</u>
<i>Titular</i>	<u>Antônio Batista Sancevero</u>
<i>Titular</i>	<u>Izabel Scheid</u>
<i>Suplente</i>	<u>Ana Maria Bonetti</u>
<i>Suplente</i>	<u>Warwick Estevam Kerr</u>

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 15:00 Término - 16:00

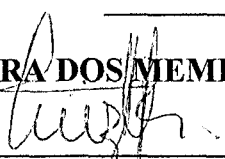
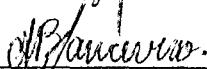
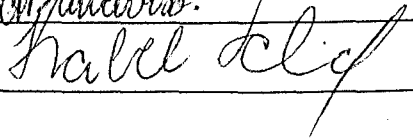
7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 16:00 Término - 17:30

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca	<u>A</u>
2º Membro da Banca	<u>A</u>
3º Membro da Banca	<u>A</u>
Conceito Final:	<u>A</u>

9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. Marcadores Genéticos	3
2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	9
2.3. Construção de Mapas Genéticos	13
2.4. Mapeamento de Características Quantitativas	16
3. MATERIAL E MÉTODO	23
3.1. População e obtenção de dados quantitativos	23
3.2. Coleta de sangue	29
3.3. Extração de DNA	29
3.4. Genotipagem dos animais	30
3.5. Eletroforese e detecção dos produtos amplificados	36
3.6. Análise estatística	38
3.6.1. Frequências alélicas	38
3.6.2. Associação dos marcadores com características quantitativas	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. Extração de DNA	43
4.2. Otimização das reações de amplificação e genotipagem dos animais	45
4.2.1. Otimização da PCR para amplificação da kappa- caseína (CSN3)	45
4.2.2. Otimização da PCR para amplificação da beta-	53

lactoglobulina (LGB)	
4.2.3. Otimização da PCR para hormônio do crescimento (GH)	56
4.3. Genotipagem dos animais	58
4.4. Freqüências alélicas e genotípicas	61
4.5. Associação dos marcadores com características quantitativas	66
4.5.1. Associação dos marcadores com desempenho de bezerros	68
4.5.2. Associação dos marcadores com características quantitativas em vacas de corte	87
4.6. Considerações sobre desenhos experimentais para estudos de ligação entre marcadores moleculares e características quantitativas	101
5. CONCLUSÕES	109
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	Sumário de experimentos que encontraram algum grau de associação entre marcadores moleculares e características de importância econômica em bovinos	21
TABELA 2	Distribuição da quantidade de bezerros confinados em relação ao total desmamado	28
TABELA 3	Quantidade de animais amostrados e distribuição por touro	29
TABELA 4	Otimização da PCR para CSN3 pelo <i>Método Taguchi</i> modificado	34
TABELA 5	Otimização da PCR para CSN3	35
TABELA 6	Otimização da PCR para LGB	36
TABELA 7	Otimização da PCR para o GH	36
TABELA 8	Grau de separação de DNA em gel de acrilamida	37
TABELA 9	Grau de separação de DNA em gel de agarose	38
TABELA 10	Produção e qualidade do DNA obtido de sangue fresco	44
TABELA 11	Produção e qualidade do DNA obtido de sangue congelado	45
TABELA 12	Genótipos observados, esperados e teste de equilíbrio da CSN3, LGB e GH em bezerros de corte	62
TABELA 13	Frequências genotípicas e gênicas observadas e heterozigose esperada (Hs) da CSN3, LGB e GH em bezerros de corte	63
TABELA 14	Genótipos observados, esperados e teste de equilíbrio da CSN3, LGB e GH em vacas de corte	65
TABELA 15	Frequências genotípicas e gênicas observadas e heterozigose esperada (Hs) da CSN3, LGB e GH em vacas de corte	65
TABELA 16	Médias e desvios padrões (entre parênteses) de cinco	67

características quantitativas de bovinos de corte, do rebanho estudado

TABELA 17	Análise de variância do peso ao nascimento (PN), valor genético para ganho de peso do nascimento ao desmame (BV GND) e valor genético para ganho de peso pós-desmame (BV GPD) em bezerros de corte, utilizando o modelo I	69
TABELA 18	Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND) e ganho de peso pós-desmame (GPD) em bezerros de corte, utilizando o modelo I	70
TABELA 19	Análise de variância do peso final (PFIM), idade inicial (IDINI), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg (D450) e ganho de peso médio diário (GPMD) em confinamento, usando o modelo I	72
TABELA 20	Médias ajustadas do peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em bezerros de corte, resultante do modelo I	75
TABELA 21	Médias ajustadas do peso inicial (PINI), peso final (PFIM), idade inicial (IDINI), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg (D450 kg), ganho de peso médio diário (GPMD) em confinamento, resultante do modelo I	77
TABELA 22	Efeito de substituição alélica sobre peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em bezerros de corte, como resultado do modelo II	78
TABELA 23	Análise de variância do peso ao nascimento (PN), valor genético para ganho de peso do nascimento ao desmame (BV GND) e valor genético para ganho de peso pós-	81

	desmame (BV GPD) em bezerros, por meio do modelo III	
TABELA 24	Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND) e ganho de peso pós-desmame (GPD) em bezerros, com o modelo III	83
TABELA 25	Análise de variância do peso inicial (PINI), peso final (PINI), idade inicial (IDINI), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg e ganho de peso médio diário (GPMD) em confinamento, utilizando o modelo III	85
TABELA 26	Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em vacas de corte, resultante do modelo I	89
TABELA 27	Médias ajustadas do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em vacas de corte, por meio do modelo I	91
TABELA 28	Efeito de substituição alélica sobre o ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD)	93
TABELA 29	Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em vacas de corte, por meio do modelo III	94
TABELA 30	Sumário de trabalhos com associação estatística ($P < 0,05$) entre CSN3, LGB ou GH e características de importância econômica em gado de corte e leite	97

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	(a) Mapa citogenético e de ligação do cromossomo 6 de <i>Bos Taurus</i> mostrando a localização da CSN3 (seta) na região 6q26-33 do BTA6 (KAPPES et al., 1997). (b) Seqüência da região amplificada por PCR com os locais de mutação (quadros) e sítios de restrição das endonucleases <i>Taq</i> I (t'cga) e <i>Hinf</i> I (g'antc). Primers (sublinhados) e endonucleases (negrito) de acordo com MASOUDI et al. (1994) e seqüência segundo "GenBank Database" acesso X14908	31
FIGURA 2	(a) Mapa citogenético e de ligação do cromossomo 11 de <i>Bos Taurus</i> mostrando a localização da LGB (seta) na região 11q28 do BTA11. (b) Seqüência da região amplificada por PCR (Genbank acesso Z48305) com os sítios de restrição da <i>Hae</i> III (gg'cc) e mutação que diferencia os dois alelos. A região correspondente aos primers é mostrada em negrito e sublinhada (FRIES 1993)	32
FIGURA 3	(a) Mapa citogenético e de ligação do cromossomo 19 de <i>Bos Taurus</i> mostrando a localização do GH na região 19q17-qter do BTA19 (Kappes et al., 1997). (b) Seqüência da região amplificada por PCR com a localização dos primers (negrito e sublinhado), sítios de restrição da <i>Msp</i> I (negrito c'cgg) e sítio que diferencia os alelos C e D na posição 1547 (Genbank Database acesso M57764). Primers e endonuclease segundo Zhang et al. (1993)	33
FIGURA 4	Otimização da PCR para CSN3, usando o método Tagushi modificado	47
FIGURA 5	Influência das concentrações de $MgCl_2$ (1, 2 e 3 mM), e primers (2, 4 e 6 pmoles) sobre a amplificação da CSN3	48
FIGURA 6	Influência das concentrações de <i>Taq</i> DNA polimerase (0,25,	49

0,5 e 0,75 U), $MgCl_2$ (1, 2 e 3 mM) e primers (2, 4 e 6 pmoles) sobre a amplificação da CSN3

FIGURA 7	Efeito da concentração de primers (2, 4 e 6 pmoles) sobre a especificidade e produtividade da reação de amplificação da CSN3	52
FIGURA 8	Exemplo da PCR não otimizada	53
FIGURA 9	Reação de otimização da LGB, sob duas quantidades de primers (3 e 6 pmoles) e três concentrações de $MgCl_2$ (1, 2 e 3 mM)	56
FIGURA 10	Otimização da reação de amplificação do GH	58
FIGURA 11	Genotipagem da CSN3 de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por <i>Taq</i> I	59
FIGURA 12	Genotipagem da LGB de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por <i>Hae</i> III	60
FIGURA 13	Comparação de produtividade das reações de amplificação de LGB (colunas 1-12) e CNS3 (colunas 13-21)	60
FIGURA 14	Genotipagem do GH de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por <i>Msp</i> I	61
FIGURA 15	Frequência genotípica esperada na F1 para acasalamento entre touros, sabidamente heterozigotos e vacas, escolhidas aleatoriamente na população	102
FIGURA 16	Esquema de desenho experimental de meio-irmãos para detecção de ligação entre um locus marcado e características quantitativas	103

AGRADECIMENTOS

À Rezende Alimentos pelo suporte financeiro do projeto.

Ao Luiz, Sancevero e Isabel, pelo exemplo e sugestões generosamente concedidas.

Ao professor Heyder pela fundamental colaboração nas análises estatísticas.

À GenSys Consultores Associados S/C Ltda, pelo auxílio para melhor entendimento dos resultados da avaliação genética.

Aos departamentos de Agropecuária, Desenvolvimento de Tecnologia e Informação, Marketing e Nutrição Animal da Rezende Alimentos, pela contribuição fundamental para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Miguel e Onofra, à Graciele, Walter e Valéria pelo amor, paciência e compreensão das dificuldades e ausência durante a realização deste curso.

Ao Robson, Bárbara, Kátia e demais colegas do Laboratório de Genética Molecular da UFU, pela amizade e auxílio nos momentos em que necessitava.

À comunidade científica, por disponibilizar generosamente todo o conhecimento que tornou possível a realização desta dissertação.

“Se elevamos o pensamento na busca do conteúdo mais profundo da palavra **gratidão**, encontramos que nossa própria vida é uma dívida contraída com quem criou a existência humana. Mas como essa dívida jamais é recordada pelos homens, acontece que estes a esquecem, e por isso tantos se sentem muito mais credores que devedores de Deus.”

Carlos B. Gonzáles Pecotche (Raumsol)

MARCADORES MOLECULARES E SEUS EFEITOS SOBRE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS DE BOVINOS DE CORTE

Autor: Maurício Borges

Orientador: Luiz Ricardo Goulart

RESUMO

As mais recentes tecnologias da biologia molecular tornaram possível acessar a variabilidade genética ao nível molecular, viabilizando o estudo de ligação entre polimorfismos ao nível do DNA com características de importância econômica em bovinos de corte e leite. Três marcadores moleculares, κ -caseína (CSN3), β -lactoglobulina (LGB) e hormônio do crescimento (GH) foram utilizados a fim de estudar os efeitos desses marcadores sobre crescimento e engorda de gado de corte. Um total de 633 animais, sendo 325 vacas, filhas de 14 touros e 308 bezerros filhos de 8 touros, foram genotipados para cada marcador por meio de PCR-RFLP, sendo os genótipos registrados para posterior estudo de ligação com as características quantitativas. Após otimização das reações de amplificação para cada marcador, obteve-se os seguintes parâmetros: CSN3 - 50 ng de DNA, 1 mM de $MgCl_2$, 5 pmoles de dNTPs, 3 pmoles de cada "primer" e 0,75 U de Taq DNA polimerase, sob 94°C de desnaturação inicial por 5', seguidos de 35 ciclos a 94°C - 20", 60°C - 30" e 72°C - 40", mais 5' de extensão final; LGB - 50 ng de DNA, 1 mM de $MgCl_2$, 8 nmoles de dNTPs, 3 pmoles de cada "primer", 0,75 U de Taq DNA polimerase, sob 94°C - 5', 5 ciclos 95°C - 20", 60°C - 10" e 75°C - 40", 10 ciclos 95°C - 20", 60°C - 10" subtraindo 0,5°C/ciclo e 75°C - 40" mais 20 ciclos 95°C 10", 55°C - 10", adicionando 1"/ciclo, 75°C - 40", acrescentando 1"/ciclo e extensão final 75° - 5'; GH - 50 ng de DNA, 1 mM de $MgCl_2$, 8 nmoles de dNTPs, 8 pmoles de cada "primer" e 0,75 U de Taq DNA polimerase, sob 35 ciclos à 94°C, 62°C e 72°C - 1' cada. As frequências gênicas médias observadas nos bezerros foram 0,85 e 0,15 para os alelos A e B da CSN3, respectivamente; 0,30 e 0,70 para os alelos A e B da LGB, respectivamente; 0,37 e 0,63 para os alelos C e D do GH, respectivamente. Nas vacas as frequências encontradas foram 0,84 e 0,16, respectivamente, para os alelos A e B da CSN3; 0,29 e 0,71 para os alelos A e B

da LGB, respectivamente 0,32 e 0,68, para os alelos C e D do GH. Nos bezerros Nelore houve desvio de equilíbrio de Hardy-Weinberg, sendo este atribuído à deriva genética. A associação dos genótipos de cada marcador com as características quantitativas foi testada por três modelos estatísticos, sendo que o primeiro (modelo I - análise de variância univariada) e segundo (modelo II - substituição alélica - regressão linear) desconsideraram o efeito de touros, enquanto que no terceiro utilizou-se comparação entre genótipos agrupados dentro de famílias (modelo III). Nos modelos I e II os efeitos de touro e genótipo ficaram confundidos, mostrando associações entre genótipos e características quantitativas significativas. Entretanto a análise dos dados por família (modelo III) resultou na ausência de associação, mostrando que nas famílias analisadas o polimorfismo existente nos três marcadores não estão ligados às características quantitativas estudadas.

1. INTRODUÇÃO

A demanda crescente de produtos de origem animal, a maior exigência do mercado consumidor e a grande concorrência associada ao elevado custo de produção, têm obrigado os produtores de carne bovina intensificar a produção para permanecerem competitivos no mercado. Na era da informática e crescente utilização de modelos estatísticos pela genética quantitativa, predizendo o valor genético dos indivíduos, emerge uma nova tecnologia à partir do desenvolvimento da genética molecular, trazendo novos conceitos que nesse momento devem ser assimilados por produtores e técnicos. A primeira, que já está bem estabelecida trouxe conceitos, tais como, diferença esperada na progênie e valor genético de reprodutores, importantes na seleção baseada em dados mais concretos. A segunda, definida como o estudo individual dos genes, suas estruturas e funções, com grandes perspectivas, vem complementar a primeira.

As diferenças genéticas entre os indivíduos que são fornecidas como resposta da utilização da genética quantitativa, são nada mais que a diferença nas frequências alélicas para os diferentes genes que constitui o genótipo do indivíduo. Partindo desse ponto de vista, as diferenças são geradas pela constituição genética de cada indivíduo dentro da população, seja por meio de efeito genético aditivo ou combinação de alelos, através de suas relações de dominância e epistasia.

A genética molecular é o estudo dos genes individualmente, sua estrutura e função, envolvendo conhecimentos de bioquímica e fisiologia. O estudo da ação gênica ao nível molecular tem demonstrado que o genoma bovino é compreendido de um número finito de genes e que relativamente poucos loci influenciam muitas características quantitativas. Pelo menos teoricamente é possível que poucos genes possam ser responsáveis pelas diferenças genéticas observadas entre os animais para algumas características quantitativas. Tais loci são referenciados como loci de característica quantitativa (QTL). Variação em genes específicos pode ser responsável por uma grande fração da variância

genética total (combinação da variancia genética aditiva e não aditiva). Tais genes são denominados genes principais ("major genes"). A existência de genes principais influenciando características quantitativas têm sido documentadas em bovinos e suínos, principalmente pela hipertrofia muscular.

Dentre os passos dados para a localização de genes principais, o primeiro foi dado pelo Projeto do Mapeamento do Genoma Bovino, que objetiva fornecer a localização de marcadores moleculares para estudos de associação entre eles e características de importância econômica. O segundo é uma consequência do primeiro, através do estabelecimento de projetos para estudos de associação gênica, partindo das informações geradas pelo mapeamento genético bovino. Existem dois procedimentos que normalmente são adotados: o primeiro é a utilização de marcadores altamente polimórficos, conhecidos como *microsatélites*, dispostos ao longo de cada cromossomo bovino, para então associar, por métodos biométricos, tais marcadores com características quantitativas. A segunda alternativa é a utilização de marcadores com efeitos fisiológicos sabidamente importante (genes candidatos) e que possuem algum polimorfismo ao nível do DNA (previamente mostrado pelo mapa genético bovino), tentando então, associar esse polimorfismo à variação de características quantitativas.

A utilização de polimorfismos ao nível do DNA fornecido pelo mapa genético bovino envolve o conhecimento de técnicas de biologia molecular, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR). Esta envolve inúmeros procedimentos que até o momento não são completamente explicados ou entendidos, especialmente ao nível da cinética enzimática, desnaturação e renaturação do DNA.

Os objetivos do presente trabalho foram padronizar a PCR de marcadores moleculares dos genes da kappa-caseína (CNS3), beta-lactoglobulina (LGB) e hormônio do crescimento (GH), caracterizar e associar os polimorfismos dos mesmos com características quantitativas em um rebanho de bovino de corte.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Marcadores genéticos

Marcador genético pode ser definido como um segmento cromossômico que pode ser acompanhado através das gerações, devendo portanto ser informativo, e que está ligado ou associado à alguma característica importante, sendo utilizado para identificar alelos daquele loci. O conceito de informação se refere à necessidade do reprodutor ser heterozigoto, assim o segmento marcado do cromossomo pode ser acompanhado na segregação.

O que indica que o marcador é ou não informativo é o polimorfismo, ou seja diversas formas, que no caso de um marcador é o número de alelos existentes na população. Um marcador altamente polimórfico possui vários alelos e isto dita a sua importância em estudos de ligação genética, pois maior será a informação do mesmo (maior a probabilidade de encontrar indivíduos heterozigotos para o locus marcador). O primeiro passo é a descoberta de marcadores polimórficos, em seguida é a associação estatística de tais marcadores com características importantes (cor de pêlo, presença/ausência de chifres, alterações genéticas, produção de leite e carne, resistência à doenças, e outras de ordem qualitativa ou quantitativa) e posteriormente localização dos genes, sendo tal procedimento denominado genética reversa (BISHOP *et al.*, 1995).

Já há algum tempo, pesquisadores têm se interessado pelo uso de marcadores genéticos polimórficos, principalmente para identificação de paternidade e como auxílio à seleção, quando ligados às características de importância econômica. Até recentemente, focalizava-se o uso de grupos sangüíneos e proteínas séricas, que eram úteis para identificação de paternidade mas desapontava como critério de seleção, devido à baixa informação, custo e tempo demandado (KENNEDY *et al.*, 1990).

O desenvolvimento de marcadores genéticos a nível de DNA surgiu a partir da descoberta, no início dos anos 70, de um grupo de enzimas (endonucleases) que eram capazes de cortar a molécula de DNA em um grande número de sítios específicos para cada indivíduo. Cada sítio de corte é definido por uma sequência específica de nucleotídeos de 4 a 8 pares de bases (pb) e cada enzima tem sítios particulares de restrição (SOLLER, 1990).

Polimorfismo por fragmentos de restrição (RFLP) são produzidos a partir de cortes do DNA genômico por endonucleases, que reconhecem sequências específicas de DNA e o corta naquele sítio. Existem usualmente centenas ou milhares de sítios de reconhecimento ao longo do genoma para cada endonuclease. O corte do DNA com endonuclease produz muitos fragmentos de variados tamanhos, os quais podem ser separados por meio da eletroforese em gel de agarose. Uma sonda marcada com P^{32} produzida à partir de um clone específico de DNA ou RNA (fragmento de um gene ou região do genoma conhecida) pode ser então hibridizada com o DNA cortado por enzima de restrição marcando os locais polimórficos (SOUTHERN, 1975). Existe considerável polimorfismo no comprimento de fragmentos marcados como resultado de mutações, incluindo troca de bases, inserções e deleções nos sítios de reconhecimento, causando perda ou criação de sítios, que são então diferenciados através da exposição dos fragmentos hibridizados com a sonda a um filme de raio X. Se um indivíduo tiver um sítio de restrição na região complementar à sonda, essa marcará 2 fragmentos, enquanto que se outro indivíduo não tiver aquele sítio de restrição, a sonda marcará apenas um fragmento. BOTSTEIN *et al.* (1980) foram pioneiros quando propuseram esse método para identificação de polimorfismos ao nível de DNA, sugerindo seu uso em estudos de ligação genética e construção do mapa genético humano. Eles reportaram que igual polimorfismo é extremamente freqüente no genoma e poderia permitir a produção de completo e saturado mapa genômico humano. RFLP não necessitam representar o gene de interesse, mas estar próximo a um gene, o suficiente para mostrar ligação.

Uma vez que RFLP são identificados, podem ser examinados por inúmeras propriedades estatísticas para análise de "pedigree". Para estabelecer um mapa de marcadores, análise de genealogia poderá usar tanto características qualitativas, quanto quantitativas. O modelo é ajustado para maximizar a probabilidade dos parâmetros dados na estrutura de "pedigree" e observações. Geneticistas comparam probabilidade de diferentes modelos calculando razões de verossimilhança. Quando a razão é 1000:1, significa que a disparidade de um modelo é 1000 vezes maior que de outro, então o primeiro é aceito, comparado ao último. O \log_{10} da razão de verossimilhança (LOD "score") é usualmente reportado, onde "score" 1 a 2 é "interessante", 2 a 3 é "sugestivo" e > 3 é a "prova" do fenômeno em questão. Considera-se que 150 marcadores polimórficos seriam necessários para saturar o genoma humano de 33 Morgans de comprimento, considerando RFLP espaçados à cada 20 cM (centiMorgans).

Já que diferentes sondas de DNA podem ser testadas, mapas genéticos podem ser construídos à partir de um número diverso de marcadores ligados ou muito próximos. Embora aplicações de marcadores de RFLP tenham se iniciado no mapeamento genético de camundongos, ratos e humanos, alguns avanços foram alcançados em animais domésticos como consequência da homologia, sintenia e conservação existente entre as espécies, decorrendo então que as sondas podem ser utilizadas entre espécies para localização de regiões que guardam alguma homologia (KENNEDY *et al.*, 1990).

O uso de RFLP como marcadores, os quais tem a vantagem de serem numerosos, dialélicos, codominantes, e herdados de forma Mendeliana, podendo ser utilizados para estudo de efeitos pleiotrópicos e de ligação, tem sido considerado extensivamente em populações segregantes (BECKMANN & SOLLER, 1983) trazendo esperanças para a aplicação prática de marcadores genéticos polimórficos ao melhoramento animal (BECKMANN & SOLLER, 1987).

A associação de marcadores RFLP com QTL foram feitas por SIMPSON (1989), e ROCHA *et al.* (1992). Segundo SIMPSON (1989), o coeficiente de consangüinidade interfere no número de indivíduos que são necessários para encontrar associação de RFLP com QTL, pois menor será a

informação do marcador (menor a probabilidade de se encontrar indivíduos heterozigotos) e ainda, quando a herdabilidade da característica a ser medida for alta poucos indivíduos por família serão requeridos.

ROCHA *et al.* (1992) pesquisaram a associação estatística de 5 loci marcados por RFLP com 41 caracteres quantitativos de cinco raças bovinas de corte dialélicas. Todos os RFLP detectados eram dialélicos, resultantes de mutações ou mudanças estruturais. Para mapeamento dentro de populações segregantes, marcadores dialélicos tem muitas limitações devido a dificuldade em traçar os alelos de geração a geração. Se um reprodutor é homozigoto, é impossível determinar qual dos dois alelos foi transmitido para sua progênie; ademais, se o pai e a mãe de um indivíduo forem ambos heterozigotos, não será possível determinar qual alelo é transmitido para a progênie, à partir dos parentais. Problemas similares ocorrem quando utiliza-se RFLP dialélico para mapeamento do genoma humano (SOLLER, 1990). A alternativa é utilizar marcadores polialélicos (vários alelos no locus), onde mesmo se os parentais forem heterozigotos, mas para alelos diferentes, pode ser traçada a segregação dos 4 alelos na progênie.

Estas limitações podem ser eliminadas pela utilização de marcadores polialélicos (KASHI *et al.*, 1990). Nestes casos muitos reprodutores serão heterozigotos no locus marcado e alelos podem ser traçados do reprodutor até a progênie, exceto onde os parentais são heterozigotos para os mesmos alelos.

Poucos sistemas de marcadores detectam loci que respondem a cortes por enzimas de restrição que tenham muitos tamanhos diferentes. Este polimorfismo é devido a variação no número de repetições em tandem de uma seqüência curta de DNA. Através da utilização de sondas contendo essas repetições e hibridização da mesma com fragmentos de DNA previamente cortado com enzima de restrição gera um padrão de bandas altamente polimórfico, formando impressões digitais do DNA. Como muitos indivíduos são heterozigotos no mesmo locus, estes marcadores podem fornecer informação de ligação em quase todas famílias. Então a um nível populacional estes loci são

caracterizados por número variável de repetições em tandem (VNTR), também conhecidos como minissatélites (NAKAMURA *et al.*, 1987).

Embora minissatélites detectem múltiplas regiões VNTR e são excelentes ferramentas para identificação de parentesco (JEFFREYS *et al.*, 1985 e GEORGES *et al.*, 1988), elas não são ideais para estudos de ligação. Isto é devido à dificuldade de combinar informações de ligação de diferentes famílias, porque geralmente não é possível atribuir bandas hibridizadas a loci específicos através de famílias (JEFFREYS *et al.*, 1985). Isto é, com uma determinada sonda minissatélite, em diferentes famílias, o mesmo locus terá bandas de diferentes comprimentos, mas diferentes loci darão bandas do mesmo comprimento.

Um número de sondas minissatélites tem sido encontradas determinando padrões de impressões digitais do DNA no bovino. Estas incluem as sondas minissatélites *Jeffreys*, a M13 (VASSART *et al.*, 1987) e outras (GEORGES *et al.*, 1988). Como cada banda (ou duas) de uma impressão do DNA corresponde a um locus VNTR, os resultados obtidos com várias sondas minissatélites sugerem a presença de um grande número de loci VNTR no genoma bovino. É possível, portanto, que as mesmas estratégias que têm sido efetivas no isolamento de locus VNTR específicos no homem possam também ser efetivas em bovinos.

O polimorfismo por amplificação de DNA à partir de "primers" arbitrários, (INNIS *et al.*, 1990; CARNWATH, 1994), também chamada de amplificação ao acaso de DNA polimórfico (RAPD), utiliza um único "primer" específico ou dois "primers" diferentes para produzir uma impressão digital do DNA genômico via PCR. Nesta reação, os "primers" se associam à regiões homólogas do DNA genômico em dois sítios diferentes nas fitas opostas do DNA. Nestes dois sítios, dentro de uma distância amplificável não superior a 2-3 kb, o produto de DNA é produzido por meio de uma amplificação enzimática termocíclica. A grande vantagem dessa técnica é não precisar de informação sobre a seqüência de DNA a ser amplificada, entretando, produz resultados poucos informativos para estudos de ligação genética devido ao seu modo dominante de herança e baixa repetibilidade da técnica.

Os requerimentos para a PCR são os desoxiribonucleotídeos, polimerase de DNA, “*primers*”, o DNA molde e uma solução tampão contendo magnésio. Polimorfismos podem ocorrer entre regiões amplificadas ou nas mudanças de base que altera a ligação do “*primers*”. O processo é rápido e requer somente pequena quantidade de DNA (25 ng) e não necessita radioatividade para visualização.

A técnica de RAPD tem sido aplicada na construção de mapas genéticos (REITER *et al.*, 1992) e em estratégias, como a análise de segregantes em “bulk”, para detectar marcadores ligados à genes de resistência à doenças de plantas (MICHELMORE *et al.*, 1991).

Os marcadores por RAPD são usualmente dominantes porque os polimorfismos são detectados como presença ou ausência de bandas. A deleção ou inserção onde continha um sítio de homologia para um dos “*primers*” é perdida, levando então à ausência daquela banda no gel de agarose. Esses marcadores possibilitam um método rápido para o fornecimento e análise de populações (HU & QUIROS, 1991), cuja frequência de polimorfismo dificilmente é encontrada em outros métodos tais como eletroforese de proteínas ou cromatografia líquida de precisão.

Outra classe de marcadores que têm sido muito utilizada são os *microsatélites* que são regiões do DNA que contém sequências repetitivas simples de 2 bp, dispostas em tandem (por exemplo, GT-GT-GT...) e ocorrem abundantemente no genoma de eucariotas (SOLLER, 1990; CRAWFORD *et al.*, 1991; HOLMES, 1994).

Microsatélites têm sido utilizados com sucesso como marcadores para doenças genéticas. Podem também ser usados em testes de paternidade e construção de mapas genômicos (HOLMES, 1994).

Os *microsatélites* produzem uma grande variedade de marcadores genéticos, como pôde ser demonstrado por CRAWFORD *et al.* (1991) que caracterizaram 5 *microsatélites* do genoma de ovinos.

Pesquisas desenvolvidas nesse setor têm procurado otimizar o uso de *microsatélites* como marcadores, atuando sobre a praticidade e redução do

custo da técnica. Como os *microsatélites* são seqüências mais curtas que VNTR, eles são mais fáceis de clonar e seqüenciar. Novos *microsatélites* podem ser clonados diretamente do DNA genômico ou DNA de cromossomos específicos. Bibliotecas genômicas são geradas em vetores por ligação com DNA genômico cortado com enzimas de restrição (*Sau3AI* ou uma combinação de *AluI*, *RsaI* e *HaeIII*), então os *microsatélites* são procurados através da hibridização com sondas oligonucleotídicas simples repetitivas e os clones positivos são seqüenciados (HEARNE *et al.*, 1992). Além do seqüenciamento da região repetitiva, as extremidades específicas 5' e 3' do clone, que não são repetitivas, podem ser usadas para desenho de "*primers*" que serão então utilizados para amplificação de uma região específica contendo um *microsatélite*. A diferença entre os indivíduos é detectada pela variação no número de repetições, sendo usualmente tão pequenas quanto 2 bases se a unidade repetitiva é de 2 bases, 3 bases se for de 3 e assim por diante.

A taxa de mutação de *microsatélites* é estimada entre 5×10^{-4} e 10^{-5} , o qual é baixa, portanto permite o seu uso em estudos de ligação e associação de doenças genéticas e outras características qualitativas ou quantitativas desde que exista desequilíbrio de ligação entre o marcador e o locus candidato.

A tecnologia da PCR permitiu um grande avanço no mapeamento do genoma humano e todas as outras espécies. Sem a PCR seria impossível o conhecimento de marcadores altamente polimórficos, como os *microsatélites*, e até hoje estaria sendo utilizado polimorfismo gerado por isoenzimas e outras proteínas através de eletroforese. Como a metodologia, apesar de simples, envolve diversas dificuldades a técnica em si será abordada com maior detalhe no próximo item.

2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

PCR é um método de síntese enzimática *in vitro* de uma seqüência definida de DNA; a reação usa dois "*primers*" que hibridizam às fitas opostas que flanqueiam a seqüência de DNA alvo a ser amplificada. A extensão dos "*primers*" é catalizada pela *Taq* DNA polimerase, uma polimerase de DNA termo-estável,

que é isolada de uma eubactéria termofílica *Thermus aquaticus*. Uma série repetitiva de ciclos envolvendo desnaturação do DNA molde, anelamento de “primers” e extensão deles pela *Taq* DNA polimerase, resulta em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA. As extremidades dos fragmentos são definidas pelo término 5' dos “primers”. Como o produto da extensão dos “primers” acumula, à cada ciclo e pode servir como um molde para o próximo ciclo, o número de cópias alvo dobra aproximadamente cada ciclo (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995).

Apesar da simplicidade que envolve a metodologia da PCR o processo que ocorre ao longo da reação é muito complexo, pois envolve conhecimento de cinética enzimática e desnaturação/renaturação de ácidos nucleicos. Portanto, diversos trabalhos são realizados na tentativa de elucidar os problemas inerentes à toda reação de PCR que envolve concentração de reagentes, temperaturas e tempo adequados para cada amplificação.

A primeira amplificação enzimática de uma sequência específica foi realizada por SAIKI *et al.* (1985) para diagnóstico da anemia falciforme em humano. Naquela ocasião a DNA polimerase utilizada foi a DNA polimerase I de *E. coli*, que tinha de ser adicionada à cada ciclo de desnaturação. Apesar das limitações da técnica na época, concluíram que a produtividade da amplificação poderia ser medida como $(1 + X)^n$, onde X é a eficiência média por ciclo e n é o número de ciclos. Após 20 ciclos de amplificação chegaram à uma eficiência de 85% o que representou uma amplificação de 220000 vezes ($1,85^{20}$) o número de cópias iniciais. Não obstante ao número de cópias duplicadas a visualização ainda era feita utilizando uma sonda marcada radioativamente.

SAIKI *et al.* (1988) trouxeram grande contribuição para o avanço da PCR por meio da utilização da *Taq* DNA polimerase nas reações de amplificação. Por se tratar de uma enzima termo-estável aboliu-se a necessidade de reposição da DNA polimerase à cada ciclo de desnaturação do DNA. Ademais contribuíram muito para o estudo da cinética enzimática e otimização das reações de PCR. Seus resultados mostraram que a eficiência da amplificação cai de 87% com 20 ciclos para 61% com 35 ciclos. Como somente à partir do terceiro ciclo surge uma

molécula alvo (delimitada pelos 2 “*primers*”) a produtividade pode ser calculada como $[(1 + X)^n - (2 + 2(n - 1))]$, onde X é a eficiência de amplificação e n é o número de ciclos. Portanto em 20 ciclos se tem 273.381 vezes o número de cópias iniciais, enquanto que em 35 ciclos 17.334.204 vezes. Concluíram que a sensibilidade da *Taq* polimerase foi suficiente para amplificar uma única molécula diluída em 10^5 a 10^6 células (0,6 cópia do gene da β -globina em 2 μ g de DNA - equivalente a 600.000 cópias do gene diluído 10^{-6}). Partindo de 15.000 cópias iniciais (50 ng de DNA genômico) em um alvo de 1 kb (1000 pares bases) tería-se 0,017 pg (3,33 pg/cópia \times 15.000 \div 3 $\times 10^9 \times$ 1000 bases) do alvo (difícilmente detectável mesmo com sonda marcada com P^{32}), que após 35 ciclos de amplificação seria então $0,017 \times 17.334.204 = 289$ ng do alvo o que seria possível visualizar em gel de agarose corado com brometo de etídio. Mostraram ainda que o tempo de extensão e quantidade de *Taq* polimerase influenciam a especificidade da enzima. Quanto maior o tempo de extensão e quantidade da enzima pior a especificidade da reação. Reportaram que a temperatura de anelamento afetava a especificidade da *Taq* polimerase, onde o aumento da temperatura diminuiu o aparecimento de produtos inespecíficos.

INNIS *et al.* (1988) mostraram que a *Taq* DNA polimerase é muito rápida e ativa. Dentro de 2 minutos à 70°C ela foi capaz de replicar 7,25 kb, equivalente a uma taxa de extensão de 60 nucleotídeos por segundo. A *Taq* DNA polimerase retém atividade significativa em temperaturas baixas, sendo que a taxa de extensão foi de 24, 1,5 e 0,25 nucleotídeos por segundo à 55°C, 37°C e 22°C, respectivamente.

Otimização da PCR envolve teste de diferentes variáveis, uma das quais é a temperatura de anelamento dos “*primers*” (T_a). Se a temperatura de anelamento é muito baixa, nenhum produto específico é amplificado, causando o aparecimento de bandas múltiplas no gel. Se a T_a é muito alta, a produção do produto desejável e algumas vezes a pureza é reduzida devido ao pobre anelamento dos “*primers*”. Também é fundamental a estrutura dos mesmos, evitando-se utilizar “*primers*” que anelam em si próprio permitindo formação de estruturas em “U” (“*hairpin*”) ou pareamento com o par formando estruturas

compostas de pareamento de “primers” (“dímeros”), conforme discutido por LOWE *et al.* (1990), WANG *et al.* (1994) e ROUX (1995).

RYCKLIK *et al.* (1990) examinaram a T_a que maximizava o produto desejável, apresentando um método para determinação da T_a ótima, baseado no cálculo da temperatura de fusão (T_m) do par “primer “-DNA molde menos estável e do produto amplificado. Desenvolveram a seguinte formulação empírica:

$$T_a^{opt} = 0,3 T_m^{“primer”} + 0,7 T_m^{produto} - 14,9$$

na qual $T_m^{“primer”}$ é o T_m calculado do par “primer “-DNA molde menos estável e $T_m^{produto}$ é a T_m do produto da amplificação. O cálculo da $T_m^{“primer”}$ resultou do modelo “nearest - neighbor” de acordo com a equação abaixo:

$$T_m^{“primer”} = \Delta H / \{ \Delta S + R \times \ln(c/4) \} - 273,15 + 16,6 \log [K^+]$$

onde ΔH e ΔS são, respectivamente a entalpia e entropia para formação da hélice, R é a constante molar dos gases (1,987 cal/°C x mol), c é a concentração molar de DNA, determinado empiricamente como 250 pM, já que a variação da concentração de DNA na PCR varia à cada ciclo. $[K^+]$ é a concentração de íons K^+ na PCR que é 50 mM. A $T_m^{produto}$ foi calculada através da fórmula:

$$T_m^{produto} = 0,41(\%G + \%C) + 16,6 \log[K^+] - 675/l + 81,5$$

onde l é o comprimento do produto amplificado em resíduos de nucleotídeos.

As equações para cálculo de T_a têm sido incorporadas em diversos “softwares” especializados para seleção de oligonucleotídeos de uso em PCR. RYCHLIK *et al.* (1990) criaram o programa OLIGO que utiliza as equações acima para determinar a T_a^{opt} . Outro programa para síntese de “primers” para PCR foi desenvolvido por LOWE *et al.* (1990).

Outro fator importante na otimização da PCR é o tempo de cada um dos passos que compõem um ciclo de amplificação. WITTEWER *et al.* (1990)

mostraram, que utilizando um termociclador com sistema de aquecimento por ar e amplificação em tubos capilares, a transferência do calor era rápida ao ponto de se fazer uma reação com 30 ciclos em 15 minutos. Concluiu que o passo limitante é o tempo de extensão, que depende do tamanho do fragmento e atividade da DNA polimerase, enquanto que o anelamento e desnaturação ocorrem muito rapidamente, desde que a amostra atinja a temperatura ideal. WITTWER & GARLING (1991), compararam a amplificação utilizando termociclador de ciclo rápido e o tradicional com aquecimento por placa, mostrando que o ponto crítico do último é o tempo que leva se leva para atingir a temperatura de anelamento à partir da temperatura de desnaturação (tempo de salto), onde quanto maior esse tempo, maior o aparecimento de fragmentos múltiplos na reação de amplificação.

Outros fatores que podem interferir na produtividade da reação de amplificação é a presença de agentes inibidores e a concentração de $MgCl_2$. ROUX (1995) descreve alguns agentes inibidores, incluindo detergentes iônicos (SDS e Sarkosyl, usados na extração de DNA), fenol, heparina, xylene cyanol e bromophenol blue. Proteinase K pode digerir a *Taq* polimerase, mas é prontamente inativada à 95°C por 5 minutos. O mesmo autor sugere manipular a concentração de $MgCl_2$ desde 0,5 mM até 5 mM em incrementos de 0,5 mM.

2.3. Construção de mapas genéticos

Após a obtenção de marcadores polimórficos o próximo passo é a construção de mapas genéticos ou de ligação. Mapas genéticos são construídos por análise de ligação, isto é, as relações de ligação meiótica dos loci gênicos em estudo. Isto envolve a estimação da frequência de recombinação entre os loci (posições dos genes no cromossomo) e observações genealógicas de uma família. A unidade no mapa que expressa distância genética associado com 1% de recombinação é denominada um centimorgan (cM). Uma taxa de recombinação de 1% é baixa e loci separados por 1 cM são altamente ligados, entretanto à uma distância física estimada de 1 milhão de bases (FRIES, 1993).

Para uma análise de ligação envolvendo 2 loci, um animal deve ser duplamente heterozigoto, isto é, deve ter 2 alelos diferentes em cada um dos 2 loci examinados, assim cada alelo, que o animal transmite a sua progênie, pode ser identificado. Além da heterozigose deve existir desequilíbrio de ligação entre os loci, de modo que um alelo marcador esteja presente mais freqüentemente com um dos alelos da característica (outro loci), detectando assim uma associação entre os loci. Em casos extremos de equilíbrio um alelo marcador aparece sempre junto com um dos alelos da característica sob estudo.

Dessa forma marcadores podem ser usados rotineiramente como um meio de identificar animais que são heterozigotos para uma característica recessiva simples em uma população. A habilidade de diferenciar entre normal e portador (carreador) pode permitir a eliminação de defeitos indesejáveis por meio de seleção. Um marcador encontrado que estiver estritamente ligado ao gene anormal pode ser usado como um ponto de partida para caminhar ao longo do cromossoma até o gene anormal e isolá-lo. Esta técnica é chamada genética reversa, porque ela permite isolamento de um gene sem conhecimento prévio da proteína que aquele gene produz (NICHOLAS, 1996).

A aplicação de marcadores hipervariáveis em mapas genéticos é possível quando existem alelos que podem responder à seleção por determinar cosegregação de marcadores que estão estritamente ligados à características de importância econômica. Por exemplo, os marcadores podem ser usados para pesquisar alelos que afetam resistência a doença. Fatos tem sido comprovados em avicultura, onde um fragmento polimórfico de impressão do DNA foi encontrado ser cosegregante com resistência a doença de Marek em uma linhagem de frangos (TROYER *et al.*, 1990).

A construção de um mapa genético do bovino iniciou-se em 1989, sendo uma colaboração de diversos países e centros de pesquisas. Atualmente são 15 famílias referência, num total de 347 indivíduos, distribuídas em pelo menos 5 instituições:

- ♦ CSIRO - na Austrália;
- ♦ Texas A&M University - EUA;

- ♦ ILRAD - Kenya;
- ♦ INRA - França;
- ♦ USDA MARC - EUA.

O grupo envolvido na construção do mapa genético é muito maior incluindo diversas universidades na Europa, Israel, EUA, África e Austrália. O objetivo inicial é saturar o genoma bovino com marcadores altamente polimórficos e como consequência associar tais marcadores com características de importância econômica e localizar os genes importantes.

Os mais recentes mapas genéticos do bovino reportam uma saturação do genoma com 746 (BARENDSE *et al.*, 1997) e 1250 polimorfismos (KAPPES *et al.*, 1997). BARENDESE *et al.* (1997) registraram um comprimento médio de 3532 cM, que comparado ao tamanho do genoma bovino de 3699 cM, equivale à 95% de saturação do mesmo. A distância média entre marcadores nesse mapa é 5,3 cM, sendo que 32% estão à menos que 5 cM, 67% menos que 10 cM e 4% à mais de 20 cM, o que representa 470 cM ou 13,6% do comprimento do mapa. O mapa de ligação citado por KAPPES *et al.* (1997) cobre aproximadamente 2990 cM do genoma num intervalo médio de 2,5 cM. Heterozigose foi determinada para todos *microsatélites*, sendo em média 40,2, 42,5, 59 e 76% para linhagem pura consangüínea de *Bos Taurus*, linhagem pura não consangüínea de *B. Taurus*, F_1 *B. Taurus* e F_1 *Bos indicus*/*B. Taurus*, respectivamente. Uma escala relativa (1-5) indicando facilidade de identificação foi implementada em 802 marcadores genotipados para identificar aqueles adequados para examinar o genoma em estudos de QTL. Este "score" está acessível via "World Wide Web" no endereço <http://sol.marc.usda.gov/>. Oitenta e cinco por cento (683) e 7% (59) foram classificados como marcadores primários (1 e 2) e secundários (3), respectivamente. Os 7% remanescentes são considerados difíceis (4 e 5) e podem somente ser usados quando ambos parentais são genotipados além da progênie.

Ambos mapas representam um considerável melhoramento da resolução do mapa bovino que aumenta a probabilidade de detecção de QTL e subsequente seleção assistida por marcadores (MAS) e clonagem posicional.

Atualmente representa o quarto genoma mais bem mapeado, após o humano, o camundongo e o rato, tanto em termos de genes, quanto polimorfismo anônimo de DNA (*microsatélites*).

2.4. Mapeamento de características quantitativas

O passo subsequente após o estabelecimento de um mapa genético saturado é a utilização do mesmo para estudos de associação com características de importância econômica. O mapeamento de características quantitativas envolve um número de procedimentos estatísticos e recursos computacionais que serão abordados nesse item.

Muitas características dos indivíduos mostram uma contínua variação na progênie de específicos parentais. A análise dessas características, chamadas métricas ou quantitativas, exige o uso de métodos biométricos os quais assumem que a variação é causada pelas influências de ambiente em vários loci gênicos, bem como interações do tipo genótipo-ambiente (GELDERMANN, 1975).

Características quantitativas envolvem a atuação de polialelos que contribuem com efeitos dos mais diversos na expressão das características, onde cada locus tem um efeito muito pequeno na característica. Não se observa clara dominância e o fenótipo sofre uma grande influência ambiental. Nestes casos também procura-se determinar a ligação entre a característica de importância econômica e o segmento cromossômico especificamente marcado, por meio de testes biométricos.

A transmissão de cromossomos dos parentais a progênie pode ser acompanhada por meio de marcadores genéticos. A progênie de um parental diplóide - considerando um locus heterozigoto marcado - pode ser subdividida em duas classes, uma classe da progênie recebendo um alelo enquanto a outra classe recebe outro alelo. Se os genes para uma característica quantitativa estiverem ligados a um marcador e o parental tem alelos com efeitos diferentes, é altamente provável que as duas classes também diferirão nesta característica. Quando não existe nenhum "crossing-over" ou recombinação entre o marcador e

o(s) gene(s) para a característica quantitativa, cada uma das duas classes serão homogêneas para aquele caráter específico. Por outro lado, se dentro de uma classe de progênie ocorrer crossing-over entre os loci para a característica quantitativa e o marcador, uma distribuição heterogênea dos valores correspondentes ao caráter será esperada dentro das duas classes de progênie (GELDERMANN, 1975). Se os alelos de dois ou mais genes são considerados simultaneamente, estudos de parentais e progênies darão informações sobre a localização dos genes nos cromossomos (GELDERMANN, 1976).

Estudos de ligação entre marcadores e QTL em populações segregantes e consangüíneas têm sido feitos por diversos autores (SOLLER *et al.*, 1976; SOLLER & HAZAN, 1977; SOLLER & GENIZI, 1978; WELLER, 1986; LANDER & BOTSTEIN, 1989; WELLER *et al.*, 1990; HALEY & KNOTT, 1992; MACKINNON & GEORGES, 1992; DODDS *et al.*, 1993; SMITH & SMITH, 1993).

SOLLER & HAZAN (1977) preveniam que os geneticistas tinham que encontrar meios para detectar aumento do número de marcadores bioquímicos e outros tipos de marcadores economicamente úteis para plantas e animais. Entretanto, atualmente o número de marcadores polimórficos é suficiente para estudos de ligação, conforme mostrado nos 2 trabalhos que relatam o estado do mapa genômico bovino (KAPPES *et al.*, 1997; BARENDESE *et al.*, 1997).

SOLLER & GENIZI (1978) propuseram uma metodologia para avaliar poder de teste estatístico (baseado na razão-F) para detecção de ligação entre um locus marcado e um locus afetando uma característica quantitativa, em população segregante de meio-irmãos e irmãos-completos. Nesse trabalho mostraram que o teste de hipótese $H_0: \delta_1 = \delta_2 = \delta_3 \dots = 0$, onde $\delta_{1,2,3 \dots}$ é a diferença do valor quantitativo da progênie que recebeu os dois alelos alternativos do marcador à partir de um pai heterozigoto, poderia ser testado por uma análise de variância como:

$$F = (SS_b/N)/[SS_w/2N(n-1)]$$

onde $SS_b = n \sum_i \sum_j (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_{i.})^2$ ou $n \sum_i (\bar{y}_{i1.} - \bar{y}_{i2.})^2/2$ é a soma de quadrados (SS) entre classe do marcador (entre progênie que recebeu o alelo A e B do pai) dentro de família, e $SS_w = \sum_{i,j,k} (y_{ijk} - \bar{y}_{ij})^2$ é a SS dentro de classe de marcador

(dentro do alelo A ou B recebido pelo pai) dentro de família. A resposta obtida é se existe alguma associação entre os loci marcador e quantitativo, sem entretanto nos dizer nada sobre a posição ou distância entre eles, nem o quanto estão ligados. A metodologia utilizadas por esses autores tem sido vastamente aplicada ao estudo de associação entre marcadores e QTL.

Associações entre marcadores e características quantitativas podem ser estabelecidas através de um, dois ou múltiplos loci marcadores. Sob uma análise com um único marcador ("single-marker analysis"), a distribuição do valor do caráter é examinado separadamente para cada locus marcador ("marker locus"). Cada teste é então feito separadamente, independentemente da informação de outros marcadores, sendo que com n marcadores, n análises com marcador simples são realizadas. Essa é uma boa escolha quando o objetivo é uma simples detecção de um QTL ligado ao marcador, sem fornecer qualquer estimativa da posição e efeito do QTL. A desvantagem dessa metodologia é que os efeitos fenotípicos do QTL são subestimados, a localização do QTL não é estabelecida e o número de progênie requerida para detecção do QTL é maior do que necessário (LANDER & BOTSTEIN, 1989). Contudo a facilidade do método de análise de variância, que pode ser efetuado em diversos pacotes estatísticos, tem sido bastante utilizado.

Para efeito de clonagem posicional a estimativa do efeito e localização do QTL é necessária, de modo que a utilização de diversos marcadores dispostos ao longo do cromossomo são indispensáveis. A posição pode ser então estimada através dos marcadores que flanqueiam o QTL, sendo utilizado a metodologia da máxima verossimilhança (WELLER, 1986; LANDER & BOTSTEIN, 1989) ou regressão múltipla (HALEY & KNOTT, 1992). Ambos fornecem como resposta a localização e efeito do QTL, sendo que o primeiro é mais complexo e requer maior recurso computacional, enquanto que o segundo pode ser usado mediante qualquer pacote estatístico.

O método de associar genética molecular com seleção artificial é conhecido como seleção assistida por marcadores (MAS). Pode-se derivar índices de seleção que maximize a taxa de melhoramento em características

quantitativas sob diferentes esquemas de MAS combinando informações de polimorfismos genéticos (marcadores de loci) com dados da variação fenotípica entre os indivíduos. A eficiência de seleção artificial pode ser aumentada substancialmente utilizando MAS. O aumento da eficiência de seleção a partir do uso de marcadores de loci e o tamanho da amostragem necessária depende dos parâmetros genéticos e esquema de seleção (LANDE & THOMPSON, 1990).

Para se obter razoável poder estatístico na determinação de QTL com alelos de pequeno a médio efeito (menos que metade do desvio padrão fenotípico), centenas ou até milhares de progênies devem ser testadas (SOLLER *et al.*, 1976; SOLLER & GENIZI, 1978). Portanto para se obter grandes amostras em experimentos desse tipo freqüentemente necessita-se de amostragem da população comercial existente (especialmente em animais) e ou populações de campo expostas às condições de estresses do meio, que tem algum grau de seleção dentro da população atuando sobre as características e genótipo a serem medidos, introduzindo erros na amostragem experimental. O termo população refere-se a progênie derivada de um parental comum, isto é, progênie constituída de meio irmãos em experimentos animais, F_2 ou progênie de retrocruzamento em animais ou plantas (MACKINNON & GEORGES, 1992; DODDS *et al.*, 1993).

Dados provenientes de populações comerciais são afetados por diversos fatores não genético, como idade do animal, idade da mãe, sistema de manejo, estação de nascimento e rebanho. Também, cruzamento direcionado, seleção e superposição de gerações contribuem com a complexidade dos dados. Modelos lineares como BLUP ("Best Linear Unbiased Prediction") acabou com estas complicações quando existem registros de dados de parentesco e fenotípicos. Novas metodologias para aplicação do BLUP em seleção assistida por marcadores foram desenvolvidas para melhoramento animal (FERNANDO & GROSSMAN, 1989; CANTET & SMITH, 1991; SMITH & SMITH, 1993).

Associações de marcadores moleculares com QTL foi proposta inicialmente para gado de leite onde diversos trabalhos têm sido desenvolvidos (SOLLER & GENIZI, 1978; GELDERMANN, *et al.*, 1985; KASHI *et al.*, 1990).

Estes trabalhos são aplicados principalmente para auxílio de seleção de touros em programas de teste de progênie. Em gado de corte o primeiro trabalho de associação de marcadores moleculares com características quantitativas, em famílias de meio-irmãos paternos, foi desenvolvido por BEEVER *et al.* (1989) onde encontraram efeitos significativos em dois dos seis marcadores utilizados. Entretanto o projeto mais bem elaborado em gado de corte está sendo desenvolvido pela Texas A&M University, no "The Angleton Project" (TAYLOR *et al.*, 1996), que teve início em 1989 e está previsto o término da coleta de dados em 1997. Esse projeto tem como objetivo principal identificar QTLs responsáveis por variação em crescimento e características de carcaça, utilizando uma grande família de irmãos completos (640 animais) composto de $\frac{3}{4}$ Angus x $\frac{1}{4}$ Brahman e $\frac{1}{4}$ Angus x $\frac{3}{4}$ Brahman, gerados por múltipla ovulação e transferência de embriões. Espera-se que num período de 2 a 5 anos consigam identificar os genes responsáveis pelas associações encontradas para então comercializarem o teste. Os resultados desse projeto e alguns outros trabalhos, são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1

Sumário de experimentos que encontraram algum grau de associação entre marcadores moleculares e características de importância econômica em bovinos.

Cromossoma	Características	Gene Candidato * ou marcador	Referências
1	# Presença/ausência de chifre	POLL	TAYLOR et al., 1996
	# Peso vivo e gordura	-	TAYLOR et al., 1996
	# Peso nascer direto e materno, ganho pós desmame	PIT1	MOODY et al., 1996
	# Produção de leite, % de gordura e proteína no leite	-	GEORGES et al., 1994
2	# Taxa crescimento	MH	TAYLOR et al., 1996
	# Área olho lombo e rendimento de carcaça	MYL1	TAYLOR et al., 1996
3	# % Gordura no leite	-	HOESCHELE et al., 1997
4	# Contagem de células somáticas	-	HOESCHELE et al., 1997
5	# Peso nascer direto e materno, ganho até desmama direto e materno, ganho pós desmame	IGF I	MOODY et al., 1996
6	# Caract. Crescimento	-	BEEVER et al., 1997
	# Produção de leite, % de gordura e proteína no leite	-	HOESCHELE et al., 1997
	# Peso nascer direto e materno, ganho até desmama direto e materno	CSN3	MOODY et al., 1996
	# Produção de leite, % de gordura e proteína no leite	-	GEORGES et al., 1994
7	# Maciez carne	CAST	TAYLOR et al., 1996
	# Taxa ovulação	-	KAPPES, 1996
9	# Produção de leite, % de gordura e proteína no leite	-	GEORGES et al., 1994
10	# Produção de leite, % de gordura e proteína no leite	-	GEORGES et al., 1994

continuação

Cromossoma	Características	Gene Candidato ou marcador	Referências
11	# Peso ao nascer direto, materno e ganho até desmama direto	LGB	MOODY et al., 1996
12	# Características de Crescimento	-	BEEVER et al., 1997
14	# Peso ao nascer e crescimento pós-desmama	-	HETZEL et al., 1997
18	# Cor pelagem vermelha/preta	MSHR	KAPPES, 1996
	# Caract. Crescimento	-	BEEVER et al., 1997
19	# Taxa crescimento	-	HETZEL et al., 1997
	# Características de crescimento	-	BEEVER et al., 1997
	# Peso ao nascer materno, ganho até a desmama materno e ganho pós-desmame	GH	MOODY et al., 1996
	# Produção de leite, gordura e proteína	GH	YAO et al., 1996
20	# % de gordura e proteína no leite	-	HOESCHELE et al., 1997
	# Produção de leite, % de gordura e proteína no leite	-	GEORGES et al., 1994
21	# Peso ao nascer e crescimento até desmama	-	HETZEL et al., 1997
	# Caract. Crescimento	-	BEEVER et al., 1997
23	# Caract. Crescimento	-	BEEVER et al., 1997
	# Facilidade Parto	BM203	ASHWELL et al., 1997
27	# Facilidade Parto	BM1443	ASHWELL et al., 1997

* POLL (polled); PIT1 (pituitary transcription factor 1); MH (muscular hypertrophy); MYL1 (myosin light chain 1); IGF1 (insulin-like growth factor I); CSN3 (kappa-casein); CAST (calpastatina); LGB (lactoglobulin-beta); MSHR (melanocyte stimulating hormone receptor); GH (growth hormone); BM203 e BM1443 (microsatélites).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. População e obtenção de dados quantitativos

Para realização deste trabalho utilizou-se animais provenientes do rebanho bovino da Granja Rezende S/A, que utiliza parte para produção de Nelore e parte para cruzamento com touros europeus (Aberdeen Angus e Simental), sendo que a inseminação artificial é prática rotineira do manejo reprodutivo. Adota-se um método de avaliação genética baseada na metodologia dos modelos mistos com modificações (BRITO & FRIES, 1994). A tendência genética estimada no rebanho Nelore para o ganho de peso do nascimento ao desmame (GND) foi 1,881 kg/ano (de 1985 a 1995), correspondendo à 1,267% da média fenotípica da característica (148,47 kg). As contribuições dos pais foram de 1,83 e 0,05 kg para touros e vacas, respectivamente (SANCEVERO, 1995). Por outro lado, a tendência genética para ganho de peso pós-desmame (GPD) foi estimada em 0,945 kg/ano (de 1987 a 1996), o que corresponde à 1,457 % da média fenotípica da característica (64,8618), sendo 0,866 kg e 0,0294 kg de contribuição de touros e vacas, respectivamente.

O rebanho é dividido em Nelore e cruzamento, sendo que no primeiro as vacas são acasaladas, por inseminação artificial (IA), com touros Nelore provados, levando em consideração a genealogia dos animais evitando-se consangüinidade acima de 25%. No cruzamento, na primeira fase, vacas Nelore são inseminadas com Aberdeen Angus e Simental, para produção de fêmeas com alta habilidade materna. Numa segunda fase do cruzamento touros Limousin são acasalados com fêmeas oriundas da primeira fase, produzindo animais $\frac{3}{4}$ europeu para terminação (SANCEVERO, 1995).

O programa de melhoramento genético adotado tem como objetivo desenvolver um sistema de seleção capaz de avaliar as principais características genéticas de importância econômica. São avaliados as

características de peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND - 205 dias), ganho de peso pós - desmame (GPD - 365 dias) e perímetro escrotal (PE). Todas as informações necessárias para a avaliação genética são colhidas ao longo do ciclo de produção e o rebanho é avaliado como único (através de correções para heterozigose). A avaliação genética dos animais é feita independentemente para cada característica estimando-se a diferença esperada na progênie (DEP) de touros, vacas e produtos para peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD) e perímetro escrotal (PE), sob um modelo descrito adiante. As DEPs de touros são obtidas usando o seguinte modelo genético aditivo, conforme descrito por BRITO & FRIES (1994), compreendendo duas fases:

1. Ajuste dos dados: todos os efeitos fixos conhecidos são ajustados dentro de cada grupo contemporâneo, sendo:

Ajustes para ganho de peso do nascimento ao desmame (GND)

- ◆ ajuste quadrático - quadrático para idade do bezerro (205 dias);
- ◆ ajuste quadrático para idade da vaca (7 anos);
- ◆ ajuste cúbico - quadrático - cúbico dentro da estação para data de nascimento (3 de setembro ou 247 dias julianos), heterose materna (14%) e heterose individual (12%).

Ajuste para ganho pós-desmame (GPD)

- ◆ Para o GPD é feito ajuste linear multiplicativo para 160 dias pós-desmame e 12 % de heterose individual.

2. Estimação dos efeitos genéticos: as DEPs dos touros e vacas são estimadas, por meio de um modelo animal reduzido, usando o seguinte modelo genético aditivo:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + D_j + S_k + E_{ijkl} \quad (A)$$

onde:

μ = média geral;

Y_{ijkl} = observação da característica (GND, GPD ou PE) no i^{th} produto, filho da j^{th} vaca k^{th} touro, pertencente ao i^{th} grupo contemporâneo, que recebeu a i^{th} amostragem mendeliana de genes;

G_i = efeito ambiental do i^{th} grupo contemporâneo (GC) ;

D_j = capacidade real de produção (CRP) da j^{th} vaca;

S_k = DEP do k^{th} touro;

E_{ijkl} = efeito residual associado com a observação do i^{th} animal, pertencente ao i^{th} GC, filho (a) do k^{th} touro e j^{th} vaca e que recebeu a i^{th} amostragem mendeliana de genes.

Sendo:

$$E(Y_{ijkl}) = \mu + G_i + V_j + T_k \quad \forall_{ijkl}$$

$$V(V_j) = \sigma^2 V \quad \forall_j$$

$$V(T_k) = \sigma^2 T \quad \forall_k$$

$$V(E_{ijkl}) = \sigma^2 e \quad \forall_{ijkl}$$

$$\text{Cov}(V_j T_k) = 0 \quad \forall_{jk}$$

$$\text{Cov}(V_j e_{ijkl}) = 0 \quad \forall_{ijkl}$$

$$\text{Cov}(T_k e_{ijkl}) = 0 \quad \forall_{ijkl}$$

onde,

$E(\)$ = operador de esperança matemática;

$V(\)$ = operador de variância e

$\text{Cov}(\)$ = operador de covariância

As DEPs dos produtos são obtidas através de um modelo animal reduzido, como uma função do mérito genético dos pais e da performance própria através da estimativa do efeito da segregação mendeliana dos genes:

$$D_{ijkl} = 0.5 \tilde{V}'_{ijkl} + 0.5 \tilde{T} + (\sigma^2 t / 2\sigma^2 e) [y_{ijkl} - (\hat{\mu} + \hat{G}_i) - \tilde{V}_j - \tilde{T}_k] \quad (B)$$

onde os sobrescritos \sim e $\hat{}$ referem-se, respectivamente, aos valores preditos dos efeitos aleatórios e valores estimados dos efeitos fixos do modelo (A).

O efeito \tilde{V}_{ijkl} corresponde a DEP da vaca que é calculada à partir da capacidade real de produção (CRP) da mesma. Esta por sua vez corresponde aos efeitos genéticos diretos e maternos da mãe, além dos ambientais permanentes, que são estimados pelo modelo (A). Para cálculo da DEP à partir da CRP considera-se 0,25 de herdabilidade (h^2) e 0,3 de repetibilidade (r).

A relação $\sigma^2_t / 2\sigma^2_e$ fornece a proporção esperada do resíduo E que seria decorrente do efeito da segregação mendeliana dos genes recebidos pelo animal. As soluções para o modelo (A) são obtidas por um processo iterativo, sobre a vaca de dados, utilizando o algoritmo de *Gauss-Seidel*. Inicialmente, todos os efeitos são estimados como fixos (exceto o resíduo) e a partir das soluções fixas para os efeitos de touro e vaca, representados por \hat{V}_j e \hat{T}_k , respectivamente, são obtidos os estimadores desses efeitos (soluções aleatórias), usando as seguintes equações :

$$\tilde{V}_j = \hat{V}_j [n_{..j..} / (n_{..j..} + A)]$$

sendo:

$n_{..j..}$ = nº filhos avaliados da j^{th} vaca;

A = relação entre a variância residual e a variância entre vacas no modelo (A) ;

\tilde{V}_j = capacidade real de produção (CRP) da j^{th} vaca.

$$\tilde{T}_k = \hat{T}_k [n_{...k.} / (n_{...k.} + K)]$$

sendo:

$n_{...k.}$ = nº de filhos avaliados do k^{th} touro;

K = relação entre variância residual e variância entre touros no modelo (A);

\tilde{T}_k = diferença esperada na progênie (DEP) do k^{th} touro.

$$\tilde{V}_j = \hat{V}_j [(n_{..j..} + A) / (n_{..j..} + K)]$$

sendo:

\tilde{V}_j = DEP da j^{th} vaca e dos demais termos conforme já definido anteriormente.

A herdabilidade e repetibilidade assumidas para GND são 0,25 e 0,30 respectivamente, enquanto que a herdabilidade para GPD é 0,40.

A metodologia utilizada na avaliação genética combina conceitos de análise robusta, que é feita após a análise convencional, quando todos os parâmetros já foram estimados, podendo-se então calcular uma quantidade de cada observação que não foi explicada pelo modelo e, portanto, indicar se uma observação é “extrema” ou “duvidosa”. Ao mesmo tempo, o desvio padrão de cada GC é calculado e, com base nessas informações, um fator de ponderação ou confiança é obtido para cada uma das observações. Então, a análise recomeça, fazendo com que aquelas observações “extremas” ou “duvidosas” tenham uma menor influência na estimativa final dos parâmetros (BRITO & FRIES, 1994).

As DEPs dos animais são expressas adotando-se uma base móvel, ou seja, um indivíduo com valor genético médio apresenta uma DEP igual a zero. Decorre ainda que o valor genético (BV) dos animais é igual ao dobro da DEP. Ademais a DEP e BV refletem o valor de um indivíduo como parental, representando portanto apenas os efeitos dos genes independentes, sendo portanto aditivo. Por outro lado, o valor genotípico do indivíduo reflete não somente os genes independentemente, mas também combinados, através das relações de dominância e epistasia. Decorre disso que o valor genotípico não passa para a progênie, mas sim o valor genético.

Após a desmama parte dos bezerros foram destinados à engorda em confinamento (41% dos machos desmamados), conforme ilustrado na Tabela 2. Parte dos machos em confinamento foram amostrados para realização deste trabalho (Tabela 3), perfazendo um total de 308 animais,

constituindo 8 famílias de meio - irmãos. Os resultados da avaliação genética, como também os do desempenho em confinamento foram utilizados. Ademais, 325 vacas, constituindo 14 famílias de meio-irmãos fizeram parte deste estudo, sendo que os resultados da avaliação genética foram utilizados para associação com os marcadores moleculares.

TABELA 2
Distribuição da quantidade de bezerros confinados em relação ao total desmamado na **Rezende Alimentos** em 1995

Raças*	Total machos desmamados	Machos confinados	
		Nº	%
LINE	145	108	74
SNE	377	240	64
NE	995	271	27
TOTAL	1517	619	41

* LINE - 0,5 limousin x 0,5 nelore
SNE - 0,5 simental x 0,5 nelore
NE - nelore

As características quantitativas medidas ao longo do trabalho foram as seguintes:

- ◆ Peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND) , ganho de peso pós - desmame (GPD), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) nos bezerros, obtidos através da avaliação genética, sendo que o BV é obtido multiplicando-se a DEP por 2; todos os resultados obtidos através das DEP são valores genéticos aditivos;
- ◆ Desempenho em confinamento: peso inicial (PINI), peso final (PFIM), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg (D450) e ganho de peso médio diário (GPMD);
- ◆ Nas vacas foram obtidos os resultados da avaliação genética para GND, GPD, BV CRP, BV GND e BV GPD.

3.2. Coleta de sangue

Foram coletados 2-4 ml de sangue de 633 bovinos, sendo 325 vacas e 308 bezerros recém-desmamados (Tabela 3), através de punção da veia jugular utilizando o sistema de coleta à vácuo, em tubos siliconizados e com 0,5 ml de citrato de sódio 0,129M tamponado (tubos Vacutainer® BD ref. 367704 e agulhas Vacutainer® BD ref. 367212-25*8). Após a coleta o material foi encaminhado para o Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde foi armazenado à -20°C ou mantido sob refrigeração 4-8°C. No último caso os tubos foram mantidos na posição vertical para permitir a sedimentação dos eritrócitos e leucócitos no mínimo 24-48 horas.

TABELA 3
Quantidade de animais amostrados e distribuição por touro

Raças*	Vacas		Bezerros	
	Nº famílias	Nº animais	Nº famílias	Nº animais
ANNE	0	0	1	35
LINE	2	41	1	36
SINE	4	114	3	121
NE	8	170	3	116
TOTAL	14	325	8	308

* ANNE - 0,5 angus x 0,5 nelore

LINE - 0,5 limousin x 0,5 nelore

SINE - 0,5 simental x 0,5 nelore

NE - nelore

3.3. Extração de DNA

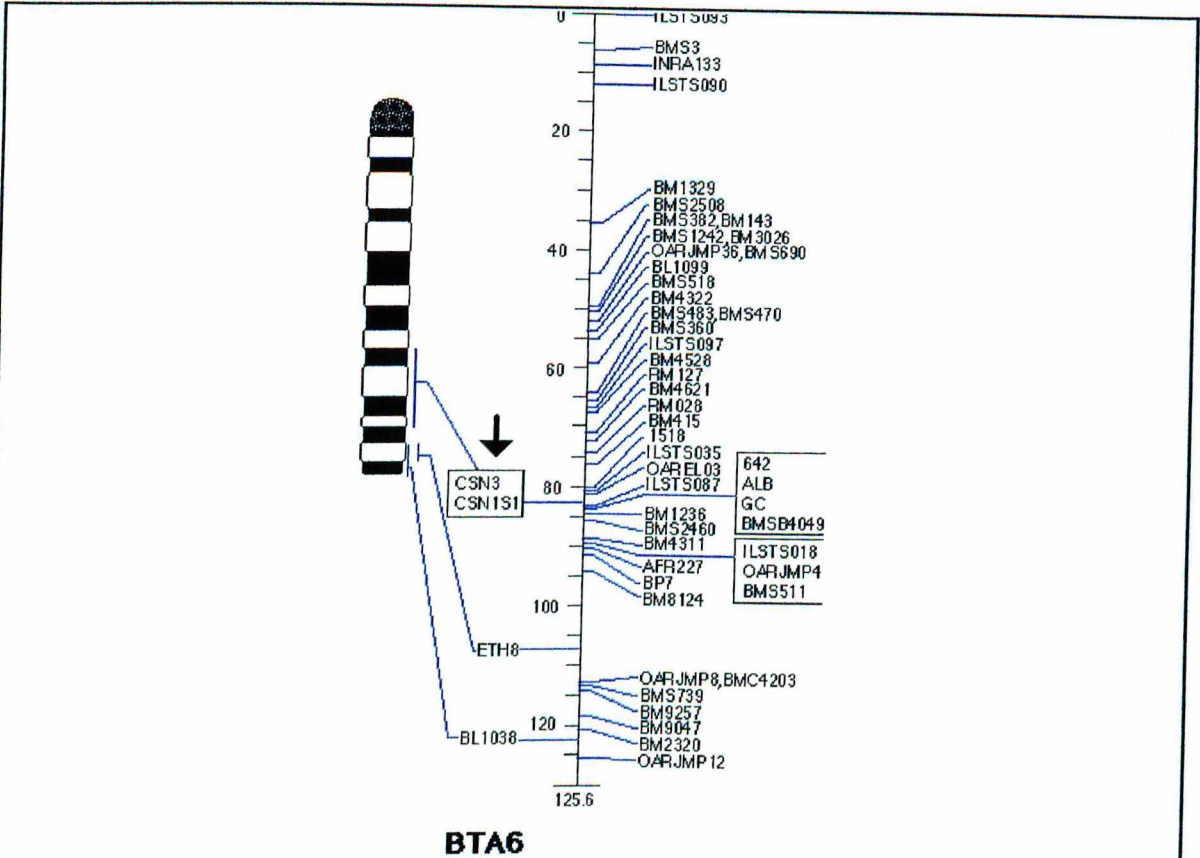
O DNA foi obtido à partir de 700 µl de sangue congelado ou 500 µl de sangue fresco (tomado na transição entre o plasma e eritrócitos, após sedimentação). Inicialmente o volume de sangue foi adicionado à um tubo de microcentrífuga de 2 ml, então adicionou-se o mesmo volume de tampão de

lise não diluído (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, pH 7,5, 640 mM de sacarose, 10 mM de MgCl₂ e 4% de Triton X-100), agitou-se lentamente e incubou-se em gelo por 5-10 minutos. Procedeu-se então uma primeira centrifugação à 4000 g por 1 minuto, seguida por 2 (sangue fresco) ou 3 (sangue congelado) lavagens com tampão de lise diluído 2X, intercaladas por 10-15 minutos de incubação no gelo. Após a obtenção de um "pellet" livre de hemoglobina adicionou-se 200 µl de 10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, sarcosyl 1% e 10 µl de proteinase K (10 mg/ml) e incubou-se durante a noite à 50°C. Acrescentou-se, então, 500 µl de 8 M guanidina-HCl e 0,49 M de acetato de amônia, agitou-se por 1-2 horas e adicionou-se 800 µl de isopropanol à temperatura ambiente, agitando suavemente até precipitar o DNA. Centrifugou-se então à 4000 g por 5-10 minutos, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se 2 lavagens do "pellet" de DNA (centrifugações à 4000 g 1-2 minutos) com isopropanol 60% ou etanol 70%, secou-se sob vácuo e diluiu-se em 0,5-1 ml de 10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA. Normalmente foi necessário 1-4 horas de incubação à 65°C para completa diluição do "pellet". Após a completa diluição do "pellet" de DNA sucedeu-se a quantificação por espectrofotometria à 260 nm e 280 nm para verificar a relação de DNA : proteína.

3.4. Genotipagem dos animais

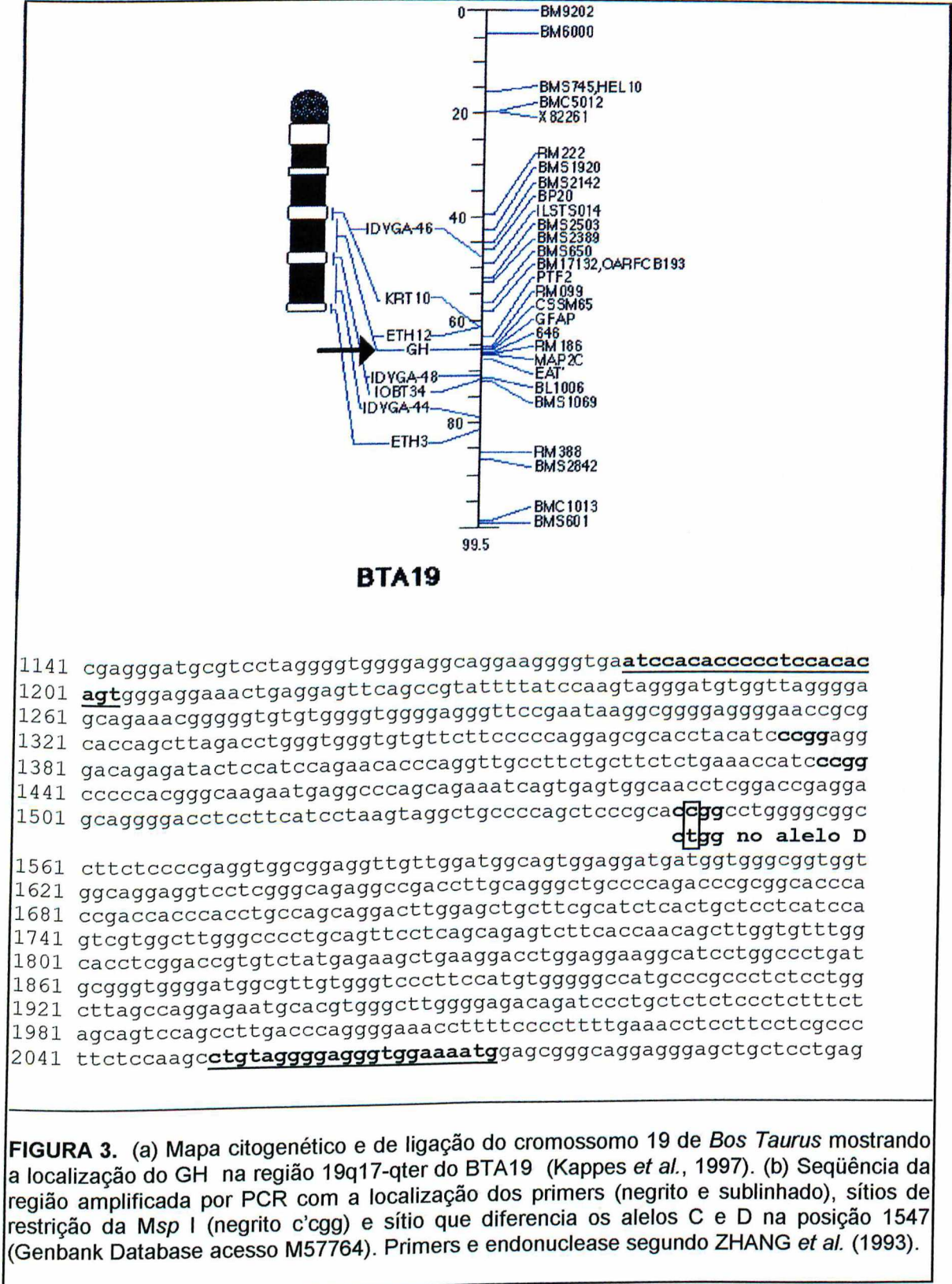
Genótipos foram determinados para CSN3 (MASOUDI *et al.*, 1994), LGB (FRIES, 1993) e GH (ZHANG *et al.*, 1993). A sequência das regiões amplificadas e sítios de restrição enzimática são mostradas nas FIGURAS 1, 2 e 3. Em resumo, 432 pb do exon IV da CSN3 foram amplificados (MASOUDI *et al.*, 1994), então genotipado por restrição com 2 U de *Taq* I ou *Hinf* I por 1 hora. A *Taq* I não tem sítio de restrição no alelo A, enquanto que a substituição de "C" por "T" na posição 5309 criou um sítio de restrição no alelo B, produzindo então 2 fragmentos (325 e 107 pb). Já a *Hinf* I corta o alelo A em 3 fragmentos (326, 68 e 38 pb), enquanto que uma substituição de "A" por "C" na

posição 5345 causa a perda de um sítio de restrição para a *Hinf* I, gerando então apenas 2 fragmentos no alelo B (394 e 38).



4981 ccaattcagtatgtgctgagtaggtatcctagttatggactcaattactaccaacagaaa
5041 ccagttgcactaattaataatcaattttctgccatacccatattatgcaaagccagctgca
5101 gttaggtcacctgccccaaattcttcaatggcaagttttgtcaaatactgtgcctgccaag
5161 tcctgccaagcccagccaaactaccatggcacgtcacccacacccacatttatcatttatg
5221 gccattccaccaaagaaaaatcaggataaaaacagaaatccctaccatcaataccattgct
5281 agtgggtgagcctacaagtacacctacca**tcga** no alelo B
5341 gaagattctccagaagttattgagagcccacctgagatcaacacagttccaagttacttca
gcttc no alelo B
5401 actgcagtctaaaaaactctaaggagacatcaaagaagacaacgcaggtaaataaggcaaa

FIGURA 1. (a) Mapa citogenético e de ligação do cromossomo 6 de *Bos Taurus* mostrando a localização da CSN3 (seta) na região 6q26-33 do BTA6 (KAPPES *et al.*, 1997). (b) Sequência da região amplificada por PCR com os locais de mutação (quadros) e sítios de restrição das endonucleases *Taq* I (t'cga) e *Hinf* I (g'anc). Primers (sublinhados) e endonucleases (negrito) de acordo com MASOUDI *et al.* (1994) e sequência segundo "GenBank Database" acesso X14908.



Numa segunda triagem (Tabela 5) as concentrações de Mg, "primers", DNA e *Taq* foram testadas em 3 níveis, num total de 81 reações (3^4) sem repetições. O programa utilizado foi o seguinte: desnaturação inicial 94°C - 5' seguida por 34 ciclos de 94°C - 40", anelamento 58°C - 1', extensão 72°C - 40" e extensão final 72°C - 10'. Na reação para a CSN3, após estabelecidos os níveis adequados de reagentes, testou-se ainda a diminuição dos tempos de desnaturação para 20" e anelamento para 30", o efeito do número de ciclos 26, 28, 30 e as seguintes temperaturas de anelamento: 58, 60 e 62°C.

TABELA 5
Otimização da PCR para CSN3.

Reagentes	Níveis		
MgCl ₂ (mM)	1	2	3
DNA (ng)	10	30	50
Primers (pmol)	2	4	6
dNTPs (nmol)	5	5	5
<i>Taq</i> Pol. (U)	0,25	0,5	0,75
Vol (microlitros)	25	25	25

A otimização da reação de PCR para LGB seguiu-se após uma triagem inicial onde foi amplificada sob desnaturação inicial de 94°C - 5', seguidos por 35 ciclos à 94°C - 40", 60°C - 40" e 72°C - 30" mais extensão final de 5', utilizando 50 ng de DNA molde, 5 nmoles de dNTPs, 5 nmoles de "primers", 1,5 mM de MgCl₂ e 0,75 U de *Taq* polimerase em 25 µl. Em seguida utilizou-se um novo programa, sendo, desnaturação inicial 94°C - 5', 5 ciclos 95°C - 20", 60°C - 10" e 75°C - 40"; 10 ciclos 95°C - 20", 60°C - 10", subtraindo-se 0,5 "/ciclo e 75°C - 40"; 20 ciclos 95°C - 10", 55°C - 10", adicionando-se 1"/ciclo, 75°C - 40" aumentando 1"/ciclo, extensão final 75°C - 5', 3 níveis de MgCl₂ e 2 níveis de "primers", conforme mostrado na Tabela 6.

TABELA 6
Otimização da PCR para LGB.

Reagentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MgCl2 (mM)	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
Primers (pmol)	3	3	6	6	3	3	6	6	3	3	6	6
dNTPs (nmol)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Taq Pol. (U)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
DNA (ng)	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Vol (microlitros)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

A reação de otimização do GH é mostrado na TABELA 7, onde testou-se 2 níveis de “primers”, 2 de *Taq* e 3 de DNA, sob 94°C 10’ de desnaturação inicial, seguido por 34 ciclos à 94°C 1’, 60°C 1’, 72°C 1’ e 72°C 10’ de extensão final.

TABELA 7
Otimização da PCR para o GH.

Reagentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MgCl2 (mM)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Primers (pmol)	8	8	8	4	4	4	4	4	4	8	8	8
dNTPs (nmol)	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Taq Pol. (U)	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
DNA (ng)	200	100	50	200	100	50	200	100	50	200	100	50
Vol (microlitros)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

3.5. Eletroforese e detecção dos produtos amplificados

Após a realização da PCR e digestão enzimática, 2 µl de um corante de carregamento (0,125% “bromophenol blue”, 0,125% “xylene cyanole” e 12,5% ficoll 400 ou 50% glicerol) foram adicionados à 10 µl do produto da restrição, então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose, conforme descrito adiante. A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada conforme recomendado por SAMBROOK *et al.* (1989). A concentração dos géis variou de acordo com o fragmento a ser analisado (Tabelas 8 e 9). Para a CSN3 os resultados foram resolvidos em gel de poliacrilamida 7-8% ou

agarose 3%, enquanto que a LGB foi analisada em gel de poliacrilamida 12% ou agarose 4%. Somente o GH foi analisado exclusivamente em gel de agarose 2 %. A eletroforese dos géis de poliacrilamida se deu em tampão 89 mM Tris-Borato, 2 mM de EDTA pH 8,5 (TBE 1 x), enquanto que a eletroforese nos géis agarose foi em TBE 0.5 x. A voltagem variou entre 100 e 150 V (4-6 V/cm) até que o corante azul de bromofenol chegasse ao fim do gel.

Após eletroforese, a detecção dos fragmentos se deu por coloração pela prata ou brometo de etídio. No primeiro caso, o gel foi corado de acordo com BUDOWLE *et al.* (1991) com algumas modificações. Inicialmente, o gel foi (1) fixado em solução de etanol 10% por 10 min, (2) oxidado em ácido nítrico 1% por 6 min, (3) lavado com água destilada 2 vezes, (4) emergido em solução à 0,012 M de nitrato de prata e 0,056 % de formalina por 20 min, (5) revelado com solução gelada (8°C) 0,28 M de carbonato de sódio anidro, 0,056 % de formalina e 4 µM de tiosulfato de sódio até que adequada imagem foi alcançada, (6) a redução foi terminada com 10% de ácido acético glacial gelado, então (7) o gel foi secado entre folhas de celofane. A revelação dos géis de agarose foi em 0,5 µg/ml de brometo de etídio por 30 min e fotografados sob UV.

TABELA 8
Grau de separação de DNA em gel de acrilamida. *

Acrilamida %	Separação pares bases	Taxa migração	
		Xylene Cyanole ¹	Bromophenol Blue ²
3,5	1000-2000	460	100
5	80-500	260	65
6	73-467	227	58
7	67-433	193	52
8	60-400	160	45
9	55-350	138	39
10	50-300	115	33
11	45-250	93	26
12	40-200	70	20
13	35-183	67	18
14	10-167	63	17
15	25-150	60	15
16	21-140	57	14
17	17-130	54	14
18	14-120	51	13
19	10-110	48	13
20	6-100	45	12

* Modificado de SAMBROOK *et al.* 1989

^{1,2} Corresponde ao nº de pb de DNA que o corante migra.

TABELA 9
Grau de separação de
DNA em gel de agarose.

% Agarose	Kb
0,3	5-60
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7
1,2	0,4-6
1,5	0,2-3
2	0,1-2

* Adaptado de SAMBROOK et al.1989.

3.6. Análise Estatística

3.6.1. Frequências alélicas

As análises das frequências alélicas foram realizadas por intermédio do programa computacional GENES IN POPULATIONS de MAY *et al.* (1995). Calculou-se as frequências genótípicas, gênicas e heterozigose para todos os animais genotipados, incluindo SINE e ANNE, que não entraram na análise de associação entre os marcadores e as características quantitativas. O Teste de χ^2 foi utilizado para verificar desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg que poderia ser gerado pelo cruzamento e ainda testar se o rebanho Nelore estava em equilíbrio. Assumiu-se que nenhuma seleção foi praticada para os marcadores e os acasalamentos foram ao acaso (sem o conhecimento do genótipo).

3.6.2. Associação dos marcadores com características quantitativas

Por meio da avaliação genética, obteve-se os valores do GND e GPD dos bezerros, ajustados dentro de cada grupo contemporâneo. No caso das vacas, o GND e GPD representam a média dos produtos da vaca, também ajustados para os efeitos conhecidos. Os valores das DEPs obtidos foram multiplicados por 2, para expressar o valor genético (BV) do indivíduo e ainda adicionada uma constante (médias do GND e GPD da população no ano da avaliação - 166,0888 kg e 61,2987, respectivamente). Nas análises foram

excluídos os bezerros ANNE e LINE e vacas LINE, pois havia apenas uma família de meio - irmãos para aqueles cruzamentos. Foram retirados ainda animais com erro de identificação paterna. As análises foram realizadas usando o procedimento "General Linear Models" do SAS (1992).

Os testes estatísticos utilizados para verificar o efeito dos genótipos sobre as características quantitativas foram baseados em ROCHA *et al.* (1992), MOODY *et al.* (1996) e SOLLER & GENIZI (1978). Basicamente dois modelos foram utilizados sendo que um deles, mais comumente usado, desconsidera a família na análise. O outro, utiliza uma análise dentro de cada touro (família), sendo o contraste realizado entre produtos de genótipos diferentes, mas agrupado dentro de cada família.

As associações entre marcadores e pesos ajustados (GND e GPD), em bezerros, foram testadas através dos seguintes modelos lineares fixos:

$$Y_{ijk} = \mu + GC_i + G_j + e_{ijk} \quad (1)$$

onde:

Y_{ijk} = peso ajustado do k^{th} bezerro pertencente ao i^{th} GC e possui o j^{th} genótipo;

μ = constante inerente à todas observações;

GC_i = efeito do i^{th} grupo contemporâneo ($i = 1, 2, \dots, 15$ no GND e $i = 1, 2, \dots, 12$);

G_j = efeito do j^{th} genótipo ($G = CSN3, LGB$ ou GH e $k = 1, 2, 3$);

e_{ijk} = resíduo aleatório, com distribuição normal.

$$Y_{ijkl} = \mu + GC_i + T_j + G_{k(j)} + e_{ijkl} \quad (2)$$

onde:

Y_{ijkl} = peso ajustado do l^{th} bezerro pertencente ao i^{th} GC, filho do j^{th} touro e possui o k^{th} genótipo agrupado dentro do j^{th} touro;

μ = constante inerente à todas observações;

GC_i = efeito do i^{th} grupo contemporâneo ($i = 1, 2, \dots, 13$);

T_j = efeito do j^{th} touro ($j = 6$)

G_k = efeito do k^{th} genótipo ($G = \text{CSN3, LGB ou GH}$ e $k = 1, 2, 3$), agrupado dentro do j^{th} touro;

e_{ijkl} = resíduo aleatório, normalmente distribuído.

Considerou-se que os pesos foram pré-corrigidos para os fatores fixos conhecidos, acima citados. Além da análise considerando todos os animais (cruzados e Nelore), analisou-se os dados também por raça.

O modelo para análise dos valores genéticos e PN em bezerros foi o seguinte:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij} \quad (3)$$

onde:

Y_{ij} = BV e PN do j^{th} bezerro com o i^{th} genótipo;

G_i = i^{th} genótipo ($G = \text{CSN3, LGB ou GH}$ e $i = 1, 2, 3$);

e_{ij} = erro aleatório.

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + G_{j(i)} + e_{ijk} \quad (4)$$

onde:

Y_{ijk} = BV e PN do k^{th} bezerro filho do i^{th} touro com j^{th} genótipo, agrupado dentro do i^{th} touro;

T_i = efeito do i^{th} touro ($i = 6$)

$G_{j(i)}$ = j^{th} genótipo ($G = \text{CSN3, LGB ou GH}$ e $i = 1, 2, 3$), agrupado dentro do i^{th} touro;

e_{ijk} = erro aleatório.

Os dados do confinamento foram analisados considerando dois modelos, sendo um incluindo peso inicial como covariável para as demais características, raça e genótipo como efeitos fixos. O outro considerou peso inicial como covariável, touro e genótipo agrupado dentro de touro como efeitos fixos. Nesse caso não adotou-se o efeito da raça pois se confunde com o efeito do touro.

As características quantitativas das vacas foram analisadas conforme os modelos (3) e (4), considerando os efeitos de touro (pai da vaca) e genótipo agrupado dentro de touro.

Nos modelos (1) e (3) o contraste é realizado entre indivíduos portadores de genótipos diferentes, independente do touro ou família. Nesse caso comparações entre médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ("least square means") foram realizadas para estabelecimento das diferenças entre os genótipos. Utilizou-se o procedimento de Tukey-Kramer para comparação entre médias desbalanceadas, conforme STEEL *et al.* (1997). Os resultados foram expressos em médias ajustadas \pm coeficiente de confiança ($t_{0,025SY}$).

Nos modelos (2) e (4) o contraste é realizado entre indivíduos portadores de genótipos diferentes, mas dentro de família ou touro. Nesse caso quando um locus de efeito quantitativo estiver segregando em uma família, e o mesmo estiver ligado ao marcador, diferenças são detectadas entre a progênie que recebeu o alelo favorável e a que recebeu o alelo desfavorável. Assim, o teste de Tukey foi aplicado por touro, contrastando progênies com genótipos diferentes.

Além das análises acima citadas, verificou-se o efeito de substituição alélica, por meio de uma análise de regressão linear ("Regression Procedures" do SAS, 1992), na qual as variáveis dependentes foram os pesos e BV e os genótipos as variáveis independentes. Os genótipos foram codificados como 0 para AA ou CC, 1 para AB ou CD e 2 para BB ou DD.

O modelo utilizado foi o seguinte:

$$Y_i = a + bX_i + e_i \quad (5)$$

onde:

Y_i = variável dependente (pesos ou BV) do i^{th} indivíduo;

a = intercepto, significa a média do genótipo AA (CSN3 e LGB) ou

CC (GH);

b = coeficiente de regressão, estima o efeito médio de substituição alélica;

X_i = variável independente ou genótipo (0, 1, 2) do i^{th} indivíduo;

e_i = erro aleatório com média $E(e_i) = 0$, variância $\sigma^2(e_i) = \sigma^2$.

Decorre ainda do modelo (5) que o desvio de dominância (d) pode ser estimado como a diferença entre os valores observado e estimado do genótipo heterozigoto. Desvios de dominância são interações entre alelos ou interações dentro de locus. Quando não existe dominância ($d=0$), os genes atuam aditivamente, sendo chamados genes aditivos, entretanto se o alelo **B** for mais favorável **A** for dominante sobre o menos **B**, então $d > 0$ e se **B** for dominante sobre **A** $d < 0$ (FALCONER & MACKAY, 1996). O coeficiente de determinação (R^2) estima a porcentagem de variação da variável dependente que é explicada pelo genótipo (MOODY *et al.*, 1996).

O modelo de substituição alélica não pôde ser aplicado na CSN3 para bezerros, pois não havia número de observações suficientes do genótipo BB. O efeito de substituição alélica foi determinado por raça apenas para a LGB, já que os demais não possuíam número de observações suficientes por genótipo para proceder esse tipo de análise. Assumiu-se um mínimo de 3 observações por genótipo para utilização desse modelo. No caso do GND e GPD em bezerros utilizou-se as observações apenas dos bezerros que foram engordados em confinamento ($n = 172$), para evitar erros devido à diferentes grupos de manejo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração de DNA

O protocolo de extração utilizado permitiu a obtenção de DNA bastante puro, com relação entre absorvâncias 260 e 280 nm acima de 1,7 que é normalmente requerido como DNA livre de contaminação com proteína (SAMBROOK *et al.*, 1989). A pureza do DNA obtido de sangue fresco (Tabela 10) foi maior do que o DNA extraído de sangue congelado (Tabela 11). Tal fato é explicado pela dificuldade de extração da hemoglobina quando as hemácias são rompidas através do congelamento.

Apesar da menor pureza do DNA extraído de sangue congelado, ainda foi maior do que normalmente se consegue pelo método de extração com fenol : clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989). A qualidade do DNA pode ser comprovada pelo sucesso na amplificação de fragmentos de maior peso molecular (891 pb). Tem-se discutido que o insucesso na amplificação de fragmentos longos se dá pela fragmentação do DNA que ocorre durante o processo de extração ou devido ao armazenamento (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995). Nesses casos sugere-se proceder nova extração ou aumentar a quantidade de DNA na reação, o que pode ocasionar a produção de fragmentos inespecíficos devido ao anelamento dos "primers" nas extremidades íntegras de fitas moldes fragmentadas, conforme observou-se em alguns casos (dados não apresentados).

TABELA 10
Produção e qualidade do DNA obtido de sangue fresco.

#	AB ₂₆₀	AB ₂₈₀	AB ₂₆₀ /AB ₂₈₀	[DNA] ng/ul
1	0,123	0,042	2,93	246
2	0,107	0,034	3,15	214
3	0,102	0,032	3,19	204
4	0,159	0,046	3,46	318
5	0,112	0,039	2,87	224
6	0,173	0,062	2,79	346
7	0,050	0,015	3,33	100
8	0,108	0,038	2,84	216
9	0,102	0,035	2,91	204
10	0,069	0,022	3,14	138
11	0,118	0,039	3,03	236
12	0,122	0,055	2,22	244
13	0,089	0,031	2,87	178
14	0,072	0,023	3,13	144
15	0,144	0,052	2,77	288
16	0,063	0,024	2,63	126
17	0,058	0,026	2,23	116
18	0,074	0,029	2,55	148
19	0,151	0,055	2,75	302
20	0,093	0,030	3,10	186
21	0,059	0,022	2,68	118
22	0,148	0,048	3,08	296
23	0,184	0,062	2,97	368
24	0,123	0,033	3,73	246
25	0,109	0,035	3,11	218
26	0,044	0,013	3,38	88
27	0,123	0,042	2,93	246
28	0,112	0,037	3,03	224
29	0,101	0,034	2,97	202
30	0,066	0,019	3,47	132
				210,53
Média	0,105	0,036	2,97	73,30
Desvio	0,037	0,013	0,33	

TABELA 11
Produção e qualidade do DNA obtido de sangue congelado.

#	AB ₂₆₀	AB ₂₈₀	AB ₂₆₀ /AB ₂₈₀	[DNA] ng/ul
1	0,267	0,149	1,79	534
2	0,170	0,101	1,68	340
3	0,081	0,044	1,84	162
4	0,163	0,091	1,79	326
5	0,021	0,011	1,91	42
6	0,070	0,039	1,79	140
7	0,249	0,133	1,87	498
8	0,114	0,062	1,84	228
9	0,197	0,107	1,84	394
10	0,158	0,090	1,76	316
11	0,053	0,032	1,66	106
12	0,153	0,086	1,78	306
13	0,230	0,127	1,81	460
14	0,247	0,130	1,90	494
15	0,119	0,067	1,78	238
16	0,191	0,108	1,77	382
17	0,096	0,054	1,78	192
18	0,139	0,076	1,83	278
19	0,137	0,077	1,78	274
20	0,061	0,031	1,97	122
21	0,073	0,045	1,62	146
22	0,171	0,096	1,78	342
23	0,156	0,090	1,73	312
24	0,166	0,093	1,78	332
25	0,062	0,033	1,88	124
26	0,158	0,087	1,82	316
27	0,269	0,145	1,86	538
28	0,138	0,074	1,86	276
29	0,116	0,061	1,90	232
30	0,104	0,053	1,97	208
Média	0,144	0,080	1,81	288,60
Desvio	0,066	0,036	0,08	131,57

4.2. Otimização das reações de amplificação e genotipagem dos animais

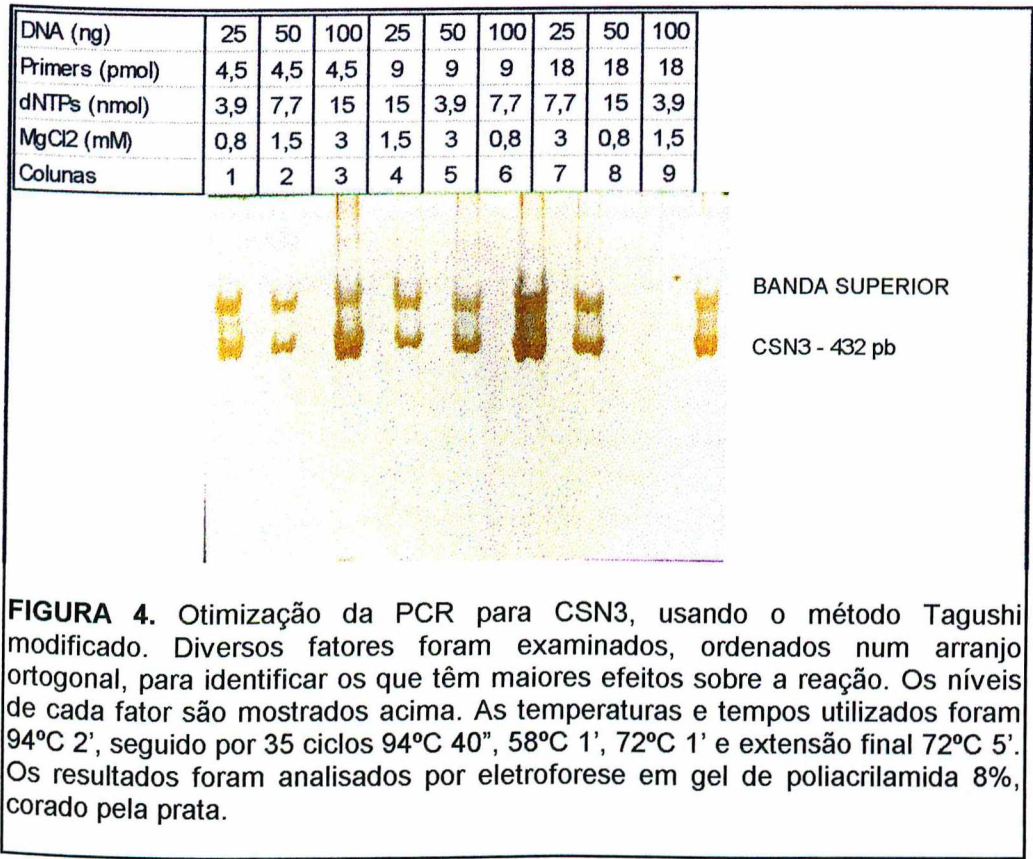
4.2.1. Otimização da PCR para amplificação da CSN3

A otimização da reação de PCR para a CSN3 é mostrada nas Figuras 4, 5 e 6. A otimização da PCR para CSN3 seguiu diversos procedimentos para estabelecimento dos componentes principais da reação de

otimização. No método Taguchi (Figura 4) o aparecimento de 2 bandas dificultou a análise dos resultados. A banda inferior corresponde ao fragmento alvo, enquanto que a superior, provavelmente, foi produto de amplificação à partir da primeira. A diminuição dos tempos de desnaturação para 20", anelamento 30" e extensão 40" foram suficientes para reduzir o aparecimento da banda superior, como será mostrado adiante. Através do método Taguchi é possível determinar os níveis ótimos de cada reagente através de uma análise de regressão (COBB & CLARKSON, 1994), desde que a intensidade das bandas possa ser obtida por densitometria, o que não foi possível nesse trabalho.

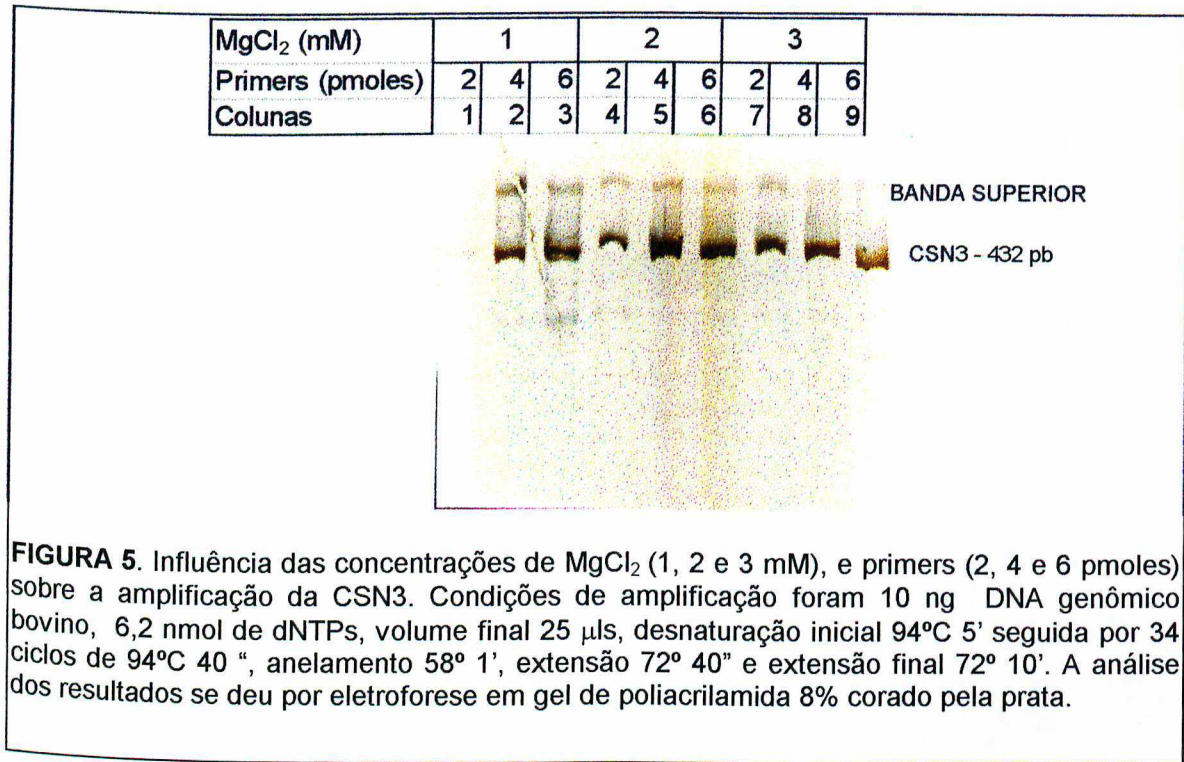
Observa-se que a quantidade de DNA molde foi determinante sobre a produtividade da reação, onde 100 ng proporcionou maior rendimento. Tal rendimento se deve ao elevado número de cópias iniciais (6,67 pg/genoma => 100 ng = 60.000 cópias). Ademais, houve interação entre quantidade de "primers" e intensidade da banda superior, onde maiores quantidades ocasionaram uma maior produção daquela banda. O aumento da quantidade de dNTPs diminuiu a produtividade quando os níveis de $MgCl_2$ foram baixos, exceto quando o nível de DNA foi 100 ng. Quando o nível de $MgCl_2$ foi 0,75 mM (18,75 nmoles) não ocorreu amplificação ao nível de 15,4 nmoles de dNTPs. Já quando o nível de dNTPs foi de 3,85 nmoles houve amplificação mesmo com baixo nível de $MgCl_2$ (0,75 mM ou 18,75 nmoles), enquanto que o contrário (3 mM de $MgCl_2$ - 75 nmoles - e 3,85 nmoles de dNTPs) produziu amplificação adequada. Isto mostra claramente a interação entre dNTPs e $MgCl_2$, conforme reportado por vários autores (ROUX, 1995; COBB & CLARKSON, 1994; RASMUSSEN & REED, 1992). Portanto, mais importante do que a concentração de $MgCl_2$ é a disponibilidade deste na reação, devendo-se levar em consideração a quantidade de dNTPs. Tal fato é explicado pela necessidade de $MgCl_2$ disponível para a *Taq* polimerase e ainda cada dNTP liga um íon de Mg. Assim, em baixos níveis de $MgCl_2$ e altos níveis de dNTPs ocorre ligação de todo o Mg tornando-o indisponível para a *Taq*. A queda da atividade da *Taq* polimerase, em menores concentrações de

MgCl₂, pode ser compensada pelo aumento do número de cópias iniciais (DNA molde), conforme observado quando a concentração de MgCl₂ foi 0,75 mM e 100 ng de DNA molde.



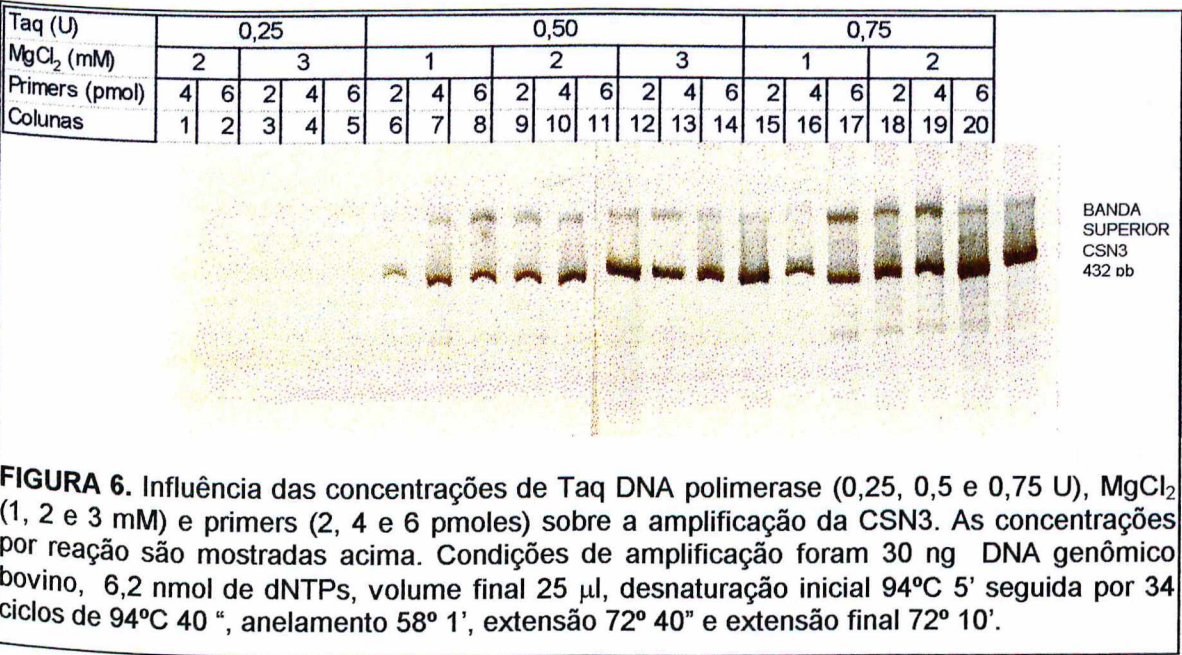
Na Figura 5 verificou-se que sob menores concentrações de MgCl₂ a quantidade de “primers” poderá interferir mais significativamente sobre a produtividade da reação. Observou-se uma diminuição do produto amplificado quando as concentrações de MgCl₂ foram 1 e 2 mM e a quantidade de “primers” 2 pmoles, ou seja com 3 mM de MgCl₂ não ocorreram diferenças visualmente detectáveis com relação à quantidade de “primers”. O MgCl₂ estabiliza as ligações fracas (RASMUSSEN & REED, 1992), então sob menores concentrações de Mg, na temperatura de anelamento usada, parte da ligação “primer”-DNA molde foi rompida, antes mesmo de ocorrer a extensão do fragmento. Portanto, considerando o maior custo dos “primers” a diminuição da concentração deles e aumento do MgCl₂ podem diminuir o custo da reação,

sem diminuição da sensibilidade e especificidade. Quando optar-se por uma menor concentração de “primers” e a produção for baixa o aumento do MgCl₂ e/ou diminuição da temperatura de anelamento poderá melhorar a produtividade da reação. Não obstante, a interação “primer” - DNA molde, o MgCl₂ pode variar de acordo com a estrutura da região à ser amplificada e dos “primers” (RASMUSSEN & REED, 1992).



Observou-se que 0,25 U de *Taq* polimerase não produziu amplificação detectável, enquanto que 0,5 U e 0,75 U propiciaram uma produtividade satisfatória (Figura 6). Em reações de menor volume (25 µl ou menos), a quantidade de *Taq* polimerase pode ser reduzida em relação às quantidades-padrão recomendadas, já que a enzima tem-se mostrado bastante produtiva e rápida durante a polimerização (INNIS *et al.*, 1988). O aumento da quantidade de *Taq* polimerase contribuiu para aumento de produtos indesejáveis, mesmo quando a variação em unidade foi relativamente pequena (0,25 U). Esse resultado está de acordo com as observações de SAIKI *et al.*

(1988), utilizando 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 8 U de *Taq* polimerase. Naquele caso o tempo de extensão maior também aumentou sobremaneira produtos inespecíficos de alto peso molecular. Conforme também observado na Figura 3, o produto amplificado diminuiu quando utilizou-se 2 pmoles de “primers” e 1 mM de $MgCl_2$, entretanto houve aumento da especificidade, conforme sugerido por outros autores, que recomendam a diminuição de Mg na reação visando aumento da especificidade (ROUX, 1995; RASMUSSEN & REED, 1992). Portanto, aumentos na quantidade de *Taq* polimerase podem ser da ordem de 0,25 U quando se deseja obter níveis ótimos de produção e especificidade. O aumento da quantidade de *Taq* polimerase contribuiu para diminuição de especificidade aumentando produtos indesejáveis. Entretanto, esse problema pode ser minimizado com a redução do número de ciclos de amplificação, diminuição da quantidade de “primers” e aumento da temperatura de anelamento (SAIKI *et al.*, 1988; BELL & DEMARINI, 1991; RASMUSSEN & REED, 1992; ROUX, 1995).



Na Figura 7 o aumento de “primers” na reação promoveu um aumento da produção, entretando diminuição da especificidade. Não obstante, o grau de perda de especificidade pode variar de acordo com a sensibilidade

do método de detecção, ou seja, a coloração pela prata pode mostrar produtos que normalmente não seriam vistos no brometo de etídio (ALLEN *et al.*, 1989). Portanto, a quantidade de “*primers*” a utilizar dependerá muito do método de detecção que será utilizado, em que o aumento da sensibilidade promoverá um aparecimento de produtos não desejáveis que podem trazer erros de interpretações, principalmente quando se trata de amplificação de regiões repetitivas ou com deleção, onde o número de bases do produto amplificado é muito variável. Outras quantidades de “*primers*” testadas (10, 20 e 30 pmoles por reação) sob as mesmas condições não trouxeram benefício na produtividade e pioraram a especificidade. Outros trabalhos têm sugerido que o excesso de ciclos pode converter o produto da PCR em fragmentos de maior peso molecular. Tal fato tem sido explicado pela baixa temperatura de anelamento ou a quantidade inadequada de “*primers*” após 30 ciclos, favorecendo o anelamento da extremidade 3'-OH do produto nele próprio ou no DNA molde, sendo então estendidos produzindo fragmentos de maior peso molecular que o alvo. O aumento dos “*primers*” aumenta a disponibilidade dos mesmos após 30 ciclos evitando a formação daqueles produtos (BELL & DEMARINI, 1991). Neste caso, o aumento da concentração de “*primers*” não diminuiu o aparecimento da banda de maior peso molecular, portanto, a quantidade deles não foi limitante para amplificação do alvo até 35 ciclos. Não obstante, o aumento da temperatura de anelamento melhorou a especificidade em detrimento da produtividade.

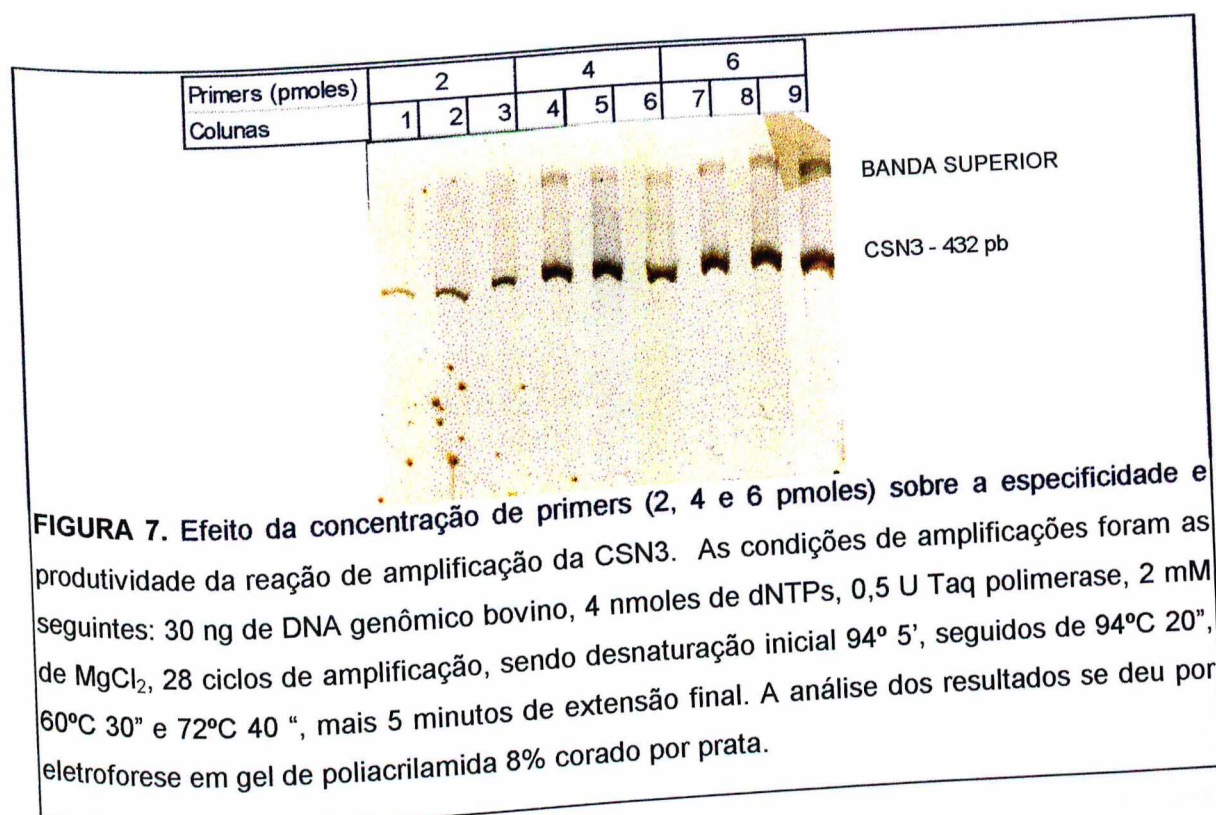
Para verificar se o aparecimento da banda superior foi ocasionado pelo excesso de ciclos testou-se 3 temperaturas de anelamento (58, 60 e 62 °C) sob 26, 28 e 30 ciclos e observou-se que mesmo com 26 ciclos, independentemente da temperatura de anelamento, houve aparecimento da banda indesejável. Nesse caso, utilizou-se um programa de amplificação com 40” de desnaturação, 1’ de anelamento e 40” de extensão. Portanto, a origem daquele produto não foi decorrente da diminuição de especificidade por aumento do número de ciclos, mas sim de condições de reação que favoreceram o aparecimento precoce de produtos indesejáveis que são

amplificados concomitantes ao alvo, diminuindo a especificidade da reação. WITTWER *et al.* (1990) mostraram que o anelamento e desnaturação ocorrem quase que instantaneamente, uma vez que a amostra alcance a temperatura apropriada. O anelamento dos “*primers*” ocorre rapidamente devido às altas concentrações usadas na amplificação. Para se ter idéia, 10 pmoles de “*primers*” equivalem a $6,02 \times 10^{12}$ moléculas, enquanto que o número de cópias iniciais do alvo é igual à 15000 moléculas (50 ng de DNA). WITTWER *et al.* (1990) e WITTWER & GARLING (1991) mostraram que tempos menores de anelamento e desnaturação produzem boa amplificação, enquanto que a temperatura de extensão é limitante, pois depende da velocidade de extensão da *Taq* polimerase e tamanho do fragmento a ser estendido. Os mesmos autores ainda evidenciaram que a velocidade de subida da temperatura do anelamento para extensão era fundamental. Quanto mais lento chegar na temperatura de extensão, maior é a quantidade de produto gerado à partir dos “*primers*”, principalmente se os mesmos foram desenhados sem observar os cuidados para evitar a formação de produtos originados do anelamento dos “*primers*” entre si. Em certos casos a ineficiência da amplificação é tão grande que o alvo não é amplificado, enquanto que fragmentos de baixo peso molecular, originados dos “*primers*” (“*dimeros*”) são produzidos em grande quantidade. Apesar desses trabalhos terem sido conduzidos em termociclador de ciclo rápido (baseado na transferência de calor através de ar quente), trouxe vários subsídios para otimização das reações de PCR usando o sistema de aquecimento por bloco (“*peltier*”).

Após testadas todas essas variáveis sem sucesso, e baseado nos resultados com amplificação de ciclo rápido partiu-se para a diminuição do tempo de desnaturação para 20” e anelamento para 30”. Neste caso obteve-se êxito pelo desaparecimento do produto indesejável. Como tal fragmento era maior assumiu-se que a diminuição do tempo de desnaturação iria desfavorecer fragmentos maiores, que associado ao menor tempo de anelamento e menores concentrações de “*primers*” promoveria uma diminuição do produto indesejável, aumentando assim a especificidade da reação. BELL &

DEMARINI (1991) mostraram que o aumento dos "primers" ou o aumento da temperatura de anelamento propiciou o desaparecimento daqueles produtos, entretanto não foram obtidos os mesmos efeitos, mostrando que a cinética de cada reação de amplificação é diferente, mesmo porque aqueles autores utilizaram volume de reação de 100 μ l sob duas concentrações de "primers" 50 e 100 pmoles, o que difere das condições utilizadas neste experimento.

Após a conclusão desses experimentos chegou-se às condições que permitiram uma produtividade e especificidade adequada para amplificação e genotipagem da CSN3, sob a coloração pela prata em gel de poliácridamida ou brometo de etídio em gel de agarose. A quantidade dos reagentes utilizadas foram as seguintes: 50 ng de DNA molde, 1 mM de $MgCl_2$, 5 pmoles de dNTPs, 3 pmoles de cada "primer" e 0,75 U de *Taq* polimerase sob 94°C de desnaturação inicial por 5', seguidos de 94°C 20", 60°C 30" e 72°C 40 ", mais 5 minutos de extensão final.



4.2.2.Otimização da PCR para amplificação da LGB

A Figura 8 mostra o resultado de uma reação de amplificação da LGB, utilizando concentrações próximas ao padrão na tentativa de otimização. Não obstante, pode-se observar que o rendimento da reação foi prejudicado pela produção de fragmentos menores que 40-60 pb. Tais fragmentos são formados à partir dos “primers”, que preferencialmente se amplificam ao longo dos ciclos devido ao menor tamanho que o alvo (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995). Tais fragmentos podem dificultar a interpretação dos resultados, principalmente quando o alvo produz fragmentos de tamanho próximo aos artefatos. Além disso a sensibilidade da reação é reduzida, pois fragmentos curtos são preferencialmente amplificados desviando reagentes para eles e diminuindo a amplificação do alvo. Alterações do programa termocíclico, como também concentrações de reagentes podem resolver esse tipo de amplificação indesejável.

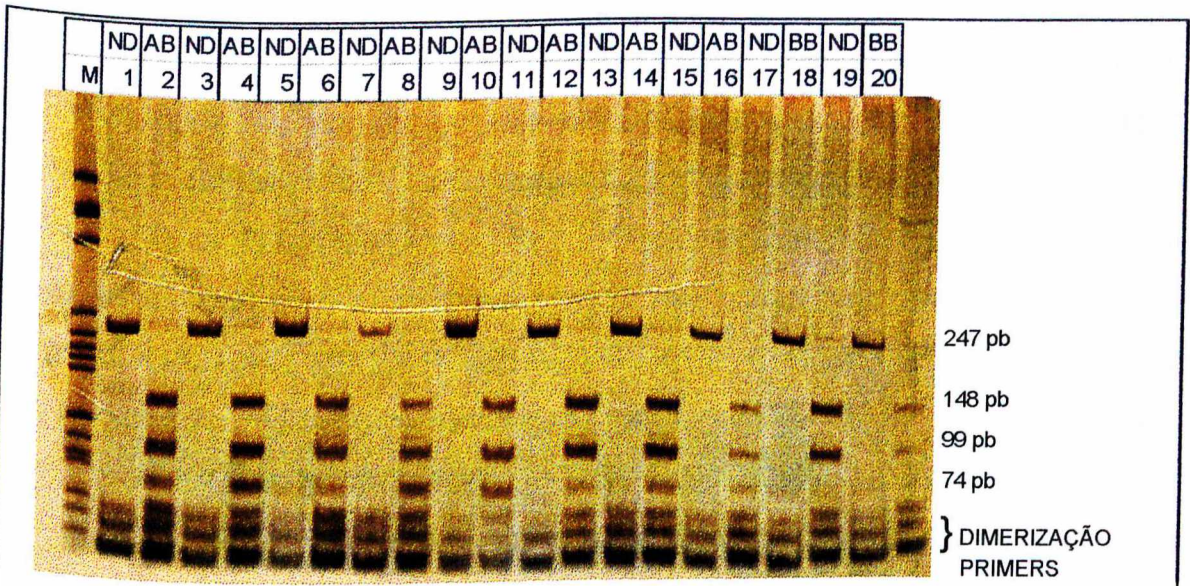


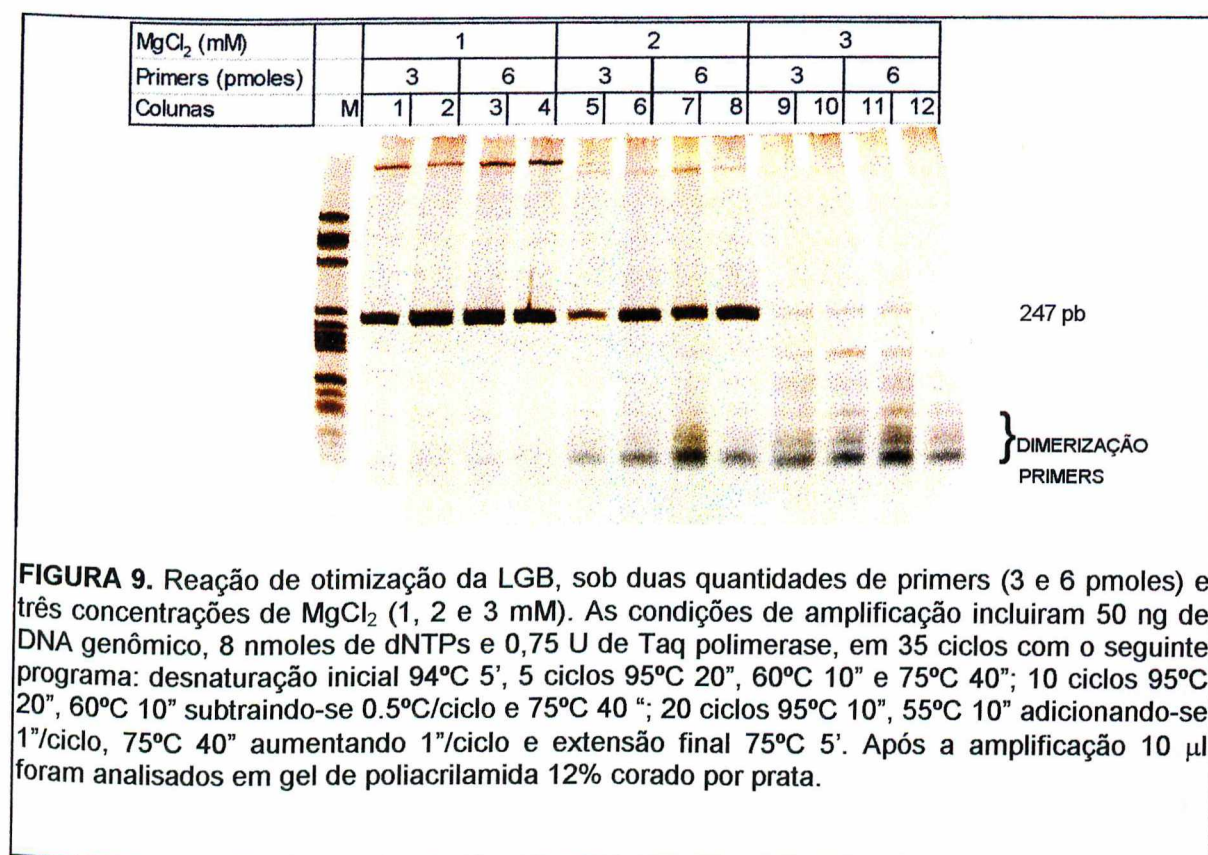
FIGURA 8. Exemplo da PCR não otimizada. Nesse caso o alvo, a LGB, foi amplificada sob desnaturação inicial de 94 °C 5', seguidos por 35 ciclos à 94 °C 40", 60 °C 40" e 72 °C 30" mais extensão final de 5', utilizando 50 ng de DNA molde, 5 nmoles de dNTPs, 5 nmoles de primers, 1,5 mM de MgCl₂ e 0,75 U de Taq polimerase em 25 µls. Após a amplificação 10 µl do produto foi sujeito à digestão enzimática 1 hora com 2 U de Hae III e analisado eletroforéticamente num gel de poliacrilamida 12%. Observe que a dimerização de primers chega a dificultar a interpretação dos resultados, onde o menor fragmento de restrição enzimática (74 pb) quase se confunde como maior fragmento de dimerização.

Conforme observado na Figura 9, a concentração de $MgCl_2$ considerada padrão pode trazer resultados insatisfatórios, especialmente porque a pureza do DNA obtido (Tabelas 10 e 11) foi superior ao comumente citado (SAMBROOK *et al.*, 1989). Quando a pureza do DNA não é satisfatória parte do $MgCl_2$ é ligado à proteínas que o tornam indisponível na reação. À medida que aumentou-se a concentração de $MgCl_2$ houve uma redução da produção do alvo, aparecendo fragmentos menores derivados de “primers” (“dímeros” e “harpin”), que sendo preferencialmente amplificados impossibilitam a produção do alvo. Isto se deve à estabilização de estruturas curtas, oriundas de oligonucleotídeos iniciadores, pelo excesso de $MgCl_2$ na reação, onde o aumento da temperatura de anelamento e extensão não são capazes de romper essas estruturas que serão então amplificadas (RASMUSSEN & REED, 1992). Mesmo com 6 pmoles de “primers” ocorreu alta incorporação no alvo, portanto a formação daquelas estruturas não foi devido ao excesso de “primers”; contudo outros fatores, principalmente o Mg, estavam favorecendo a formação daqueles produtos. Excesso de $MgCl_2$ favorece a estabilização das pontes de hidrogênio formadas durante o processo de anelamento (COBB & CLARKSON, 1994), portanto, supõem-se que o aumento da temperatura de extensão de 72 para 75°C associado à baixa concentração de $MgCl_2$, alta temperatura e tempo rápido de anelamentos reduziram a formação de produtos derivados de “primers”. O aumento da temperatura de extensão não prejudica a produtividade da *Taq* polimerase conforme mostrado por RASMUSSEN & REED (1992) e WITTEWER & GARLING (1991), onde a *Taq* polimerase manteve a velocidade de extensão de 100 nucleotídeos / segundo desde 70 a 80°C.

A utilização de programas de amplificação demorados muitas vezes não se justifica, principalmente quando se trata de fragmentos curtos (abaixo de 500 pb). Conforme observado, ótimo nível de amplificação foi alcançado com tempos curtos de desnaturação e anelamento, enquanto que o aumento da extensão se deve ao fato da perda progressiva de atividade da *Taq* polimerase e aumento do número de cópias à ser estendido durante os ciclos

(RASMUSSEN & REED, 1992). Quando determinado nível de amplificação é alcançado, ocorre acúmulo de excesso de substrato que a quantidade de enzima presente torna incapaz de estender por completo no tempo normalmente permitido (SAIKI *et al.*, 1988). O programa utilizado para amplificação da LGB teve duração de 01:41:16 enquanto normalmente os programas gastam acima de 2:30 horas. Isto permite melhor aproveitamento do termociclador proporcionando diminuição do custo da reação pelo aumento da utilização do aparelho, conforme discutido por WITTWER *et al.* (1990) e WITTWER & GARLING (1991). RYCHLIK *et al.* (1990), sugeriram a utilização de diferentes temperaturas de anelamento durante a amplificação, para fragmentos menores que 1 Kb. A utilização de temperatura de anelamento inicial abaixo da ótima, seguida por aumento sucessivo ao longo dos ciclos mostrou-se mais eficiente para amplificação do produtos de fragmentos menores que 1 Kb. Entretanto, utilizou-se temperatura de anelamento inicial mais alta e tempo rápido, para evitar o aparecimento de produtos derivados de "primers", no início da reação e diminuiu-se a temperatura de anelamento durante os ciclos sucessivos. Isto indica que o aparecimento desses produtos apareceram precocemente na reação, sendo então preferencialmente amplificados nos ciclos finais, quando a concentração dos reagentes e acúmulo de produto amplificado limita a extensão de alvo, conforme também observado por SAIKI *et al.* (1988). Apesar do excelente resultado obtido, a utilização de temperatura de anelamento mais alta nos últimos ciclos pode melhorar a especificidade, onde a quantidade de "primers" tornar-se limitante, quando então a extremidade 3' -OH do produto de amplificação anela-se nele próprio ou ao DNA molde, favorecendo o aparecimento de fragmentos de peso molecular maior que o alvo (BELL & DEMARINI, 1991).

As condições ótimas para a amplificação da LGB foram estabelecidas como sendo 50 ng de DNA genômico, 1 mM de $MgCl_2$, 8 nmoles de dNTPs, 3 pmoles de "primers", 0,75 U de *Taq* polimerase, sob o programa citado abaixo (Figura 9).



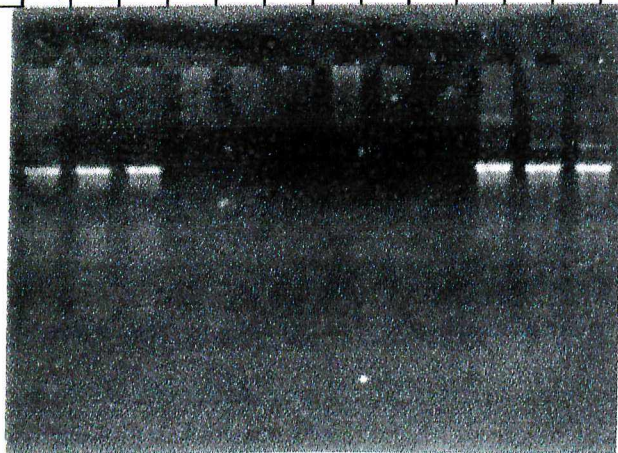
4.2.3. Otimização da PCR para GH

A otimização de reação para fragmentos de maior peso molecular requer alguns cuidados que nem sempre são necessários para fragmentos abaixo de 500 pb. A qualidade do DNA é fundamental para conseguir amplificar fragmentos longos. DNA fragmentado não produz amplificação daqueles fragmentos, necessitando-se de cuidado maior durante a extração e armazenamento do DNA (BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA, 1995). Apesar da obtenção de DNA de alto peso molecular e puro, nas extrações iniciais, o armazenamento à -70 °C e constantes descongelamento, para amplificação das outras regiões, causou a degradação do mesmo. Tal fato só pôde ser percebido pelo fracasso em qualquer tentativa de otimização para o GH, em que o tamanho relativamente grande do fragmento requeria DNA de alto peso molecular. Novas extrações foram feitas e armazenadas à 4-8 °C durante 30-40 dias onde foi conseguido sucesso na otimização e subsequente

genotipagem dos animais. Verificou-se, ainda, que não existem diferenças em relação ao DNA oriundo de sangue fresco ou sangue congelado (-20°C por 20 meses) quanto à qualidade de DNA obtido, medido através da amplificação do GH com a mesma eficiência em ambos.

A reação de otimização do GH é mostrada na Figura 10. Nesse caso foi observado que dos 3 fatores apenas dois ("*primers*" e *Taq* polimerase) tiveram efeitos significativos na reação. O efeito da quantidade de "*primers*" foi limitante na amplificação, onde ao nível de 4 pmoles não ocorreu amplificação visível. A quantidade de *Taq* polimerase teve interferência na especificidade da reação, onde o nível de 1,5 U ocasionou a formação de produtos indesejáveis de alto peso molecular. A quantidade de DNA molde não produziu variação detectável. Portanto, a quantidade de "*primers*" deve ser aumentada para amplificação de fragmentos longos, fato não discutido na literatura pesquisada, enquanto que a quantidade de *Taq* polimerase em excesso diminui a especificidade da reação, conforme foi mostrado por SAIKI *et al.* (1988). As condições ótimas de amplificação do GH incluíram, então, 50 ng de DNA, 1 mM de MgCl_2 , 8 nmoles de dNTPs, 8 pmoles de "*primers*" e 0,75 U de *Taq* polimerase, de acordo com o programa de amplificação citado na Figura 10.

Primers (pmol)	8	8	8	4	4	4	4	4	4	8	8	8
Taq Pol. (U)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
DNA (ng)	200	100	50	200	100	50	200	100	50	200	100	50
Colunas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12



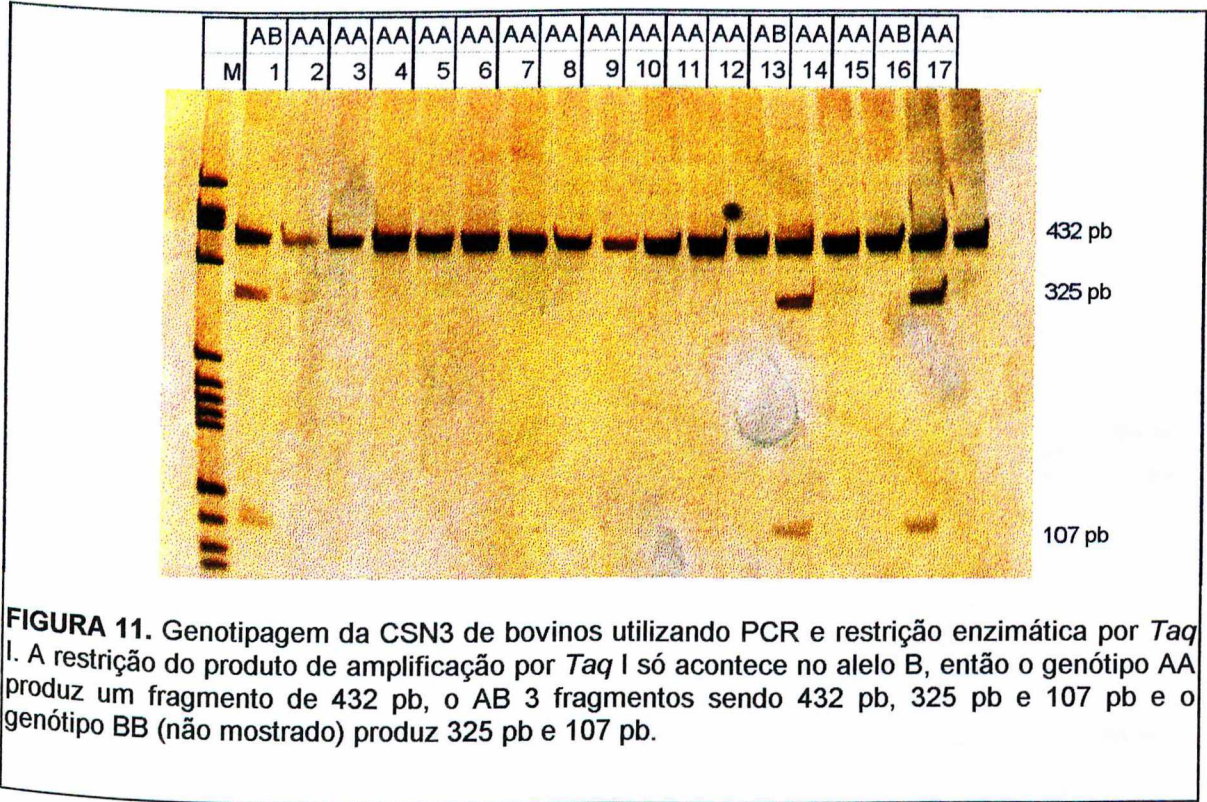
} BANDAS INESPECÍFICAS
GH - 891 pb

FIGURA 10. Otimização da reação de amplificação do GH. A reação de otimização incluiu 4 e 8 pmoles de primers , 0,75 e 1,5 U de Taq polimerase, 50, 100 e 200 ng de DNA, 8 nmoles de dNTPs e 1 mM de MgCl₂ em 20 µl, sob um programa que incluiu 35 ciclos à 62°C, 72°C e 94°C por 1 minuto. O produto de amplificação (10 µls) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 2% e corado por brometo de etídio.

4.3. Genotipagem dos Animais

Com relação à restrição enzimática é propício ressaltar as observações inerentes à cada uma utilizada. Algumas enzimas de restrição mostraram-se bastante sensíveis ao volume final da reação de restrição enzimática, onde pequenas variações produziam restrição parcial. Como utilizou-se todo o volume do produto de amplificação para realização da restrição enzimática, com o objetivo de diminuir o custo com tubos, em alguns casos foi necessário ajustar o volume naqueles que sofreram evaporação durante a amplificação. As endonucleases que apresentaram problemas de restrição parcial foram a *Hae* III (Figura 12), *Msp* I e *Hinf* I, sendo que em todos os casos foi devido à erros no volume final da reação, provavelmente por alteração no pH e concentração de sais, contidos no tampão da enzima, necessários para atividade enzimática ótima (SAMBROOK *et al.*, 1989).

A genotipagem de alguns animais são mostradas nas Figuras que se seguem (Figuras 11, 12, 13 e 14). Na Figura 13 é possível comparar a produtividade da reação de amplificação da LGB e CSN3, onde observa-se que a primeira teve maior produtividade que a segunda, mostrando que as reações são variáveis para cada tipo de fragmento à ser amplificado, provavelmente devido às diversas relações e fatores que interferem na amplificação. A eficiência de toda reação de amplificação depende não só da concentração dos reagentes, mas também, da estrutura da região amplificada e interações entre “primers” e entre eles e DNA molde, que ditarão quão específica e produtiva será a reação.



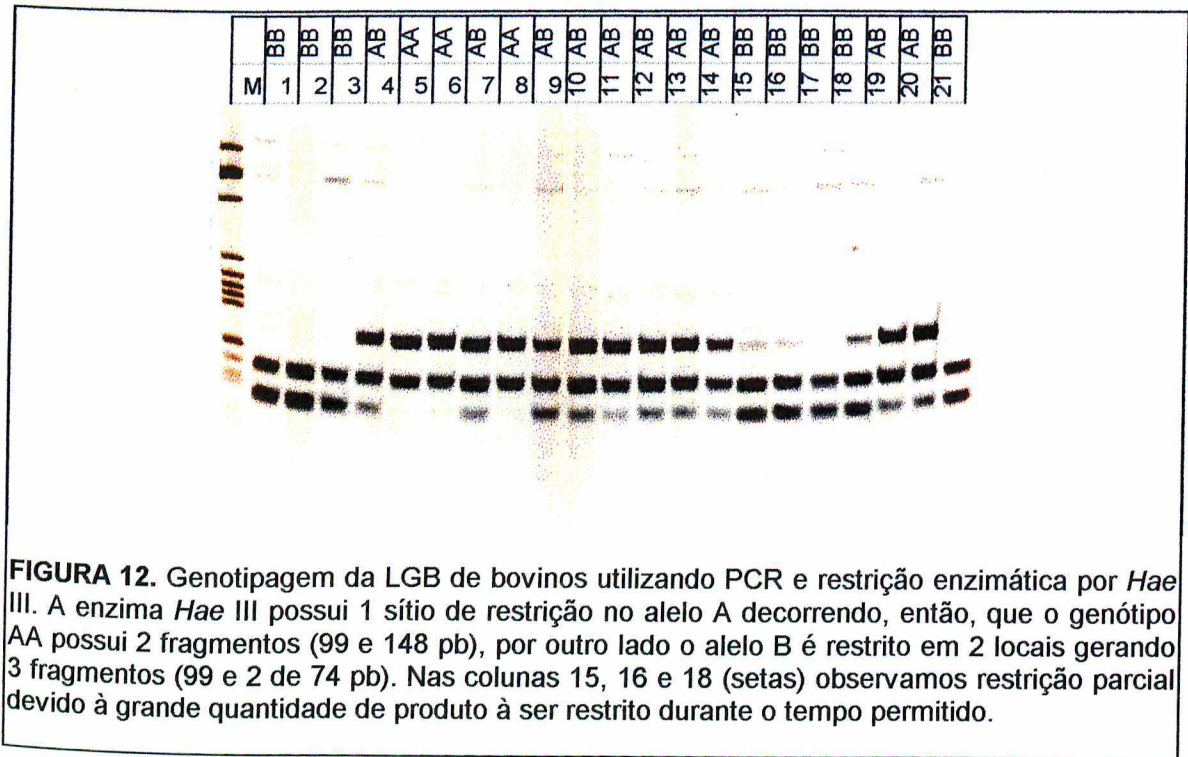


FIGURA 12. Genotipagem da LGB de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por *Hae* III. A enzima *Hae* III possui 1 sítio de restrição no alelo A decorrendo, então, que o genótipo AA possui 2 fragmentos (99 e 148 pb), por outro lado o alelo B é restrito em 2 locais gerando 3 fragmentos (99 e 2 de 74 pb). Nas colunas 15, 16 e 18 (setas) observamos restrição parcial devido à grande quantidade de produto à ser restrito durante o tempo permitido.

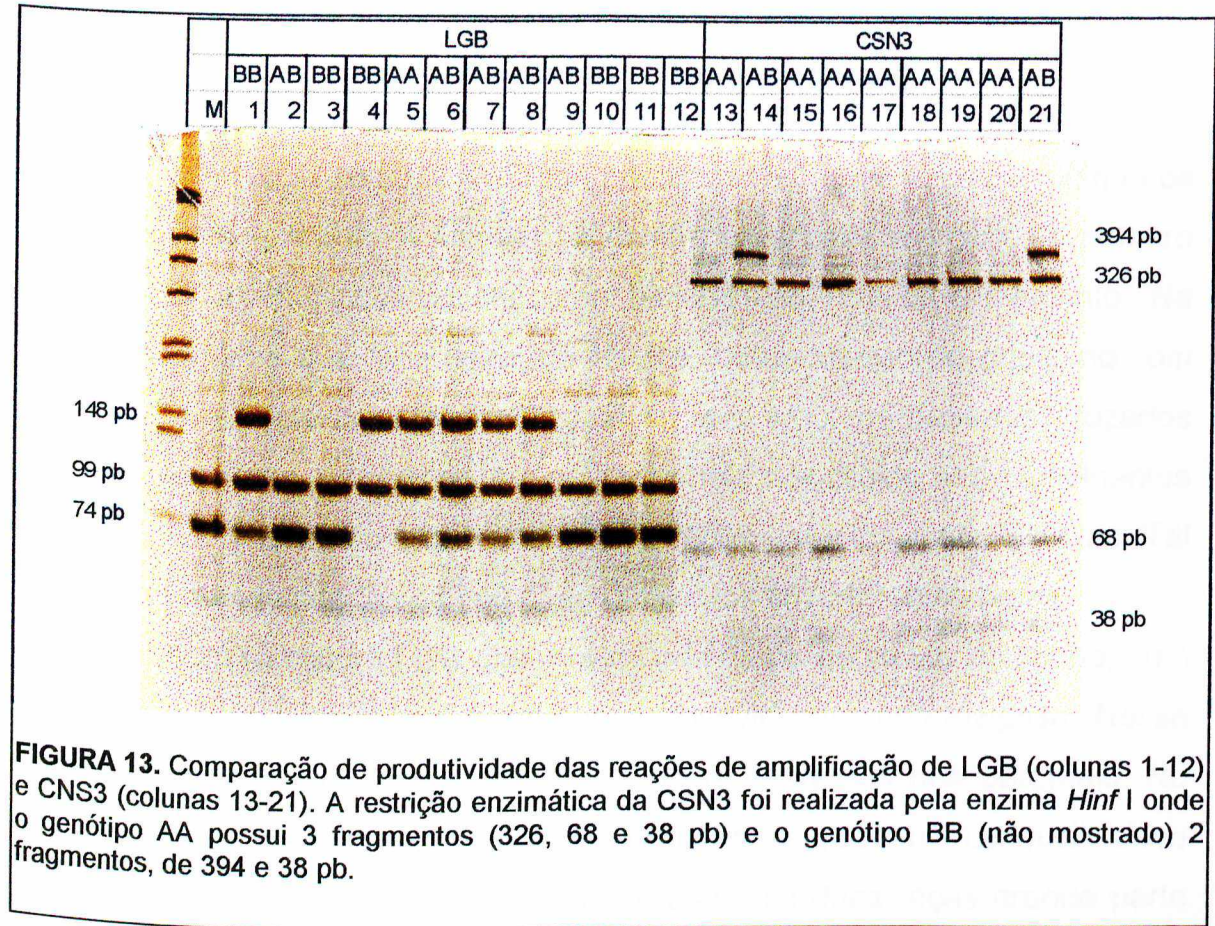


FIGURA 13. Comparação de produtividade das reações de amplificação de LGB (colunas 1-12) e CNS3 (colunas 13-21). A restrição enzimática da CSN3 foi realizada pela enzima *Hinf* I onde o genótipo AA possui 3 fragmentos (326, 68 e 38 pb) e o genótipo BB (não mostrado) 2 fragmentos, de 394 e 38 pb.

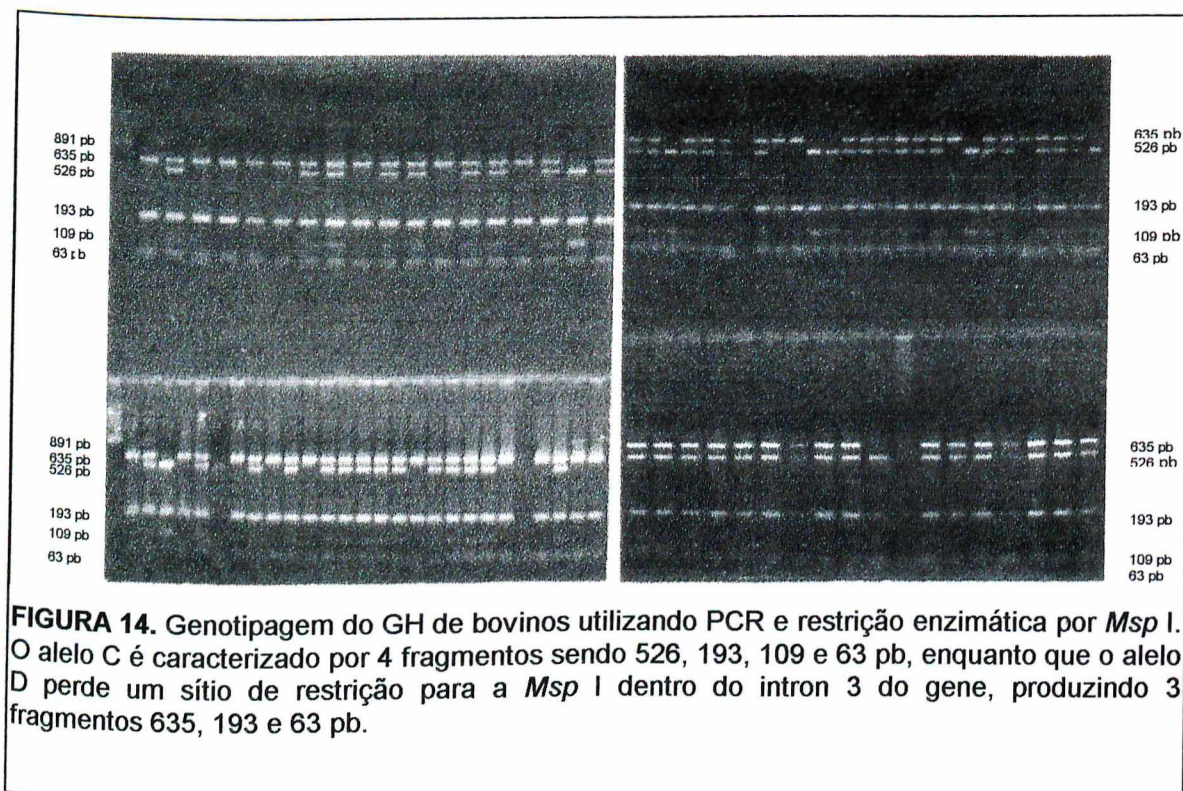


FIGURA 14. Genotipagem do GH de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por *Msp* I. O alelo C é caracterizado por 4 fragmentos sendo 526, 193, 109 e 63 pb, enquanto que o alelo D perde um sítio de restrição para a *Msp* I dentro do intron 3 do gene, produzindo 3 fragmentos 635, 193 e 63 pb.

4.4. Frequências alélicas e genotípicas

A genotipagem foi realizada nos bezerros e nas vacas, incluindo os cruzados SINE e ANNE. A Tabela 12 mostra para cada marcador o número observado e esperado dos genótipos em bezerros por raça ou cruzamento. Na CSN3, observa-se que, nos bezerros Nelore, houve desvio do equilíbrio com aumento de indivíduos heterozigotos. Por outro lado, os bezerros cruzados estão em equilíbrio, mostrando que a frequência dos alelos são semelhantes nos parentais, apesar do cruzamento entre raças geneticamente distintas. Tal fato mostra que nem todos os genes estão fixados em diferentes raças.

Com relação à LGB observa-se que todos estão em equilíbrio, com exceção do cruzamento LINE, onde houve desvio para heterozigose. Nesse caso fica claro que os alelos têm frequências diferentes nos parentais. No rebanho Nelore predomina o alelo B, enquanto no rebanho Limousin deve predominar o alelo A; portanto, quando cruza-se as duas raças grande parte da progênie será heterozigota. Nos outros cruzamentos, como não houve desequilíbrio, pode-se dizer que a frequência alélica é semelhante nos

parentais, ou seja a freqüência dos alelos A e B são próximas em ambas raças. A LGB pode ser um importante marcador para aumentar a heterozigose em cruzamentos entre Nelore e Limousin.

TABELA 12
Genótipos observados, esperados e desvios do equilíbrio em
bezerros de engorda

Genes	Raças	n	AA ^a		AB		BB		X ^{2b}	P
			OBS ^c	ESP ^d	OBS	ESP	OBS	ESP		
CSN3	ANNE	35	34	34	1	1	-	-	0,00	< 0,99
	LINE	31	13	14	16	14	2	3	1,02	< 0,31
	SINE	111	81	82	29	27	1	2	0,85	< 0,36
	NE	116	78	81	38	32	-	3	4,45 *	< 0,03
	TODAS	293	206	210	84	76	3	7	3,09	< 0,08
LGB	ANNE	35	-	1	11	9	24	25	1,35	< 0,24
	LINE	36	3	8	28	18	5	10	11,31 *	< 0,01
	SINE	113	8	8	45	45	60	60	0,01	< 0,91
	NE	108	10	10	46	46	52	52	0,00	< 0,97
	TODAS	292	21	25	130	121	141	145	1,49	< 0,22
GH	ANNE	28	2	8	26	14	-	6	21,03 *	< 0,01
	LINE	34	-	9	34	17	-	9	34,00 *	< 0,01
	SINE	121	6	33	115	60	-	27	99,21 *	< 0,01
	NE	116	2	2	24	25	90	90	0,07	< 0,79
	TODAS	299	10	40	199	138	90	120	56,25 *	< 0,01

^a No GH substitua AA por CC, AB por CD e BB por DD.
^b χ^2 (0.95 ; 1) = 3.84.
^c Observações efetuadas por genotipagem via PCR-RFLP.
^d Número esperado de acordo com as frequências gênicas calculadas, considerando Equilíbrio de Hardy-Weinberg.
* χ^2 (0.95 ; 1) > 3.84, ou seja, desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O GH está em desequilíbrio em todos os cruzamentos, mostrando que a freqüência do alelo C é alta nas raças de corte européias, enquanto que a freqüência do alelo D é mais alta no Nelore. Portanto, quando ocorre o cruzamento entre as duas raças a freqüência de heterozigotos na progênie é alta. O GH pode se constituir num importante marcador para medir a heterozigose em cruzamentos entre Nelore e raças de corte européias.

A Tabela 13 ilustra as frequências genotípicas e gênicas e heterozigose esperadas para cada marcador e por cruzamento em bezerros.

Por meio dessa Tabela observa-se que a frequência do alelo A na CNS3 é alta em todos os cruzamentos, exceto no Limousin onde foi menor, pelos motivos já discutidos acima. A heterozigose foi maior no cruzamento LINE, já que a frequência dos alelos é oposta nas duas raças. A LGB teve predominância para o alelo B, exceto no cruzamento com Limousin onde a frequência de ambos foram próximas (0,47 e 0,53, respectivamente para os alelos A e B). A heterozigose também foi maior para o cruzamento LINE, já que a frequência dos alelos nas duas raças diferem. No caso do GH, a frequência dos alelos foi igual em todos os cruzamentos, sendo o alelo C fixado nas raças de corte européias, enquanto que no Nelore a frequência do alelo D é predominante.

TABELA 13

Frequências genotípicas e gênicas observadas e heterozigose esperada (Hs) da CSN3, LGB e GH em bezerros de corte.

Genes	Raça	AA	AB	BB	A	B	Hs
CSN3	ANNE	0,97	0,03	-	0,99	0,01	0,03
	LINE	0,42	0,52	0,06	0,68	0,32	0,44
	SNE	0,73	0,26	0,01	0,86	0,14	0,24
	NE	0,67	0,33	-	0,84	0,16	0,27
	TODAS	0,70	0,29	0,01	0,85	0,15	0,26
LGB	ANNE	-	0,31	0,69	0,16	0,84	0,26
	LINE	0,08	0,78	0,14	0,47	0,53	0,50
	SNE	0,07	0,40	0,53	0,27	0,73	0,39
	NE	0,09	0,43	0,48	0,31	0,69	0,42
	TODAS	0,07	0,45	0,48	0,30	0,70	0,42
GH	ANNE	0,07	0,93	-	0,54	0,46	0,50
	LINE	-	1,00	-	0,50	0,50	0,50
	SNE	0,05	0,95	-	0,52	0,48	0,50
	NE	0,02	0,21	0,78	0,12	0,88	0,21
	TODAS	0,03	0,67	0,30	0,37	0,63	0,46

Nas vacas, (Tabelas 14 e 15) observa-se que a CSN3 também não está em equilíbrio, no cruzamento entre LINE, havendo aumento do número de heterozigotos em relação ao esperado. A LGB encontra-se em equilíbrio em todos os cruzamentos, ao contrário do observado nos bezerros, onde houve aumento da heterozigose no cruzamento LINE. No GH, observou-se desvio nos cruzamentos, mas não no Nelore, conforme já citado acima nos bezerros.

A frequência do alelo A da CSN3 diminuiu nos bezerros em relação às vacas, mostrando que o desequilíbrio gerado nos bezerros se deu em função de um aumento do alelo B, provavelmente em função de deriva genética. O aumento da frequência do alelo B nos bezerros pode indicar um aumento da frequência deste alelo na população, entretanto um acompanhamento ao longo das gerações deve ser realizado para confirmar esta hipótese. O aumento do alelo B pode ter sido gerado por deriva genética (FALCONER & MACKAY, 1996; NICHOLAS, 1996) já que a escolha de touros é realizada dentro de um número finito e pequeno de população de reprodutores elite. Portanto, uma amostragem de um reprodutor portador de genótipo AB ou BB pode aumentar a frequência do alelo B na geração seguinte, sem entretanto representar a frequência real do alelo na população. Se a frequência de um alelo for muito baixa a escolha de touros pode sofrer os efeitos de casualidade, onde o alelo menos freqüente pode ser favorecido, sendo então aumentada sua frequência na geração seguinte. Isto é característico da deriva genética, sendo predominante onde a escolha de touros para geração seguinte se dá em um número finito, conforme ocorre quando se utiliza inseminação artificial, procurando escolher touros geneticamente superiores. Outros fatores, como seleção, podem gerar desequilíbrio, entretanto tudo indica que o maior responsável tenha sido a deriva genética.

TABELA 14

Genótipos observados, esperados e teste de equilíbrio da CSN3, LGB e GH em vacas de corte.

Genes	Raça	n	AA ^a		AB		BB		X ^{2b}	P
			OBS ^c	ESP ^d	OBS	ESP	OBS	ESP		
CSN3	LINE	41	7	11	29	20	5	9	7,16 *	< 0,01
	SNE	112	77	77	32	32	3	3	0,02	< 0,88
	NE	164	143	142	19	21	2	1	1,28	< 0,26
	TODAS	317	227	225	80	84	10	8	0,80	< 0,37
LGB	LINE	41	8	10	25	21	8	10	1,98	< 0,16
	SNE	114	6	8	49	45	59	61	1,07	< 0,30
	NE	156	11	9	53	57	92	90	0,76	< 0,38
	TODAS	311	25	25	127	126	159	159	0,00	< 0,96
GH	LINE	26	1	7	25	13	-	6	22,29 *	< 0,01
	SNE	67	5	19	61	33	1	15	45,87 *	< 0,01
	NE	85	-	1	16	14	69	70	1,17	< 0,28
	TODAS	178	6	18	102	77	70	82	17,80 *	< 0,01

^a No GH substitua AA por CC, AB por CD e BB por DD.

^b X² (0,95 ; 1) = 3,84.

^c Observações efetuadas por genotipagem via PCR-RFLP.

^d Número esperado de acordo com as frequências gênicas calculadas, considerando Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

* X² (0,95 ; 1) > 3,84, ou seja, desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

TABELA 15

Frequências genotípicas e gênicas observadas e heterozigose esperada (Hs) da CSN3, LGB e GH em vacas de corte.

Genes	Raças	AA	AB	BB	A	B	Hs
CSN3	LINE	0,17	0,71	0,12	0,52	0,48	0,50
	SNE	0,69	0,29	0,03	0,83	0,17	0,28
	NE	0,87	0,12	0,01	0,93	0,07	0,13
	Todas	0,72	0,25	0,03	0,84	0,16	0,27
LGB	LINE	0,20	0,61	0,20	0,50	0,50	0,50
	SNE	0,05	0,43	0,52	0,27	0,73	0,39
	NE	0,07	0,34	0,59	0,24	0,76	0,36
	Todas	0,08	0,41	0,51	0,29	0,71	0,41
GH	LINE	0,04	0,96	-	0,52	0,48	0,50
	SNE	0,07	0,91	0,01	0,53	0,47	0,50
	NE	-	0,19	0,81	0,09	0,91	0,17
	Todas	0,03	0,57	0,39	0,32	0,68	0,44

A literatura com referência à frequência dos alelos da CSN3, LGB e GH em bovinos de corte é escassa, onde grande parte dos trabalhos publicados se referem à gado de leite. Contudo, DEL LAMA & ZAGO (1996),

mostraram que a frequência do alelo A da CNS3 em 4 rebanhos Nelore foi 0,94, diferindo da frequência encontrada nos bezerros NE neste estudo (0,84), mas não da frequência observada nas vacas NE (0,93). A frequência do alelo A da LGB, observada por esses autores foi igual a 0,38, o que difere da frequência da presente investigação, nas vacas NE (0,24), mas não difere da frequência encontrada nos bezerros NE (0,31). Os resultados sugerem que a atuação de seleção, deriva genética, ou introdução de linhagens diferentes, podem ser responsáveis pela diferença nas frequências gênicas da CSN3 e LGB em bovinos da raça NE. Já com relação ao GH, ZHANG *et al.* (1993) mostraram que a frequência do alelo C do GH em Hereford foi igual a 1, não observando, portanto a presença do alelo D, confirmando os resultados encontrados nesse estudo, pela alta frequência de heterozigotos no cruzamento. Por outro lado em touros holandeses a frequência do alelo D foi de 0,26.

4.5. Associação dos marcadores com características quantitativas

Apesar da limitação de nossos dados, pelo baixo número de progênie e a impossibilidade de obtenção dos genótipos dos touros previamente, conduziu-se análise estatística para examinar a associação entre os marcadores (CSN3, LGB e GH) e várias características quantitativas que foram medidas durante o experimento. O procedimento utilizado baseou-se em análise de marcador único, onde a distribuição dos valores das características são examinados separadamente para cada locus marcado. Cada teste foi conduzido independentemente da informação dos outros marcadores, onde um cromossoma com n marcadores forneceu n testes separadamente. A resposta obtida nesse caso é, então, uma simples detecção de um QTL ligado ao marcador, sem entretanto estimar a posição do QTL em relação ao marcador. Basicamente utilizou-se três modelos de análise, sendo que o primeiro fornece como resposta, a associação do genótipo dos indivíduos, com alguma característica quantitativa. O segundo, denominado efeito de substituição

alélica, fornece o efeito de cada alelo sobre determinada característica, sofrendo entretanto as limitações do primeiro modelo. O terceiro modelo, considera o efeito do touro, sendo a análise realizada dentro de famílias, respondendo se existe segregação de um marcador ligado à um QTL, em cada família. Os resultados dos 3 modelos serão mostrados, abordando os cuidados nas interpretações e conclusões chegadas, pelo uso desses modelos. Tais modelos foram denominados modelo I, II e III, respectivamente.

As médias e desvios padrões das características quantitativas da população sob estudo são mostradas na Tabela 16. É importante ressaltar que os dados foram corrigidos para heterose para melhor estimativa do valor genético aditivo dos animais cruzados. A heterose individual para GND e GPD foi assumida em 12%, enquanto que não foi necessário ajustar para heterose materna, já que não utilizou-se produtos de vacas cruzadas ($\frac{3}{4}$ europeu x $\frac{1}{4}$ nelore). A primeira corrige os pesos dos bezerros cruzados SINE, enquanto que a segunda é utilizada para correção dos pesos dos produtos de vacas cruzadas, sendo portanto, considerada apenas nas vacas SINE. A heterose materna é superior à individual refletindo o maior efeito da heterose em características reprodutivas, sobrevivência de bezerros e, principalmente, produção de leite da mãe que será responsável pelo melhor desempenho de produtos originados de vacas cruzadas.

TABELA 16

Médias e desvios padrões (entre parênteses) de cinco características quantitativas de bovinos de corte, do rebanho estudado.

CLASSES	CARACT. (kg)	RAÇAS					
		AMBAS		SINE		NE	
VACAS	GND	162,33	(20,06)	148,86	(23,74)	163,67	(19,15)
	GPD	76,76	(49,83)	97,79	(66,11)	74,72	(47,48)
	BV CRP	2,28	(7,06)	0,20	(4,34)	2,50	(7,06)
	BV GND	1,50	(4,78)	0,14	(2,68)	1,64	(4,78)
	BV GPD	0,15	(4,26)	0,50	(3,90)	0,11	(4,30)
BEZERROS	PN	32,30	(3,57)	31,93	(3,73)	32,44	(3,50)
	GND	176,80	(28,31)	194,45	(28,18)	170,13	(25,34)
	GPD	98,67	(74,47)	128,13	(68,31)	87,53	(73,68)
	BV GND	15,50	(8,08)	19,22	(7,58)	14,10	(7,82)
	BV GPD	1,40	(8,36)	3,12	(10,6)	0,74	(7,24)

4.5.1. Associação dos marcadores com desempenho de bezerros

Os resultados obtidos pelo modelo I são mostrados nas Tabelas 17-21, enquanto que do modelo II, na Tabela 22 e modelo III, Tabela 23-25.

A CSN3 esteve associada significativamente com BV GPD e IDFIM, quando considerou-se as raças agrupadas, conforme mostra as Tabelas 17 e 19, respectivamente. No SINE esteve associada com BV GND (Tabela 17), enquanto que no NE, com BV GND e BV GPD (Tabela 17), GPD (Tabela 18), IDFIM e D450 (Tabela 19).

A LGB esteve associada com BV GND, BV GPD (Tabela 17) agrupando SINE e NE, entretanto no SINE mostrou associação com BV GND e BV GPD (Tabela 17), GND (Tabela 18) e PINI (Tabela 19), por outro lado, no NE, teve ligação apenas com BV GND (Tabela 17).

O GH esteve associado significativamente com BV GND (Tabela 17), GND (Tabela 18), D450 e GPMD (Tabela 19), numa análise com bezerros agrupados, enquanto que no SINE não teve associação significativa, mas no NE ele esteve associado com BV GND, BV GPD (Tabela 17), D450 e GPMD (Tabela 19).

TABELA 17

Análise de variância do peso ao nascimento (PN), valor genético para ganho de peso do nascimento ao desmame (BV GND) e valor genético para ganho de peso pós-desmame (BV GPD) em bezerros de corte, utilizando o modelo I.

Raças	Fontes de Variação	GL	PN		BV GND		BV GPD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	CSN3	2	5,52	0,57	20,59	0,56	404,91	0,04
	ERRO	221	9,90		35,35		124,28	
	R2 (%)		0,50		0,52		2,86	
	CV (%)		10,04		3,24		18,96	
	LGB	2	18,45	0,16	175,90	0,01	779,81	0,01
	ERRO	216	9,82		32,74		118,86	
	R2 (%)		1,71		4,74		5,73	
	CV (%)		9,99		3,11		18,55	
	GH	2	8,43	0,42	646,69	0,01	141,94	0,34
	ERRO	217	9,76		28,76		129,39	
	R2 (%)		0,79		17,17		1,00	
	CV (%)		9,97		2,92		19,42	
SINE	CSN3	2	3,57	0,64	178,00	0,01	84,83	0,55
	ERRO	109	8,06		33,09		140,42	
	R2 (%)		0,81		8,98		1,10	
	CV (%)		8,99		3,10		21,15	
	LGB	2	1,17	0,86	168,32	0,01	573,61	0,01
	ERRO	217	8,02		32,71		129,85	
	R2 (%)		0,26		8,49		7,37	
	CV (%)		8,97		3,08		20,45	
	GH	1	4,89	0,44	2,55	0,79	64,67	0,50
	ERRO	111	7,97		36,16		140,07	
	R2 (%)		0,55		0,06		0,41	
	CV (%)		8,94		3,24		21,14	
NE	CSN3	1	40,62	0,06	370,32	0,01	1569,01	0,01
	ERRO	110	11,47		23,48		86,36	
	R2 (%)		31,19		12,54		14,18	
	CV (%)		10,88		2,67		15,09	
	LGB	2	26,62	0,11	98,79	0,02	209,90	0,10
	ERRO	102	11,80		24,36		88,98	
	R2 (%)		4,24		7,37		4,42	
	CV (%)		11,03		2,72		15,20	
	GH	2	1,44	0,89	221,82	0,01	368,40	0,03
	ERRO	104	11,84		21,03		100,72	
	R2		0,23		16,87		6,57	
	CV		11,06		2,53		16,38	

TABELA 18

Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND) e ganho de peso pós-desmame (GPD) em bezerros de corte, utilizando o modelo I.

Raças	Fontes de Variação	GL ^a	continua			
			GND		GPD	
			QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	GC ^b	15 (12)	3468,87	0,01	167634,49	0,01
	CSN3	2 (2)	267,53	0,38	3202,71	0,17
	ERRO	205 (209)	272,64		901,33	
	R ² (%)		49,00		48,17	
	CV (%)		8,72		15,81	
	GC	14 (12)	3411,00	0,01	14176,86	0,01
	LGB	2 (2)	630,44	0,10	863,90	0,17
	ERRO	201 (204)	271,31		855,26	
	R ² (%)		47,49		50,32	
	CV (%)		8,67		15,43	
	GC	15 (12)	2157,33	0,01	12111,96	0,01
	GH	2 (2)	1923,78	0,01	7,53	0,99
	ERRO	202 (205)	257,10		827,80	
	R ² (%)		51,60		49,58	
	CV (%)		8,45		14,15	
SINE	GC	6	3392,41	0,01	20804,36	0,01
	CSN3	2	420,17	0,24	151,18	0,78
	ERRO	103	292,41		621,67	
	R ² (%)		41,82		66,15	
	CV (%)		8,50		14,16	
	GC	6	2954,59	0,01	19748,68	0,01
	LGB	2	828,81	0,05	297,36	0,61
	ERRO	105	276,94		601,05	
	R ² (%)		41,77		66,27	
	CV (%)		8,28		13,98	
	GC	6	3276,97	0,01	18588,13	0,01
	GH	1	310,72	0,31	779,71	0,24
	ERRO	105	295,73		566,84	
	R ² (%)		39,24		68,31	
	CV (%)		8,54		13,50	
NE	GC	11 (10)	901,75	0,01	33901,48	0,01
	CSN3	1 (1)	67,17	0,53	6509,39	0,01
	ERRO	98 (100)	169,75		922,95	
	R ² (%)		37,60		29,70	
	CV (%)		7,34		14,91	

Raças	Fontes de Variação	GL ^a	continuação			
			GND		GPD	
			QM	P> F	QM	P> F
NE	GC	10 (10)	812,41	0,01	3007,84	0,01
	LGB	2 (2)	282,96	0,20	158,07	0,84
	ERRO	91 (92)	172,26		933,61	
	R ² (%)		36,92		26,36	
	CV (%)		7,38		14,92	
	GC	11 (10)	837,22	0,01	1980,74	0,02
	GH	2 (2)	279,03	0,19	2279,92	0,07
	ERRO	106 (94)	164,94		838,14	
	R ² (%)		38,98		25,64	
	CV (%)		7,23		14,17	

^aValores entre parênteses correspondem aos graus de liberdade do GPD.

^bGC => grupo contemporâneo, são diferentes no desmame e pós-desmame.

TABELA 19

Análise de variância do peso final (PFIM), idade inicial (IDINI), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg (D450) e ganho de peso médio diário (GPMD) em confinamento, usando o modelo I.

Raças	Fontes de Variação	GL	PFIM		IDINI		IDFIM		D450		GPMD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	PINI	1	3386,08	0,06	2335,57	0,01	2793,98	0,06	19874,48	0,01	0,11	0,01
	RACA	1	3539,49	0,06	3823,82	0,01	6857,45	0,01	4322,28	0,01	0,29	0,01
	CSN3	2	1538,06	0,21	157,11	0,38	2828,56	0,03	390,58	0,23	0,02	0,35
	ERRO	167	971,06		159,54		774,32		266,31		0,02	
	R ² (%)		11,56		13,78		16,74		54,24		10,51	
	CV (%)		6,95		4,77		6,67		10,55		10,09	
	PINI	1	4631,08	0,03	1953,59	0,01	2031,89	0,11	18290,62	0,01	0,12	0,01
	RACA	1	2952,37	0,09	3341,38	0,01	6718,85	0,01	4323,64	0,01	0,29	0,01
	LGB	2	438,39	0,64	185,87	0,31	131,61	0,85	0,46	1,00	0,00	0,95
	ERRO	167	984,23									
	R ² (%)		10,36		13,97		13,26		53,44		9,43	
	CV (%)		7,00		4,77		6,80		10,64		10,15	
	PINI	1	4108,69	0,04	2361,61	0,01	1633,08	0,15	17602,29	0,01	0,15	0,01
	RACA	1	3094,07	0,08	1671,30	0,01	187,62	0,63	161,35	0,43	0,02	0,32
	GH	2	223,31	0,80	40,70	0,78	1608,90	0,13	995,54	0,02	0,05	0,04
	ERRO	167	986,81		160,93		788,93		259,06		0,02	
	R ² (%)		10,13		13,03		15,16		55,49		12,71	
	CV (%)		7,01		4,79		6,73		10,40		9,96	

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Zootecnia

Raças	Fontes de Variação	GL	continuação									
			PFIM		IDINI		IDFIM		D450		GPMD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
SINE	PINI	1	8554,80	0,01	1143,55	0,01	0,19	0,99	9905,79	0,01	0,12	0,01
	CSN3	2	2174,23	0,21	200,69	0,18	1876,29	0,11	31,17	0,84	0,00	0,80
	ERRO	88	1362,61		113,61		842,58		179,21		0,02	
	R ² (%)		10,27		13,42		4,82		39,49		8,02	
	CV (%)		8,08		4,07		7,12		9,43		9,55	
	PINI	1	10157,01	0,01	914,04	0,01	27,71	0,86	9053,20	0,01	0,11	0,01
	LGB	2	901,87	0,53	28,01	0,79	89,26	0,90	92,01	0,60	0,01	0,53
	ERRO	88	1391,53		117,53		883,19		177,82		0,02	
	R ² (%)		8,37		10,43		0,23		39,96		8,88	
	CV (%)		8,17		4,14		7,29		9,40		9,51	
	PINI	1	9253,08	0,01	1233,47	0,01	14,25	0,90	9897,46	0,01	0,12	0,01
	GH	1	1,43	0,97	139,86	0,27	449,43	0,47	43,90	0,62	0,00	0,60
	ERRO	89	1396,14		115,27		870,22		177,40		0,02	
	R ² (%)		7,02		11,16		0,58		39,42		7,83	
	CV (%)		8,18		4,10		7,23		9,39		9,51	
NE	PINI	1	683,04	0,22	1275,40	0,02	7734,70	0,01	10637,93	0,01	0,01	0,02
	CSN3	1	207,78	0,50	30,22	0,71	2562,17	0,05	2447,43	0,01	0,14	0,71
	ERRO	77	451,95		213,82		651,91		346,58		0,02	
	R ² (%)		2,23		7,19		15,40		30,65		44,00	
	CV (%)		4,85		5,46		2,96		10,98		7,70	
	PINI	1	555,96	0,27	1057,19	0,03	6670,00	0,01	8993,33	0,01	0,02	0,28
	LGB	2	327,41	0,49	210,41	0,37	267,22	0,68	77,69	0,82	0,00	0,87
	ERRO	76	452,02		211,49		687,17		381,30		0,02	
	R ² (%)		3,49		9,39		11,99		24,69		1,76	
	CV (%)		4,85		5,43		6,12		11,52		10,99	
	PINI	1	498,06	0,30	1209,23	0,02	5073,38	0,01	7611,11	0,01	0,04	0,14
	GH	2	55,50	0,89	6,38	0,97	1436,51	0,12	1075,97	0,05	0,06	0,03
	ERRO	76	459,17		216,86		656,40		355,03		0,02	
	R ² (%)		1,96		7,09		15,93		29,88		9,93	
	CV (%)		4,89		5,50		5,98		11,11		10,52	

As Tabelas 20 e 21 mostram as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos, enquanto que a Tabela 22 reporta o efeito de substituição gênica para cada marcador, quando aplicável. Na Tabela 20 observa-se que os bezerros com genótipo AB para CSN3 tiveram maior BV GPD que o genótipo AA (0,23 x -3,54), quando considerados SINE e NE juntos na análise. Na análise por raça, os bezerros SINE mostraram diferenças com relação ao genótipo no BV GND, sendo o genótipo AA superior ao AB, enquanto no NE o AB foi superior em várias características (GPD, BV GND e BV GPD). Quanto aos resultados do confinamento (Tabela 21) os genótipos da CSN3 diferiram na IDFIM, sendo que os animais AA foram abatidos 11 dias mais velhos que o AB (421 x 410), considerando ambas raças. No NE o genótipo AA da CSN3 foi diferente do AB para IDFIM (432 x 420), D450 (173 x 161) e GPMD (1,24 x 1,33). Esses resultados podem refletir um efeito da heterose dentro de raça, através do melhor desempenho dos indivíduos heterozigotos, provavelmente por ligação com outros genes.

Com relação à LGB, o genótipo AA foi diferente do BB no BV GND e BV GPD, sendo o primeiro superior, na análise conjunta. Nos bezerros SINE os genótipos AA e AB não diferiram, entretanto ambos foram superiores ao genótipo BB para BV GND e BV GPD. No NE a LGB foi associada somente com BV GND, sendo que os genótipos AB e BB são iguais, mas inferiores ao genótipo AA. A LGB não esteve associada com desempenho em confinamento (Tabela 21).

TABELA 20

Médias ajustadas do peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em bezerros de corte, resultante do modelo I.

Raça	Gene	GEN	n	PN			GND			GPD			BVGND			BVGPD		
				kg	±	i.c.	kg	±	i.c.	kg	±	i.c.	kg	±	i.c.	kg	±	i.c.
AMBAS	CSN3 (N=224)	AA	158	31,22	±	0,49	189,08	±	5,98	175,08	±	8,84	17,54	±	0,92	-3,54	±	1,74 ^a
		AB	65	31,65	±	0,78	185,88	±	6,94	183,14	±	10,29	17,60	±	1,47	0,23	±	2,76 ^b
		BB	1	33,00	±	n.e.	177,73	±	n.e.	159,00	±	n.e.	11,14	±	n.e.	-14,90	±	n.e.
	LGB (N=219)	AA	18	32,61	±	1,56	198,59	±	11,58	184,23	±	16,90	21,22	±	2,85 ^a	3,40	±	5,42 ^a
		AB	93	31,43	±	0,64	190,17	±	6,23	179,48	±	9,09	18,04	±	1,17 ^{ab}	-0,83	±	2,25 ^a
		BB	108	31,08	±	0,60	189,38	±	6,47	175,04	±	9,45	16,65	±	1,09 ^b	-5,00	±	2,08 ^b
	GH (N=220)	CC	7	30,43	±	2,89	190,35	±	19,48 ^{ab}	181,74	±	29,63	20,13	±	4,97 ^a	-3,48	±	10,52
		CD	128	31,55	±	0,55	194,82	±	6,74 ^a	181,97	±	10,27	19,40	±	0,92 ^a	-3,65	±	1,96
		DD	85	31,09	±	0,68	182,81	±	6,25 ^b	181,22	±	9,52	14,46	±	1,16 ^b	-1,31	±	2,45
SINE	CSN3 (N=112)	AA	82	31,70	±	0,62	198,39	±	7,31	177,85	±	9,01	20,60	±	1,28 ^a	-4,70	±	2,61
		AB	29	31,21	±	1,09	195,12	±	10,38	177,70	±	12,78	16,96	±	2,20 ^b	-6,59	±	4,51
		BB	1	33,00	±	n.e.	171,89	±	n.e.	159,03	±	n.e.	11,14	±	n.e. ^{ab}	-14,90	±	n.e.
	LGB (N=114)	AA	8	31,88	±	2,37	206,91	±	17,31	178,27	±	21,73	22,90	±	4,78 ^a	3,76	±	9,53 ^a
		AB	47	31,66	±	0,82	199,51	±	7,97	179,26	±	10,01	20,82	±	1,67 ^a	-4,09	±	3,33 ^a
		BB	59	31,42	±	0,74	193,53	±	8,44	174,35	±	10,61	17,83	±	1,49 ^b	-8,00	±	2,97 ^b
	GH (N=113)	CC	5	30,60	±	3,24	189,22	±	25,25	165,16	±	29,82	18,77	±	6,92	-8,83	±	13,60
		CD	108	31,61	±	0,54	198,05	±	6,87	178,58	±	8,12	19,50	±	1,15	-5,15	±	2,26
NE	CSN3 (N=112)	AA	76	30,71	±	0,78	181,40	±	4,93	189,13	±	11,73 ^a	14,23	±	1,12 ^a	-2,30	±	2,13 ^a
		AB	36	32,00	±	1,14	179,59	±	5,51	205,97	±	13,12 ^b	18,12	±	1,65 ^b	5,72	±	3,15 ^b
		BB	49	30,67	±	0,98	183,23	±	5,50	193,75	±	13,44	15,22	±	1,43 ^{bc}	-1,39	±	2,71
	LGB (N=105)	AA	10	33,20	±	2,47	190,91	±	10,47	199,11	±	25,54	19,89	±	3,53 ^a	3,12	±	6,74
		AB	46	31,20	±	1,02	182,56	±	5,31	196,52	±	12,97	15,20	±	1,46 ^b	2,50	±	4,79
		BB	49	30,67	±	0,98	183,23	±	5,50	193,75	±	13,44	15,22	±	1,43 ^{bc}	-1,39	±	2,71
	GH (N=107)	CC	2	30,00	±	30,9	192,24	±	117,8	224,83	±	275,7	23,52	±	41,2 ^{ab}	9,88	±	90,2 ^{ab}
		CD	20	31,25	±	1,61	184,54	±	7,37	213,28	±	17,25	18,84	±	2,16 ^a	4,45	±	4,69 ^a
		DD	85	31,09	±	0,74	180,00	±	4,46	197,92	±	10,46	14,46	±	1,00 ^b	-1,31	±	2,17 ^b

^{a,b,c} Médias com diferentes sobrescritos, são diferentes ($P < 0,05$).

n.e. => intervalo de confiança não estimável.

Na Tabela 22 observa-se que houve efeito de substituição alélica para BV GND e BV GPD em ambos, SINE e NE. Ainda no SINE houve efeito de substituição alélica para GND e no NE para PN. Esse modelo foi concordante com os resultados mostrados acima, pois em todos os casos o efeito médio de substituição do alelo A por B diminui ($b < 0$) o valor quantitativo das características onde a regressão foi significativa.

O GH mostrou efeito significativo sobre o GND e BV GND (Tabela 20). No GND, os bezerros com genótipo CD foram superiores aos bezerros DD, enquanto que o BV GND de bezerros com genótipo DD foi menor que CC e CD. Nos bezerros NE o genótipo CD teve maiores BV para GND e GPD. No confinamento (Tabela 21) o heterozigoto foi melhor em D450 e GPMD, sendo que o efeito foi também significativo no NE. O efeito de substituição alélica pôde ser estimado considerando todos os animais, nesse caso a substituição do alelo C por D diminui o GND e BV GND, entretanto aumenta o GPD (Tabela 22). Como os dados são ajustados para heterose o GPD dos bezerros SINE foi menor que nos NE e já que a frequência genotípica de CD é alta no primeiro e baixa no segundo, a estimativa da substituição alélica para GPD refletiu o maior GPD do NE, ocasionando erro na estimativa. Com esse resultado contraditório, pode-se concluir que apesar dos dados serem corrigidos para heterose, as frequências alélicas do GH são muito diferentes entre NE e SINE, ocasionando erro na análise estatística, quando são agrupados. Contudo o efeito de substituição gênica não foi possível realizar por raça/cruzamento já que o número de observações para o genótipo CC no SINE é zero, enquanto que no NE é apenas 2. Como os NE heterozigotos foram melhores que o homozigoto DD, mesmo com correção para a heterose, indica que existe efeito de heterose dentro de raça, podendo ser um importante marcador para aumentar os efeitos genéticos não aditivos, seja por interação intra-locus (dominância) ou entre locus (epistasia).

TABELA 21

Médias ajustadas do peso inicial (PINI), peso final (PFIM), idade inicial (IDINI), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg (D450 kg), ganho de peso médio diário (GPMD) em confinamento, resultante do modelo I.

Raça	Gene	GEN	n	PINI		PFIM		IDINI		IDFIM		D450		GPMD	
				kg	± I.c.	kg	± I.c.	dias	± I.c.	dias	± I.c.	dias	± I.c.	kg	± I.c.
AMBAS	CSN3 (N=172)	AA	119	250,39	3,09	450,13	± 5,68	265	± 2,30	421	± 5,07 ^a	157	± 2,97	1,29	± 0,02
		AB	52	246,42	± 4,73	441,95	± 8,77	264	± 3,56	410	± 7,82 ^b	152	± 4,59	1,33	± 0,04
		BB	1	230,02	± n.e.	473,91	± n.e.	282	± n.e.	455	± n.e.	155	± n.e.	1,29	± n.e.
	LGB (N=172)	AA	13	254,01	± 10,02 ^{ab}	447,34	± 18,84	262	± 7,58	414	± 17,04	155	± 9,87	1,31	± 0,08
		AB	72	252,32	± 3,97 ^a	445,21	± 7,45	267	± 2,99	418	± 6,73	155	± 3,89	1,30	± 0,03
		BB	87	245,63	± 3,58 ^b	450,05	± 6,87	264	± 2,77	418	± 6,21	155	± 3,60	1,30	± 0,03
	GH (N=172)	CC	4	240,15	± 27,08	442,53	± 50,56	269	± 20,43	413	± 45,22	148	± 25,90 ^{ab}	1,35	± 0,21 ^{ab}
		CD	105	252,23	± 5,20	445,77	± 8,38	265	± 3,39	412	± 7,50	151	± 4,29 ^a	1,34	± 0,03 ^a
		DD	63	244,90	± 6,16	451,11	± 11,56	265	± 4,67	427	± 10,34	163	± 5,92 ^b	1,25	± 0,05 ^b
SINE	CSN3 (N=92)	AA	65	262,53	± 4,58	460,24	± 9,17	262	± 2,65	410	± 7,21	141	± 3,32	1,34	± 0,03
		AB	26	260,16	± 7,52	446,52	± 14,96	260	± 4,26	400	± 11,76	143	± 5,42	1,32	± 0,05
		BB	1	240,11	± n.e.	485,89	± n.e.	279	± n.e.	448	± n.e.	143	± n.e.	1,31	± n.e.
	LGB (N=92)	AA	6	271,52	± 18,74 ^{ab}	462,42	± 39,58	261	± 11,50	405	± 31,53	137	± 14,15	1,39	± 0,13
		AB	37	266,43	± 5,99 ^a	451,15	± 12,69	263	± 3,69	407	± 10,11	143	± 4,54	1,33	± 0,04
		BB	49	256,78	± 5,17 ^b	460,08	± 10,99	261	± 3,20	409	± 8,76	142	± 3,93	1,34	± 0,04
	GH (N=92)	CC	3	245,98	± 45,57	457,33	± 93,56	269	± 26,89	420	± 73,87	146	± 33,35	1,30	± 0,32
		CD	89	262,15	± 3,86	456,62	± 7,88	262	± 2,26	407	± 6,22	142	± 2,81	1,34	± 0,03
NE	CSN3 (N=80)	AA	54	238,33	± 4,07	439,59	± 5,83	267	± 4,01	432	± 7,00 ^a	173	± 5,10 ^a	1,24	± 0,04 ^a
		AB	26	233,27	± 6,04	436,11	± 8,66	269	± 5,96	420	± 10,40 ^b	161	± 7,58 ^b	1,33	± 0,05 ^b
		BB	38	235,20	± 4,99	440,16	± 7,02	267	± 4,80	428	± 8,65	170	± 6,45	1,27	± 0,05
	LGB (N=80)	AA	7	236,74	± 14,07	429,64	± 19,67	263	± 13,45	420	± 24,25	174	± 18,07	1,25	± 0,13
		AB	35	238,29	± 5,25	438,38	± 7,35	270	± 5,03	430	± 9,06	169	± 6,75	1,28	± 0,05
		BB	38	235,20	± 4,99	440,16	± 7,02	267	± 4,80	428	± 8,65	170	± 6,45	1,27	± 0,05
	GH (N=80)	CC	1	239,78	± n.e.	430,38	± n.e.	264	± n.e.	393	± n.e.	142	± n.e.	1,50	± n.e.
		CD	16	242,18	± 7,97	437,03	± 11,59	268	± 7,96	420	± 13,85	161	± 10,19 ^a	1,33	± 0,07 ^a
		DD	63	235,24	± 3,76	438,95	± 5,42	268	± 3,72	431	± 6,48	172	± 4,76 ^b	1,25	± 0,03 ^b

^{a,b,c} Médias com diferentes sobrescritos são diferentes (P < 0,05).

n.e. => intervalo de confiança não estimável.

TABELA 22

Efeito de substituição alélica sobre peso ao nascimento (PN), ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em bezerros de corte, como resultado do modelo II.

Gene	Raça	Caract.	n	a ^a		b ^b		d ^c		P (b= 0)	P (d= 0)	R ² (%) ^d
LGB	AMBAS	PN	219	32,18 ±	1,00	-0,58 ±	0,65	-0,17 ±	0,49	< 0,08	< 0,50	0
		GND	172	190,71 ±	7,62	-2,41 ±	4,88	-0,28 ±	3,72	< 0,33	< 0,88	0
		GPD	172	201,03 ±	10,58	-4,54 ±	6,76	-0,32 ±	5,15	< 0,19	< 0,90	0
		BV GND	219	20,30 ±	1,84	-1,90 ±	1,20	-0,36 ±	0,90	< 0,01	< 0,44	4
		BV GPD	219	3,37 ±	2,25	-4,19 ±	2,25	-0,01 ±	1,71	< 0,01	< 0,99	5
		PN	220	31,65 ±	1,12	-0,23 ±	0,76	0,13 ±	0,49	< 0,56	< 0,60	0
		GND	172	209,85 ±	7,68	-16,82 ±	1,31	2,17 ±	3,33	< 0,01	< 0,20	18
		GPD	172	173,71 ±	11,35	15,51 ±	7,88	-0,60 ±	4,92	< 0,01	< 0,81	8
		BV GND	220	23,36 ±	1,92	-4,32 ±	0,00	0,36 ±	0,85	< 0,01	< 0,41	16
		BV GPD	220	-5,41 ±	4,04	1,97 ±	2,78	-0,21 ±	2,34	< 0,17	< 0,86	0
LGB	SINE	PN	114	31,89 ±	1,33	-0,23 ±	0,83	0,00 ±	0,64	< 0,59	< 0,73	0
		GND	92	210,23 ±	9,71	-8,34 ±	6,11	0,83 ±	4,72	< 0,01	< 0,73	7
		GPD	92	187,49 ±	13,97	-3,38 ±	8,78	-2,65 ±	6,79	< 0,45	< 0,44	0
		BV GND	114	23,39 ±	2,68	-2,75 ±	1,70	0,18 ±	0,53	< 0,01	< 0,79	8
		BV GPD	114	1,59 ±	5,35	-4,94 ±	3,39	-0,74 ±	-1,11	< 0,01	< 0,58	6
	NE	PN	105	32,49 ±	1,55	-0,98 ±	1,01	-0,31 ±	0,77	< 0,06	< 0,43	2
		GND	80	172,90 ±	7,90	1,45 ±	5,16	-1,86 ±	3,87	< 0,58	< 0,34	0
		GPD	80	212,69 ±	13,34	-3,12 ±	8,71	2,15 ±	6,54	< 0,48	< 0,51	0
		BV GND	105	17,62 ±	2,26	-1,43 ±	1,49	-0,99 ±	1,12	< 0,06	< 0,08	2
		BV GPD	105	4,69 ±	4,25	-2,88 ±	2,80	0,69 ±	2,10	< 0,05	< 0,52	3

^a Médias do genótipo AA da LGB ou CC do GH.

^b Efeito médio de substituição alélica (kg), ou seja, o efeito de substituir alelo A por B ou C por D.

^c Desvio de dominância (kg), diferença entre a média observada do heterozigoto e a média estimada.

^d Coeficiente de determinação, significa a porcentagem de variação que é explicada pelo genótipo.

Apesar dos resultados da análise de variância terem sido significativos em algumas características, a variância explicada pelos modelos (R^2) foram muito baixas, conforme mostrado nas Tabelas 17, 18 e 19. Isso mostra que grande parte da variação foi devido à outros efeitos não conhecidos, seja ambiental ou atribuído à outros genes. O baixo coeficiente de determinação do modelo caracteriza efeitos poligênicos, onde a influência individual dos genes é baixa, entretanto quando agregados é alta. Outros trabalhos obtiveram baixo R^2 , caracterizando a susceptibilidade aos erros tipos I e II. BEEVER *et al.* (1989) obteve apenas 3 % de aumento no R^2 , após acrescentar o genótipo, para explicar características de crescimento (ganho de peso médio diário e peso aos 205 dias). ROCHA *et al.* (1992) obteve valores de 8%, para explicar o peso à desmama de bezerros, como uma característica materna, afetada pelo genótipo. MOODY *et al.* (1996), obteve valores mais altos (16%), utilizando marcadores associados com peso ao nascimento de bezerros Hereford.

Os resultados obtidos pelo modelo III (Tabelas 23-25) confirmam que grande parte das associações obtidas pelos modelos anteriores foram devidos à fatores de confundimento, principalmente com relação ao efeito do pai. Quando não se utiliza o efeito do pai na análise, grande parte da associação atribuída ao marcador, na verdade é devido à outros efeitos, especialmente efeitos poligênicos, que diferenciam os valores genéticos dos indivíduos. Quando se quer atribuir um efeito quantitativo à um determinado marcador, a variação existente entre os indivíduos de genótipos diferentes deve ser analisada dentro de família, a fim de evitar o confundimento existente entre diferenças quantitativas existentes através de famílias.

Observa-se que a análise por meio do modelo III aumentou o R^2 em todos os casos analisados, conforme mostrado nas Tabelas 23 a 25. Grande parte da variação existente é devido ao efeito de touro, já que existe variabilidade genética, portanto, há diferença entre produtos filhos de diferentes touros. Nos casos onde o marcador mostrou efeito significativo (Tabela 24), foi devido à variação existente entre genótipos dos produtos filhos

de touros diferentes (por exemplo, genótipo AA do touro 1 x genótipo BB do touro 2). Quando os dados foram analisados por touro observou-se que não havia diferença significativa entre progênes de genótipos diferentes (dados não mostrados). Portanto, este modelo mostrou-se mais adequado para explicar o efeito dos marcadores sobre as características estudadas, sendo que os resultados obtidos em bezerros, mostram que não existem diferenças entre progênes de genótipos diferentes, nas famílias estudadas.

TABELA 23

Análise de variância do peso ao nascimento (PN), valor genético para ganho de peso do nascimento ao desmame (BV GND) e valor genético para ganho de peso pós-desmame (BV GPD) em bezerros, por meio do modelo III.

Raças	Fontes de Variação	GL	continua					
			PN		BV GND		BV GPD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	TOURO	5	26,61	0,01	371,87	0,01	852,52	0,01
	CSN3(T)	7	9,88	0,37	9,13	0,70	96,60	0,35
	ERRO	211	9,00		13,69		85,52	
	R ² (%)		13,61		63,22		36,18	
	CV (%)		9,57		2,01		15,73	
	TOURO	5	46,59	0,01	622,61	0,01	1585,23	0,01
	LGB(T)	10	5,37	0,83	14,73	0,38	117,13	0,16
	ERRO	203	9,19		13,62		80,65	
	R ² (%)		13,55		62,76		39,87	
	CV (%)		9,67		2,01		15,28	
	TOURO	5	12,98	0,21	261,12	0,01	680,22	0,01
	GH(T)	7	5,18	0,77	18,47	0,21	62,82	0,66
	ERRO	207	8,98		13,35		87,90	
	R ² (%)		12,93		63,31		35,78	
	CV (%)		9,56		1,99		16,02	
SINE	TOURO	2	18,45	0,09	325,98	0,01	901,51	0,01
	CSN3(T)	4	8,82	0,31	3,49	0,94	88,33	0,48
	ERRO	105	7,33		17,22		99,85	
	R ² (%)		13,08		54,37		32,26	
	CV (%)		8,57		2,23		17,84	
	TOURO	2	34,56	0,01	669,67	0,01	2229,67	0,01
	LGB(T)	5	2,67	0,88	23,53	0,22	139,25	0,21
	ERRO	106	7,47		16,32		95,76	
	R ² (%)		11,27		56,40		34,77	
	CV (%)		8,66		2,18		17,56	

Raças	Fontes de Variação	GL	continuação					
			PV		BV/GND		BV/GPD	
			QM	P>F	QM	P>F	QM	P>F
SINE	TOURO	2	1,77	0,79	292,47	0,01	625,17	0,01
	GH(T)	3	4,09	0,65	24,61	0,22	130,73	0,26
	ERRO	107	7,44		16,35		95,33	
	R ² (%)		10,55		56,44		34,67	
	CV (%)		8,64		2,18		17,44	
NE	TOURO	2	44,87	0,02	483,68	0,01	834,83	0,01
	CSN3(T)	3	11,29	0,37	16,65	0,19	107,63	0,22
	ERRO	106	10,66		10,20		71,33	
	R ² (%)		13,20		63,41		31,69	
	CV (%)		10,49		1,76		13,71	
	TOURO	2	81,15	0,01	735,07	0,01	1212,78	0,01
	LGB(T)	5	8,07	0,60	5,93	0,73	95,01	0,20
	ERRO	97	11,07		10,66		64,14	
	R ² (%)		14,54		61,44		34,48	
	CV (%)		10,68		1,80		12,91	
	TOURO	2	28,56	0,07	318,86	0,01	534,44	0,01
	GH(T)	4	6,00	0,69	13,87	0,25	11,89	0,96
	ERRO	100	10,63		10,14		80,13	
	R ² (%)		13,81		61,44		28,52	
	CV (%)		10,48		1,75		14,61	

TABELA 24

Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND) e ganho de peso pós-desmame (GPD) em bezerros, com o modelo III.

Raças	Fontes de Variação	GL	continua			
			GND		GPD	
			QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	GC	12	951,90	0,01	10415,93	0,01
	TOURO	5	3723,30	0,01	4263,40	0,01
	CSN3(T)	7	420,95	0,21	1379,79	0,09
	ERRO	199	302,94		777,22	
	R ² (%)		45,12		57,44	
	CV (%)		9,19		14,68	
	GC	12	832,54	0,01	10200,33	0,01
	TOURO	5	4202,68	0,01	4427,01	0,01
	LGB(T)	10	427,26	0,16	340,58	0,93
	ERRO	191	296,33		779,08	
	R ² (%)		45,63		57,63	
	CV (%)		9,10		14,73	
	GC	12	939,91	0,01	7324,07	0,01
	TOURO	5	1716,83	0,01	4386,53	0,01
	GH(T)	7	374,19	0,27	876,30	0,27
	ERRO	195	297,86		689,68	
	R ² (%)		45,79		60,04	
	CV (%)		9,09		13,83	
SINE	GC	6	1177,80	0,01	18608,04	0,01
	TOURO	2	645,33	0,22	926,17	0,22
	CSN3(T)	4	485,26	0,33	607,83	0,40
	ERRO	99	416,15		593,24	
	R ² (%)		20,36		68,95	
	CV (%)		10,14		13,83	
	GC	6	1032,41	0,02	1826,23	0,01
	TOURO	2	190,62	0,62	1584,57	0,07
	LGB(T)	5	505,08	0,28	311,01	0,75
	ERRO	100	392,93		586,88	
	R ² (%)		21,26		68,64	
	CV (%)		9,87		13,81	
	GC	6	1263,63	0,01	14928,35	0,01
	TOURO	2	820,56	0,13	2716,78	0,01
	GH(T)	3	629,40	0,20	1549,99	0,03
	ERRO	101	399,49		513,15	
	R ² (%)		20,96		72,40	
	CV (%)		9,93		12,84	

continuação						
Raças	Fontes de Variação	GL	GND		GPD	
			QM	P> F	QM	P> F
NE	GC	10	789,77	0,01	2637,32	0,01
	TOURO	2	163,44	0,37	1248,18	0,24
	C.SN3(T)	3	123,72	0,52	2661,08	0,03
	ERRO	96	161,92		863,61	
	R ² (%)		41,75		36,85	
	CV (%)		7,17		14,42	
	GC	10	719,24	0,01	2486,70	0,01
	TOURO	2	172,83	0,34	3597,20	0,02
	LGB(T)	5	214,90	0,25	149,93	0,97
	ERRO	87	159,87		898,12	
	R ² (%)		44,06		33,00	
	CV (%)		7,11		14,63	
	GC	10	758,95	0,01	932,94	0,32
	TOURO	2	35,04	0,79	2445,04	0,05
	GH(T)	4	123,67	0,53	316,33	0,81
	ERRO	90	153,80		796,08	
	R ² (%)		44,81		32,37	
	CV (%)		6,98		13,81	

TABELA 25

Análise de variância do peso inicial (PINI), peso final (PFINI), idade inicial (IDINI), idade final (IDFIM), dias para atingir 450 kg e ganho de peso médio diário (GPMD) em confinamento, utilizando o modelo III.

Raças	Fontes de Variação	GL	continua									
			PFIM		IDINI		IDFIM		D450		GPMD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	PINI	1	4466,21	0,04	2298,30	0,01	2515,97	0,07	21323,79	0,01	0,04	0,13
	TOURO	6	714,90	0,64	993,09	0,01	1877,17	0,03	1023,80	0,01	0,08	0,01
	CSN3(T)	7	812,01	0,58	108,95	0,55	596,88	0,60	234,73	0,44	0,01	0,47
	ERRO	157	1002,75		129,26		757,90		237,88		0,02	
	R ² (%)		14,14		34,33		23,38		61,57		26,69	
	CV (%)		7,07		4,30		6,60		9,97		9,42	
	PINI	1	5673,56	0,02	2200,94	0,01	1948,86	0,11	20768,34	0,01	0,03	0,19
	TOURO	6	951,44	0,47	1411,83	0,01	2274,38	0,01	1652,45	0,01	0,12	0,01
	LGB(T)	10	743,65	0,69	121,69	0,49	509,27	0,76	260,56	0,36	0,02	0,27
	ERRO	154	1010,90		128,83		766,72		236,27		0,02	
	R ² (%)		15,10		35,80		23,97		62,57		29,25	
	CV (%)		7,09		4,29		6,63		9,93		9,34	
	PINI	1	4104,07	0,05	2638,16	0,01	2025,70	0,10	20091,58	0,01	0,06	0,05
	TOURO	6	969,38	0,45	637,60	0,01	1306,47	0,12	590,22	0,03	0,04	0,01
	GH(T)	6	652,14	0,69	60,28	0,84	727,41	0,45	222,18	0,47	0,01	0,50
	ERRO	158	1007,61		130,98		751,92		238,34		0,02	
	R ² (%)		13,18		33,03		23,50		61,26		26,08	
	CV (%)		7,08		4,32		6,57		9,98		9,43	
SINE	PINI	1	9760,39	0,01	744,43	0,01	22,77	0,87	10593,76	0,01	0,07	0,03
	TOURO	2	1249,57	0,41	724,78	0,01	2504,41	0,05	856,30	0,01	0,07	0,01
	CSN3(T)	4	1511,93	0,37	198,71	0,11	890,98	0,37	191,27	0,31	0,01	0,39
	ERRO	84	1404,86		102,75		822,92		156,10		0,01	
	R ² (%)		11,69		25,26		11,26		49,69		22,76	
	CV (%)		8,21		3,87		7,03		8,80		8,96	

continuação												
Raças	Fontes de Variação	GL	PFIM		IDINI		IDFIM		D450		GPMD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
SINE	TOURO	2	940,31	0,52	291,90	0,07	1027,59	0,30	1206,79	0,01	0,11	0,01
	LGB(T)	5	1221,72	0,51	102,54	0,45	649,57	0,60	218,25	0,23	0,02	0,18
	ERRO	83	1421,05		107,38		836,65		154,05		0,01	
	R ² (%)		11,74		22,82		10,86		50,94		25,93	
	CV (%)		8,26		3,96		7,09		8,75		8,83	
	PINI	1	8518,30	0,02	1045,75	0,01	30,65	0,85	10726,24	0,01	0,09	0,01
	TOURO	2	141,44	0,91	214,24	0,14	1749,98	0,13	441,94	0,07	0,04	0,08
	GH(T)	2	216,69	0,86	95,03	0,42	968,65	0,31	146,89	0,40	0,01	0,44
	ERRO	86	1437,47		107,39		822,70		157,95		0,01	
	R ² (%)		7,49		20,02		9,18		47,88		20,51	
	CV (%)		8,30		3,96		7,03		8,57		8,98	
NE	PINI	1	703,03	0,22	2038,91	0,01	6766,16	0,01	11741,99	0,01	0,00	0,63
	TOURO	3	199,01	0,73	831,59	0,01	496,05	0,51	961,96	0,04	0,06	0,01
	CSN3(T)	3	42,61	0,96	20,05	0,94	258,42	0,75	307,10	0,42	0,01	0,45
	ERRO	79	464,25		155,25		633,21		322,55		0,02	
	R ² (%)		6,09		36,99		23,17		39,65		25,11	
	CV (%)		4,91		4,65		5,87		10,59		9,85	
	PINI	1	489,72	0,30	1806,96	0,01	6234,78	0,01	11249,92	0,01	0,00	0,62
	TOURO	3	29,58	0,98	1656,67	0,01	2050,05	0,03	1375,48	0,01	0,09	0,01
	LGB(T)	5	407,84	0,48	136,61	0,48	403,91	0,67	282,45	0,51	0,01	0,50
	ERRO	70	450,21		150,79		633,53		324,75		0,02	
	R ² (%)		11,46		40,50		25,26		40,92		26,94	
	CV (%)		4,84		4,58		5,88		10,63		9,87	
	PINI	1	556,54	0,26	1959,07	0,01	5381,87	0,01	10084,68	0,01	0,00	0,92
	TOURO	3	1049,76	0,07	933,73	0,01	1175,82	0,14	871,83	0,06	0,06	0,01
	GH(T)	4	736,12	0,16	36,39	0,92	425,52	0,61	197,49	0,66	0,01	0,58
	ERRO	71	431,12		156,24		629,08		328,94		0,02	
	R ² (%)		14,00		37,47		24,73		39,30		25,36	
	CV (%)		4,74		4,67		5,86		10,70		9,91	

4.5.2. Associação dos marcadores com características quantitativas em vacas de corte

Um grupo de vacas compostas de NE e SINE que tinham registros zootécnicos suficientes para estudo de associação com os marcadores foram analisadas. A Tabela 26 mostra os quadrados mínimos para todas as características medidas com suas respectivas fontes de variação conhecidas e a probabilidade de cada fonte de variação. A CSN3 não foi significativa apenas sobre o BV GPD em SINE. A LGB mostrou diferença significativa para GPD, BV CRP, BV GND e BV GPD. Nas vacas SINE a LGB influenciou significativamente o GPD, enquanto que nas NE o efeito da LGB foi significativo sobre o BV CRP, BV GND e BV GPD. O GH foi significativo apenas com os dados analisados em conjunto, onde teve diferença no GND, BV CRP, BV GND e BV GPD, entretanto, tal resultado reflete a diferença das freqüências genóticas e desempenho zootécnico entre SINE e NE.

As médias ajustadas são mostradas na Tabela 27, onde observa-se que o genótipo AA da CSN3 nas vacas SINE foi pior do que o genótipo AB para BV GPD. No caso da LGB, pode-se ver que o genótipo AB da LGB foi superior ao BB para GPD, entretanto inferior para as outras características (BV CRP e BV GND). Nas vacas NE os BV CRP e GND também foram maiores para o genótipo BB, enquanto que no BV GPD o genótipo AB foi superior ao BB, sem diferir entretanto, do genótipo AA. O efeito do GH também é BB, sem diferir entretanto, do genótipo AA. O efeito do GH também é mostrado, onde reporta-se que em todas as características em que foi significativo (GND, BV CRP e BV GND) o genótipo DD foi superior ao CD. Nesse caso, também ocorreu superestimativa do efeito do GH devido à diferença na freqüência alélica no NE e SINE e menor valor quantitativo das características devido à correção para heterose.

O efeito de substituição alélica em vacas somente foi significativo para a LGB nas vacas NE e para o GH com as vacas agrupadas (Tabela 28). No caso do GH, a substituição de C por D aumentou o GND, BV CRP e BV GND, entretanto, diminuiu o GPD. Contudo, esse efeito foi superestimado, conforme discutido acima. No GPD ocorreu o contrário das outras

características, pois o valor quantitativo é maior para as vacas SINE e essas têm maior frequência do alelo C do que nas vacas NE. Por isso na estimativa do efeito de substituição alélica a troca de C por D no GPD ocorreu diminuição do valor da característica. A LGB nas vacas NE teve efeito de substituição alélica, onde a troca do alelo A por B aumentou o BV CRP e BV GND, enquanto que no BV GPD o efeito foi o contrário. Ademais houve desvio de dominância significativo em duas características (BV CRP e BV GND), sendo que o alelo A mostrou-se dominante sobre o alelo B ($d < 0$).

A Tabela 29 mostra os resultados obtidos pelo modelo III, onde pode-se ver que o R^2 também aumentou em todas as características estudadas, sendo que novamente o touro (pai da vaca), foi responsável por grande parte da variação. Na LGB os resultados mostram efeito significativo, entretanto, após analisar os dados por touro, constatou-se o mesmo fato ocorrido nos bezerros, ou seja, a variação ocorrida foi devido ao contraste entre genótipos de touros diferentes, mostrando o efeito significativo em função dos outros genes que são responsáveis pelo melhor ou pior desempenho das filhas daqueles touros. Assim, novamente constatou-se que no número de famílias estudadas não existiu associação entre os marcadores e as características quantitativas estudadas.

TABELA 26

Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em vacas de corte, resultante do modelo I.

continua

Raças	Fontes de Variação	GL	GND		GPD		BV CRP		BV GND		BV GPD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	CSN3	2	180,36	0,67	5080,28	0,22	29,13	0,53	14,19	0,50	33,04	0,16
	ERRO	284	454,09		3334,30		45,58		14,19		17,74	
	R ² (%)		0,28		1,14		0,45		0,49		1,40	
	CV (%)		13,42		64,04		4,00		2,70		6,86	
	LGB	2	128,06	0,76	15936,50	0,01	168,72	0,02	84,01	0,01	50,22	0,06
	ERRO	251	469,95		3063,79		42,02		18,47		17,70	
	R ² (%)		0,22		4,26		3,10		3,50		2,39	
	CV (%)		13,64		65,79		3,84		2,56		6,84	
	GH	2	3673,19	0,01	7775,19	0,07	261,66	0,01	118,05	0,01	0,24	0,99
	ERRO	140	384,62		2836,92		40,39		18,56		20,94	
	R ² (%)		12,00		3,99		8,47		8,33		0,02	
	CV (%)		12,29		67,08		3,75		2,56		7,43	
SINE	CSN3	2	98,08	0,80	5025,73	0,38	9,77	0,63	4,09	0,60	61,57	0,03
	ERRO	97	435,98		5146,00		20,97		7,98		17,05	
	R ² (%)		0,46		2,17		0,96		1,05		7,75	
	CV (%)		13,95		68,72		2,72		1,69		6,72	
	LGB	2	561,34	0,27	11622,51	0,09	24,07	0,31	9,06	0,32	14,71	0,43
	ERRO	96	424,24		4785,59		20,07		7,77		17,25	
	R ² (%)		2,68		5,23		2,43		2,37		1,94	
	CV (%)		13,67		68,32		2,69		1,67		6,76	
	GH	2	36,29	0,93	2264,69	0,63	12,33	0,51	4,67	0,51	20,86	0,37
	ERRO	56	499,86		4873,35		17,94		6,88		20,44	
	R ² (%)		0,26		1,76		2,40		2,37		37,78	
	CV (%)		15,10		73,72		2,54		1,58		7,41	

continuação												
Raças	Fontes de Variação	GL	GND		GPD		BV CRP		BV GND		BV GPD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
NE	CSN3	2	13,14	0,97	2462,16	0,34	11,45	0,82	6,23	0,79	2,77	0,86
	ERRO	184	402,02		2281,37		57,56		26,51		18,02	
	R ² (%)		0,04		1,23		0,22		0,25		0,18	
	CV (%)		12,25		57,68		4,48		3,06		6,92	
	LGB	2	219,98	0,60	3158,32	0,17	328,67	0,01	156,36	0,01	49,88	0,07
	ERRO	152	427,77		1781,82		51,13		23,06		18,12	
	R ² (%)		0,67		2,42		7,80		8,19		3,71	
	CV (%)		12,60		57,46		4,21		2,85		6,91	
	GH	1	81,67	0,56	127,83	0,76	0,39	0,93	0,11	0,95	31,20	0,22
	ERRO	82	240,02		1413,49		52,26		25,01		20,49	
	R ² (%)		0,41		0,12		0,00		0,00		1,91	
	CV (%)		9,24		54,58		4,22		2,95		7,31	

TABELA 27

Médias ajustadas do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em vacas de corte, por meio do modelo I.

Raças	Genes	GEN	n	continua									
				GND		GPD		BV CRP		BV GND		BV GPD	
				kg ±	i.c.	kg ±	i.c.	kg ±	i.c.	kg ±	i.c.	kg ±	i.c.
AMBAS	CSN3 (n= 287)	AA	231	159,32 ±	2,74	87,44 ±	7,72	1,34 ±	0,86	1,77 ±	0,59	-0,13 ±	0,57
		AB	53	156,51 ±	5,88	99,90 ±	16,56	0,80 ±	1,87	1,00 ±	1,24	0,80 ±	1,20
		BB	3	161,33 ±	85,67	126,33 ±	232,21	2,01 ±	27,16	2,58 ±	18,18	3,31 ±	16,92
	LGB (n= 254)	AA	16	162,63 ±	11,55	70,06 ±	29,49 ^{ab}	2,13 ±	3,45 ^{ab}	2,83 ±	2,28 ^{ab}	0,71 ±	2,24 ^{ab}
		AB	99	158,31 ±	4,33	98,84 ±	11,59 ^a	0,68 ±	1,29 ^a	0,83 ±	0,85 ^a	0,99 ±	0,89 ^a
		BB	139	158,94 ±	3,61	75,74 ±	9,49 ^b	1,83 ±	1,08 ^b	2,45 ±	0,71 ^b	-0,36 ±	0,73 ^b
	GH (n= 143)	CC	4	161,25 ±	31,22 ^{ab}	103,75 ±	84,74	2,70 ±	10,12 ^{ab}	1,68 ±	6,84 ^{ab}	-0,07 ±	7,29
		CD	70	152,71 ±	4,67 ^a	88,89 ±	13,30	1,40 ±	1,52 ^a	0,94 ±	1,02 ^a	0,29 ±	1,14
		DD	69	166,97 ±	4,71 ^b	68,88 ±	13,00	5,28 ±	1,54 ^b	3,55 ±	1,04 ^b	0,26 ±	1,12
SINE	CSN3 (n= 100)	AA	71	149,76 ±	4,95	101,28 ±	7,33	0,47 ±	1,08	0,59 ±	1,28	-0,46 ±	1,04 ^a
		AB	27	148,78 ±	8,27	106,88 ±	10,40	0,38 ±	1,81	0,47 ±	2,20	1,30 ±	1,71 ^b
		BB	2	159,00 ±	187,54	172,50 ±	275,97	2,00 ±	40,91	2,56 ±	73,06	5,94 ±	37,10 ^{ab}
	LGB (n= 98)	AA	4	154,40 ±	29,31	90,20 ±	98,45	1,12 ±	6,36	1,44 ±	3,98	-1,15 ±	5,92
		AB	45	154,02 ±	6,19	118,88 ±	21,78	0,87 ±	1,35	1,06 ±	0,85	0,71 ±	1,35
		BB	49	147,33 ±	5,92	86,42 ±	20,75	0,13 ±	1,29	0,25 ±	0,81	-0,29 ±	1,25
	GH (n= 59)	CC	4	151,25 ±	35,57	103,75 ±	111,05	1,35 ±	7,67	1,68 ±	4,17	-0,07 ±	7,19
		CD	54	147,69 ±	6,11	95,26 ±	19,81	0,10 ±	1,16	0,14 ±	0,72	-0,19 ±	1,28
		DD	1	153,00 ±	n.e.	30,00 ±	n.e.	0,71 ±	n.e.	0,92 ±	n.e.	-6,70 ±	n.e.

Raças	Genes	GEN	n	GND	
				kg ±	i.c.
WZ	CSN3 (n= 187)	AA	160	163,57 ±	3,12
		AB	26	164,54 ±	8,10
		BB	1	166,00 ±	n.e.
	LGB (n= 155)	AA	11	166,36 ±	13,90
		AB	54	161,89 ±	5,64
		BB	90	165,26 ±	4,34
	GH (n= 84)	CD	16	169,69 ±	8,2
		DD	68	167,18 ±	3,76

^{a,b,c} Médias com diferentes sobrescritos, são diferentes ($P < 0,05$).

n.e. = > intervalo de confiança não estimável.

continuação

GPD		BV CRP		BV GND		BV GPD	
kg ±	i.c.	kg ±	i.c.	kg ±	i.c.	kg ±	i.c.
81,58 ±	7,62	3,45 ±	1,18	2,29 ±	0,80	0,30 ±	0,69
92,63 ±	20,09	2,45 ±	3,07	1,55 ±	2,08	0,28 ±	1,79
34,00 ±	n.e.	4,06 ±	n.e.	2,62 ±	n.e.	-1,96 ±	n.e.
60,91 ±	28,36	5,18 ±	4,81 ^{ab}	3,46 ±	3,23 ^{ab}	1,55 ±	2,85 ^{ab}
82,08 ±	12,10	1,07 ±	1,95 ^a	0,65 ±	1,30 ^a	1,21 ±	1,22 ^a
70,15 ±	9,06	5,42 ±	1,49 ^b	3,65 ±	1,02 ^b	-0,40 ±	0,92 ^b
66,14 ±	21,4	5,51 ±	3,9	3,68 ±	2,7	4,84 ±	21,4
69,47 ±	9,25	5,33 ±	1,76	3,58 ±	1,22	8,17 ±	9,25

TABELA 28

Efeito de substituição alélica sobre o ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD).

Genes	Raça	Caract.	a ^a		b ^b		d ^c		P (b=0)	P (d=0)	R ² (%) ^d
CSN3	AMBAS (n=265)	GND	159,69 ±	2,80	-2,31 ±	5,84	-0,80 ±	5,28	< 0,44	< 0,77	0
		GPD	86,38 ±	7,64	14,72 ±	15,93	-1,28 ±	14,39	< 0,07	< 0,86	0
		BV CRP	2,61 ±	0,92	-0,70 ±	1,92	-0,34 ±	1,74	< 0,48	< 0,70	0
		BV GND	1,73 ±	0,63	-0,52 ±	1,29	-0,23 ±	1,16	< 0,43	< 0,70	0
		BV GPD	-0,15 ±	0,57	1,10 ±	1,17	-0,15 ±	1,06	< 0,07	< 0,78	0
LGB	AMBAS (n=235)	GND	159,97 ±	7,08	-0,43 ±	4,39	-0,94 ±	3,47	< 0,85	< 0,60	0
		GPD	96,23 ±	18,54	-8,66 ±	11,49	9,53 ±	9,08	< 0,14	< 0,04	0
		BV CRP	1,42 ±	2,22	0,91 ±	1,37	-1,03 ±	1,09	< 0,20	< 0,06	0
		BV GND	0,85 ±	1,47	0,67 ±	0,92	-0,73 ±	0,72	< 0,15	< 0,05	0
		BV GPD	1,59 ±	1,39	-0,92 ±	0,86	0,32 ±	0,69	< 0,04	< 0,36	1
GH	AMBAS (n=135)	GND	141,21 ±	9,43	12,37 ±	6,00	-1,28 ±	4,35	< 0,01	< 0,57	10
		GPD	107,63 ±	25,28	-19,27 ±	16,13	0,48 ±	11,69	< 0,02	< 0,94	3
		BV CRP	-1,10 ±	3,09	2,97 ±	1,96	-0,47 ±	1,43	< 0,01	< 0,52	5
		BV GND	-0,76 ±	2,10	2,01 ±	1,33	-0,30 ±	0,97	< 0,01	< 0,55	5
		BV GPD	0,23 ±	2,18	0,02 ±	1,39	0,04 ±	1,01	< 0,97	< 0,94	0
LGB	SNE (n=89)	GND	157,61 ±	11,52	-5,45 ±	7,34	0,84 ±	5,51	< 0,15	< 0,76	1
		GPD	124,29 ±	38,53	-17,05 ±	24,56	8,75 ±	18,39	< 0,17	< 0,35	1
		BV CRP	2,83 ±	2,53	-1,36 ±	1,61	-0,66 ±	1,21	< 0,10	< 0,28	2
		BV GND	1,77 ±	1,57	-0,84 ±	1,00	0,08 ±	0,75	< 0,10	< 0,83	2
		BV GPD	0,62 ±	2,29	-0,36 ±	1,47	0,45 ±	1,10	< 0,63	< 0,42	0
	NE (n=146)	GND	163,10 ±	8,11	1,37 ±	4,94	-1,42 ±	4,03	< 0,59	< 0,49	0
		GPD	77,23 ±	17,89	-2,51 ±	10,92	7,35 ±	8,89	< 0,65	< 0,11	0
		BV CRP	0,96 ±	3,10	1,97 ±	1,88	-1,63 ±	1,54	< 0,04	< 0,04	2
		BV GND	0,55 ±	2,10	1,37 ±	1,27	-1,30 ±	1,04	< 0,04	< 0,02	2
		BV GPD	2,18 ±	1,78	-1,25 ±	1,10	0,28 ±	0,89	< 0,03	< 0,53	3

^a Médias do genótipo AA da CSN3 e LGB ou CC do GH.

^b Efeito médio de substituição alélica (kg), ou seja efeito de substituir alelo A por B ou C por D.

^c Desvio de dominância (kg), diferença entre a média observada do heterozigoto e a média estimada.

^d Coeficiente de determinação, significa a porcentagem de variação que é explicada pelo genótipo.

TABELA 29

Análise de variância do ganho de peso do nascimento ao desmame (GND), ganho de peso pós-desmame (GPD), valor genético para capacidade real de produção (BV CRP), valor genético para GND (BV GND) e valor genético para GPD (BV GPD) em vacas de corte, por meio do modelo III.

Raças	Fontes de Variação	GL	continua									
			GND		GPD		BV CRP		BV GND		BV GPD	
			QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F	QM	P> F
AMBAS	TOURO	11	829,59	0,01	11797,38	0,01	89,48	0,01	41,26	0,01	14,44	0,59
	CNS3(T)	11	318,06	0,55	2976,15	0,43	24,76	0,72	9,91	0,79	29,15	0,07
	ERRO	241	355,76		2920,15		34,41		15,45		16,98	
	R ² (%)		25,00		21,29		3,60		24,21		9,51	
	CV (%)		11,88		61,43		3,60		2,43		6,72	
	TOURO	10	977,43	0,01	8502,30	0,01	117,49	0,01	51,26	0,01	15,64	0,52
	LGB(T)	17	341,82	0,51	2842,27	0,40	63,31	0,01	29,79	0,01	18,91	0,36
	ERRO	222	357,21		2684,32		32,06		14,37		17,20	
	R ² (%)		27,00		24,80		32,69		32,44		10,04	
	CV (%)		11,89		61,53		3,48		2,34		6,75	
	TOURO	10	1260,91	0,01	4047,96	0,15	145,07	0,01	63,23	0,01	19,65	0,46
	GH(T)	8	74,61	0,99	1276,20	0,87	23,89	0,67	10,14	0,73	16,39	0,58
	ERRO	123	327,05		2665,84		33,06		15,48		19,92	
	R ² (%)		34,32		20,31		33,57		32,18		12,40	
	CV (%)		11,34		64,79		3,52		2,42		7,26	

continuação												
Raças	Fontes de Variação	GL	GND		GPD		BV CRP		BV GND		BV GPD	
			QM	P>F	QM	P>F	QM	P>F	QM	P>F	QM	P>F
SINE	TOURO	3	1329,94	0,02	22490,10	0,01	79,18	0,01	33,14	0,01	33,66	0,08
	CNS3(T)	5	395,61	0,40	4674,64	0,41	25,26	0,24	10,16	0,23	49,77	0,01
	ERRO	91	382,52		4580,68		18,37		7,28		14,71	
	R ² (%)		18,01		18,97		18,00		18,54		16,45	
	CV (%)		13,06		64,86		2,66		1,68		6,25	
	TOURO	3	812,40	0,11	17300,15	0,01	75,55	0,01	31,64	0,01	17,22	0,37
	LGB(T)	8	194,24	0,85	3215,21	0,65	9,63	0,85	4,30	0,80	12,92	0,60
	ERRO	87	387,82		4316,02		18,93		7,48		16,10	
	R ² (%)		19,42		23,38		17,54		18,28		8,33	
	CV (%)		13,06		64,90		2,70		2,70		6,54	
	TOURO	3	489,73	0,38	5396,05	0,34	44,87	0,05	16,89	0,06	11,01	0,63
	GH(T)	4	31,38	0,99	1771,41	0,82	5,22	0,86	2,36	0,82	8,16	0,78
	ERRO	51	464,61		4705,57		16,11		6,27		18,86	
	R ² (%)		15,89		14,35		21,94		22,43		14,39	
	CV (%)		14,56		72,50		2,50		1,56		7,13	
NE	TOURO	7	266,72	0,60	4658,29	0,34	87,24	0,06	41,16	0,06	6,66	0,92
	CNS3(T)	6	253,44	0,61	1560,75		24,35	0,77	9,70	0,83	11,97	0,69
	ERRO	150	339,52		1954,87		44,14		20,40		18,35	
	R ² (%)		13,75		15,19		21,61		20,18		5,67	
	CV (%)		11,21		56,47		4,05		2,77		6,99	
	TOURO	6	614,19	0,10	1822,36	0,37	139,60	0,01	61,35	0,01	14,19	0,58
	LGB(T)	9	473,00	0,19	2510,77	0,15	111,02	0,01	52,46	0,01	24,23	0,22
	ERRO	135	337,48		1669,33		40,52		18,81		17,92	
	R ² (%)		18,51		14,22		32,49		31,49		10,93	
	CV (%)		11,19		55,75		3,88		2,66		6,88	
	TOURO	6	466,13	0,07	3054,59	0,05	121,80	0,02	52,93	0,04	18,74	0,50
	GH(T)	4	117,85	0,73	780,99	0,66	42,55	0,44	17,92	0,52	24,63	0,32
	ERRO	72	229,62		1276,46		45,06		22,01		20,68	
	R ² (%)		16,26		19,22		23,69		21,90		9,43	
	CV (%)		9,04		51,56		4,06		2,87		7,35	

Conforme mostrado na Tabela 30, alguns trabalhos têm atribuído uma maior produção de leite ao alelo A da CSN3 e LGB, proteína aos alelos B da CSN3 e A da LGB e gordura ao alelo A da CSN3, enquanto que o alelo C do GH foi atribuído à maior produção de leite, proteína e gordura. Contudo os resultados obtidos não revelaram efeitos desses marcadores sobre as características estudadas. Como os dados analisados não são balanceados, (o que normalmente é impossível quando se trabalha com dados de campo), quando a análise é conduzida através de famílias (modelos I e II), se a frequência de um determinado genótipo coincide com a maior frequência de progênes de touros geneticamente superiores, ocorre um favorecimento do genótipo mais freqüente, onde na análise de variância os efeitos ficam confundidos, não havendo, portanto, separação dos efeitos poligênicos. Por isso o conhecimento prévio do genótipo do touro (pai) é importante e a análise deve ser conduzida dentro de família à partir daqueles touros heterozigotos a fim de se evitar tais confundimentos. MOODY *et al.* (1996), encontraram associação significativa através do modelo de substituição alélica, entretanto não conseguiram o mesmo resultado quando utilizaram um modelo animal, onde testaram efeitos genéticos aditivos e não aditivos. O modelo de substituição alélica (modelo II) deve ser utilizado dentro de família, senão tem a mesma fragilidade do modelo I. Mesmo quando utilizado dentro de famílias o modelo de substituição alélica tem certas limitações, essencialmente referentes à origem dos alelos quando a progênie é heterozigota. Quando a análise é conduzida através de famílias, pressupõe-se que os gametas dos parentais tenham valores idênticos o que na realidade não é verdade. Ademais, se o objetivo é encontrar um gene de grande efeito, é mais lógico que se teste o desempenho dos animais dentro de famílias. Se existir algum gene de grande efeito segregando com um segmento cromossômico, tal efeito será detectado quando se contrasta o desempenho de progênes que tenham herdado segmentos cromossômicos diferentes dos parentais.

TABELA 30

Sumário de trabalhos com associação estatística ($P < 0,05$) entre CSN3, LGB ou GH e características de importância econômica em gado de corte e leite. *

Genes	Referências	Leite (kg)	Prot (kg)	Gord (kg)	Prot (%)	Gord (%)	PNd (kg)	PNm (Kg)	GNDd (Kg)	GNDm (Kg)	GPd (kg)
CSN3	ALEANDRI <i>et al.</i> , 1990	ns	B	ns	B	ns	-	-	-	-	-
	BOVENHUIS <i>et al.</i> , 1992	A	ns	A	B	ns	-	-	-	-	-
	COWAN <i>et al.</i> , 1992	ns	ns	ns	ns	A	-	-	-	-	-
	EENENNAAM & MEDRANO, 1991	ns	B	ns	ns	ns	-	-	-	-	-
	MOODY <i>et al.</i> , 1996	-	-	-	-	-	A	A	A	A	ns
LGB	GELDERMANN <i>et al.</i> , 1985	A	ns	ns	ns	B	-	-	-	-	-
	ALEANDRI <i>et al.</i> , 1990	ns	A	ns	ns	B	-	-	-	-	-
	BOVENHUIS <i>et al.</i> , 1992	A	A	ns	ns	B	-	-	-	-	-
	COWAN <i>et al.</i> , 1992	ns	A	ns	ns	B	-	-	-	-	-
	FAMULA & MEDRANO, 1994	ns	ns	ns	B	ns	-	-	-	-	-
	MOODY <i>et al.</i> , 1996	-	-	-	-	-	A	A	B	ns	ns
GH	MOODY <i>et al.</i> , 1996 ^a	-	-	-	-	-	ns	A	ns	B	B
	YAO <i>et al.</i> , 1996 ^b	C, E	C, E	C, E	-	-	-	-	-	-	-
	LAGZEL <i>et al.</i> , 1996 ^c	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-

* Produção de leite (leite, kg), proteína (prot, kg e %), gordura (gord, kg e %), peso ao nascer direto e materno (GNDd e GNDm), ganho do nascimento desmame direto e materno (GNDd e GNDm) e ganho pós-desmame;

^{a, b, c} alelos A e B se referem à mutação na posição 2141 do gene (C por G);

alelos C e D se referem à mutação na posição 1547 (C por T), equivalente à perda do sítio da *Msp* I;

alelos E e F equivalem à mutação na posição 2291 (A por C), equivalente à perda do sítio da *Dde* I;

haplótipo E, conforme denominação do autor.

KENNEDY *et al.* (1992), demonstraram que sob certas populações e estruturas genéticas, os efeitos poligênicos, que tem pequenos efeitos individuais mas grande efeito agregado nas características, podem ser confundidos com efeito de apenas um gene, mesmo na ausência de ligação. Estudos que utilizam método dos quadrados mínimos para medir o efeito de um único gene ignora o efeito poligênico. Propôs-se então a utilização da metodologia dos modelos mistos, utilizando o genótipo como efeito fixo e o efeito poligênico como aleatório. Quando as relações envolvendo efeito poligênico é ignorada, a probabilidade de encontrar efeito significativo pode ser maior que do que o erro Tipo I assumido na análise de quadrados mínimos. Tal efeito pode ser maximizado quando os dados são coletados ao longo de gerações e seleção tenha ocorrido. Isto pode explicar porque diversos trabalhos relatam associações significativas, mais do que esperado, em diferentes populações, enquanto que comparações de resultados ao longo de populações mostram contradições e inconsistência.

GELDERMANN *et al.* (1985) consideram que resultados contraditórios com relação aos estudos com marcadores podem estar associados ao método estatístico usado ou mesmo às associações significativas acidentais, como resultado do pequeno número de animais usado. Os efeitos de genes desconhecidos, os quais influenciam uma característica quantitativa, podem ser neutralizados se animais de várias famílias são incluídas na avaliação. Tais genes podem situar-se na vizinhança do marcador, de forma que numa mesma população diferentes alelos podem estar ligados. Então, em caso de equilíbrio o efeito na característica quantitativa, o qual é medido com cada alelo do marcador, anula a si próprio. Em uma população, entretanto, diferentes haplótipos podem ocorrer mais freqüentemente do que esperado. Mesmo alelos de loci não ligados podem aparecer mais freqüentemente do que poderia se esperar no caso de equilíbrio, se seleção é praticada, onde os alelos de um touro superior é vastamente distribuído na população (pela sua maior utilização), enquanto outro touro e sua progênie são eliminados pela pior performance.

Conseqüentemente, relações entre características monogênicas e multifatoriais da população refletem não somente efeitos do caráter monogênico por si só, mas também, e mais importante, a influência de desequilíbrio alélico, o qual pode variar de acordo com a população e também com a geração.

As influências ambientais podem dirigir para erros na avaliação, especialmente no GPD, tanto em bezerros quanto nas vacas. As condições adversas no período pós-desmame dirigem para uma alta influência do meio conforme observa-se por meio do desvio padrão fenotípico da característica mostrado na Tabela 16. Como parte dos bezerros são engordados em confinamento, pode ocorrer erro na estimativa dos valores genéticos dos mesmos, já que as condições de meio são muito diferentes da engorda à pasto e as avaliações são tomadas com base em toda a população.

Os dados quantitativos das vacas são tomados pelo desempenho de seus produtos, sendo portanto sujeitos à repetibilidade e herdabilidade das características. Essa análise indireta pode sofrer alterações à medida que dados são acrescentados ao longo das gerações e como dependem do acasalamento, podem sofrer efeito de deriva genética; ou seja numa geração um alelo do marcador pode ser o mais favorável, enquanto que em outra não. Ademais, conforme discutido por MACKINNON & GEORGES (1992), quando existe ganho genético na população de vacas, progênies de vacas novas terão altas freqüências tanto do QTL favorável quanto de poligênicos de maior valor que a progênie de vacas velhas. O grupo de progênie que herdar o alelo do QTL favorável de suas mães terá, portanto em média, maiores valores poligênicos do que o grupo de progênie que herdar o alelo do QTL desfavorável. Como essa ganho não é considerado, o valor do QTL pode ser superestimado. Quando as análises de ligação são conduzidas dentro de famílias de touros, desde que alelos das vacas segregam independentemente dos alelos dos touros e o contraste é testado entre progênie herdando os alelos alternativos do touro, a variação resultante dos efeitos alélicos da vaca não é significativa.

A existência de diversos trabalhos mostrando alguma associação com marcadores nos cromossomas 6 e 19 (Tabelas 1 e 30), dirige para uma expectativa que os marcadores por aqui utilizados podem estar realmente próximos à algum QTL. No entanto, a alta frequência dos alelos mais favoráveis na população, em características de forte pressão de seleção, intui questionar o benefício da utilização de tais marcadores como auxiliares à seleção, conforme também discutido por BOURDON (1997). Por outro lado a utilidade de marcadores como auxiliares no monitoramento da heterozigose pode ser benéfico em sistemas de cruzamento, onde o aumento da heterose é proporcional à heterozigose, apesar da relação não ser linear (GRAML & PICHNER, 1984). A não linearidade é explicada, além da perda por recombinação, pela diminuição progressiva da heterozigose quando o tamanho da população não é suficientemente grande. A utilidade do GH como marcador importante em sistemas de cruzamento entre zebuínos e taurinos deve ser melhor estudada, já que as duas famílias diferem com relação aos alelos. De certa forma o impacto da utilização de marcadores moleculares deverá ser sobre o aumento dos valores genéticos não aditivos, os quais incluem o valor gênico quando combinado (o resultado da combinação de genes), manipulando os acasalamentos para a melhor combinação gênica. Recentemente, NEJATI-JAVAREMI *et al.* (1997) mostraram que a utilização de uma vaca de relação alélica no lugar de uma vaca de parentesco no modelo animal, fornece maiores informações para avaliações genéticas mais precisas. Apesar disso, deve-se perguntar: quantos loci marcados serão necessários para caracterizar as relações existentes entre os indivíduos e qual será a relação custo-benefício de tal procedimento?

4.6. Considerações sobre desenhos experimentais para estudos de ligação entre marcadores moleculares e características quantitativas

O conhecimento prévio da frequência gênica de marcadores é importante para estudos de ligação com QTLs. A Figura 15 mostra a frequência genotípica esperada do cruzamento entre um touro heterozigoto e vacas escolhidas casualmente na população, para os 3 marcadores estudados. Pode-se ver que, mesmo partindo de um reprodutor heterozigoto, o número de filhos homozigotos para o genótipo menos freqüente é bastante reduzido para estudos de ligação baseado em famílias de meio-irmãos, onde somente touro e progênie são genotipados. Se considerar-se um número mínimo de 35 progênies por classe, no caso da CSN3 ter-se-ia que genotipar aproximadamente 1000 produtos. O contraste é feito dentro de famílias entre a média da progênie que herdou o alelo A e alelo B. Assim, seria realizado entre AA e BB, já que na progênie heterozigota é impossível saber qual alelo foi herdado do pai, à menos que se conheça o genótipo da mãe e esta não seja também heterozigota. Entretanto, na CSN3, como a proporção de produtos heterozigotos que herdou o alelo B da mãe é baixa (3,5%), pode-se concluir que a maior parte dos produtos heterozigotos recebem o alelo B do pai. Portanto pode-se realizar contraste entre o homozigoto AA e o heterozigoto AB, considerando a probabilidade do alelo B ter sido herdado do pai. Para o aumento do poder estatístico do teste, em estudos de ligação, vários touros e progênies por touro devem ser genotipados, especialmente quando algum alelo é raro. Decorre disso que quanto mais raro for um alelo, devido à fixação, mais difícil será encontrar um touro heterozigoto, entretanto, de posse de um reprodutor heterozigoto é possível a realização de estudos de ligação entre marcador e QTL considerando a progênie heterozigota para contraste com a homozigota para o alelo mais freqüente.

CSN3			LGB			GH		
♀ ♂	A $p=0.93$	B $q=0.07$	♀ ♂	A $p=0.24$	B $q=0.76$	♀ ♂	C $p=0.09$	D $q=0.91$
A $p=0.50$	AA 0.465	AB 0.035	A $p=0.50$	AA 0.12	AB 0.38	C $p=0.50$	CC 0.045	CD 0.455
B $q=0.50$	AB 0.465	BB 0.035	B $q=0.50$	AB 0.12	BB 0.38	D $q=0.50$	CD 0.045	DD 0.455

FIGURA 15. Frequência genotípica esperada na F1 para acasalamento entre touros, sabidamente heterozigotos e vacas, escolhidas aleatoriamente na população. As frequências gênicas p e q , são aquelas observadas nas vacas NE.

O GH fornece condições especiais para estudos de ligação considerando desenhos familiares como meio-irmãos ou cruzamento entre linhas puras consanguíneas. Como tudo indica que o alelo C é fixado nas raças de corte européias (uma linha pura nesse caso) e o alelo D tem frequência alta no Nelore (outra linha pura), o cruzamento entre eles produz indivíduos heterozigotos numa frequência alta. Isto obedece aos preceitos do cruzamento entre linhas puras conforme proposto por SOLLER *et al.* (1976), pois tem-se duas raças que diferem em suas características quantitativas e um marcador com frequências opostas nas duas raças. Tem-se então o Nelore com menor taxa de crescimento, menor peso adulto, maturidade sexual tardia e algumas raças européias com características opostas, portanto, fala-se que os dois diferem em alguns loci de característica quantitativa (QTL). Assumindo-se então, que o Nelore é qqDD para o QTL e GH respectivamente, enquanto que o Angus, Simental ou Limousin é QQCC. O cruzamento entre eles vai gerar produtos heterozigotos QqCD tanto para o QTL quanto para o marcador (GH). O retrocruzamento com um dos parentais europeus (SI, AN ou LI) produzirá 0,50 da progênie heterozigota (QqCD) e 0,50 com genótipo QQCC, enquanto que o retrocruzamento com touro Nelore vai gerar 0,50 heterozigota e 0,50 qqDD, considerando que a taxa de recombinação entre os loci é

insignificante. O contraste a ser testado será então a diferença entre o genótipo heterozigoto e os homozigotos. Um cruzamento entre meio - irmãos ou intercruzamento irá gerar na F_2 0,25 QQCC, 0,50 QqCD e 0,25 qqDD, portanto a diferença entre os homozigotos é o contraste a ser testado, como exemplificado na Figura 16.

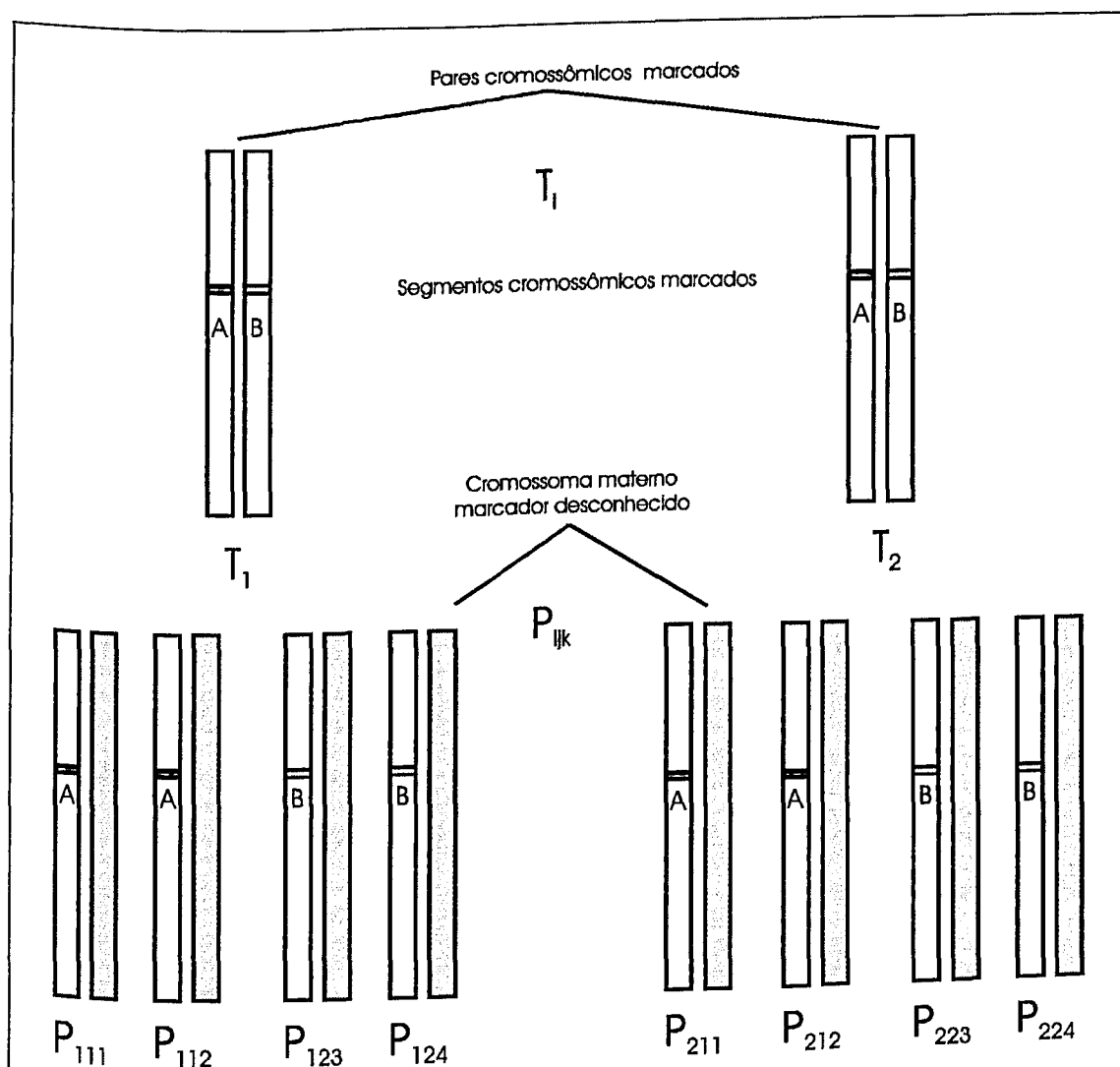


FIGURA 16. Esquema do desenho experimental de meio-irmãos para detecção de ligação entre um locus marcado e características quantitativas. São mostrados dois touros (T_i , 1 e 2), sendo eles heterozigotos (AB) no locus marcado; quatro progênie "k" por touro, que receberam o alelo "j" - A ou B - (P_{ijk} , P_{111} , P_{112} , P_{123} , P_{124} ; P_{211} , P_{212} , P_{223} , P_{224}). Nesse caso o cromossomo materno é ignorado, já que se considera o acasalamento ao acaso, sendo o contraste entre progênie igual a zero. Apenas um locus foi utilizado para marcar o cromossomo, entretanto vários loci do cromossomo podem ser marcados, aumentando a probabilidade de encontrar associação entre marcador e QTL.

SOLLER *et al.* (1976) mostraram que para cada classe de cruzamento de linhas puras o número de progênie necessário para detectar uma diferença, δ , entre as duas classes de marcadores com erro Tipo I, $\alpha = 0,05$ e erro Tipo II, $\beta = 0,10$. Considerando que o efeito do locus quantitativo seja $D_0 = 0,282$ desvios padrões e que existe dominância completa no QTL (heterozigoto para o marcador tem efeito igual ao homozigoto para o QTL superior), o número de progênie requerido por experimento será 525 no retrocruzamento ($2n$) e 1050 no intercruzamento ($4n$), onde n é equivalente à 262 progênies por classe de marcador (na F_2 , progênie heterozigota para o marcador não é incluída na análise, por isso se considera $4n$). Se não existir dominância no QTL o número de progênie requerido no retrocruzamento é de 2100, enquanto que no intercruzamento mantém-se o número de 1050 por experimento. Para outros valores de D_0 , o número de progênie requerido pode ser obtida multiplicando os valores acima por $(0,282/D)^2$, onde D é o efeito do locus quantitativo. Contudo, considerando-se o efeito da recombinação existente entre o marcador e o QTL, o valor esperado do contraste, δ , reduzirá para $(1 - 2r)\delta$, onde r é a taxa de recombinação entre os loci. Assim, o tamanho da amostra requerido para manter o poder estatístico deverá ser aumentado por $1/(1 - 2r)^2$. Portanto, mesmo com pequena taxa de recombinação o número de progênie requerido aumenta enormemente. A diferença entre o número de progênie requerido no retrocruzamento e intercruzamento se deve ao fato que no primeiro, o contraste esperado entre CD - CC (DD) = $(1 - 2r)$, enquanto que no segundo espera-se que CC - DD = $2(1 - 2r)$, ou seja, o dobro do primeiro. Outro problema decorrente do cruzamento entre linhas puras consanguíneas é que o desequilíbrio de ligação gerado na F_1 , decai a cada subsequente geração na proporção $(1 - r)$, onde r é a taxa de recombinação entre o marcador e o QTL.

No desenho de meio-irmãos deve-se ter um touro heterozigoto para ambos loci, marcador e QTL. Enquanto indivíduos de cruzamentos de linhas puras são geralmente todos informativos, o mesmo não ocorre em cruzamento

entre indivíduos sem parentesco dentro da mesma raça. Partindo de um reprodutor Nelore, a probabilidade de encontrar um touro heterozigoto para cada um dos marcadores estudados será 0,20 para CSN3, 0,20 para GH e 0,38 para LGB, considerando a média da heterozigose agrupando os bezerros e vacas numa só população. Entretanto, como a escolha de reprodutores não é feita ao acaso, já que é baseada no valor genético do mesmo em uma população finita de reprodutores elite (elite do ponto de vista genético, pelo seu valor genético), os efeitos da deriva genética atuam (FALCONER & MACKAY, 1996; NICHOLAS, 1996), de modo que por azar pode-se ou não encontrar o genótipo esperado. Ademais, quando aumenta-se o número de reprodutores a ser amostrado, a probabilidade de todos serem heterozigotos será p^n , onde n é o número de reprodutores escolhidos e p é a probabilidade de encontrar um reprodutor heterozigoto, considerando as probabilidades citadas acima. Se a frequência dos alelos na população não é conhecida, pode-se considerar que em um sistema dialélico (2 alelos, mostrando codominância) como foi o caso desse estudo, a probabilidade de encontrar um indivíduo heterozigoto, considerando que a frequência dos dois alelos é igual, será 0,50. Quando aumenta-se o número de alelos a probabilidade é $1 - \sum p_i^2$, onde p_i é a frequência de cada alelo. Decorre disso que quanto maior o número de alelos maior a chance de encontrar-se indivíduos heterozigotos e mais informativo será o marcador. Portanto, a utilização de marcadores dialélicos para mapeamento genético (seja de qualquer característica, quantitativa ou qualitativa), que normalmente são usados em linhas puras consanguíneas, é muito limitada em populações que estão em equilíbrio (não consanguíneas), por isso os microssatélites são mais úteis, pois são altamente polimórficos e muito mais informativos.

Quando há fixação de um dos alelos numa população como é o caso do GH nas raças européias de corte, a probabilidade de encontrar um touro heterozigoto para o marcador é muito baixa. Além das dificuldades citadas em cruzamentos de indivíduos sem parentesco de uma mesma população, a presença de desequilíbrio de ligação pode não existir, assim não

é possível associação entre marcador e QTL. Ademais, certas características que sofrem alta pressão de seleção aumentam as freqüências do QTL e do marcador favorável e diminui a dos desfavoráveis dificultando associação entre marcador e QTL. Neste caso a freqüência do alelo marcador favorável sempre estará associada com o QTL, não sendo possível detectar diferenças, conforme discutido por MACKINNON & GEORGES (1992). Seleção também diminui a quantidade de variação do QTL na amostra, assim, a freqüência do alelo mais favorável será alta, portanto a efetividade da utilização deles em programas de seleção, será baixa. Existe ainda a possibilidade de que alguns genes principais sejam sobredominantes, heterozigotos mais favoráveis que homozigotos, nesse caso a seleção mantém a freqüência gênica intermediária.

Cruzamento assistido por marcadores pode então ser usado para aumentar o número de heterozigotos, orientando o acasalando de indivíduos de um alelo com indivíduos com o alelo alternativo (BOURDON, 1997). Entretanto, no caso do rebanho Nelore se a seleção artificial não foi tão intensa sobre as características econômicas, pode ser possível encontrar genes que tenham efeito maior. Para algumas características que não sofreram muita pressão de seleção, como resistência à doença e qualidade de carcaça e carne, pode existir desequilíbrio de ligação suficiente entre marcadores e QTL segregando na população à ponto de estabelecer contraste entre eles.

Outro problema existente em populações não consanguíneas é que nem sempre um touro será heterozigoto para um marcador e para o QTL, podendo ser heterozigoto para o marcador mas homozigoto para o QTL, daí várias famílias devem ser amostradas para conseguir adequado poder estatístico. WELLER *et al.* (1990) mostraram o número de touros e progênie/touro para teste de associação entre QTL e marcador, baseado em um desenho de meio-irmãos, denominado desenho pai-filha (porque foi proposto para gado de leite). Considerando o efeito gênico (GE) do QTL $a/SD = 0,30$ (12 %), onde a é metade da diferença entre o valor quantitativo médio dos dois homozigotos e SD é o desvio padrão da característica quantitativa

com h^2 0,2, erro Tipo I $\alpha = 0,05$ e erro Tipo II $\beta = 0,11$, o número de progênie requerido é igual a 2000, sendo 400 por touro. Aumentando o número de touros ou famílias de meio-irmãos a probabilidade de encontrar associação entre marcador e QTL é maior. Assim com 10 touros e 200 produtos por touro, se tem a mesma chance que 400 por touro em 5 famílias. MOODY *et al.* (1997), propuseram para gado de corte desenho em famílias de meio-irmãos, nesse caso considerando $\alpha = 0,01$, $h^2 = 0,25$ e $GE = 0,3$ com 500 produtos por touro e 4 touros (2000 produtos) tem-se uma probabilidade de 0,82 ($\beta = 0,18$) de encontrar-se associação entre marcador e QTL. Em ambos casos a diferença esperada entre o valor quantitativo da progênie recebendo o alelo alternativo do touro heterozigoto será igual a $(1 - 2r)\alpha$, onde α é o efeito médio de substituição gênica (FALCONER & MACKAY, 1996); se existir codominância no QTL o valor reduz para $(1 - 2r)d$. Observe que a diferença esperada é metade daquela da F_2 do cruzamento entre linhas puras endogâmicas $[2(1 - 2r)d]$. Assim o número total de progênie informativa para igual probabilidade deverá ser 4 vezes maior para análise desse tipo, ainda mais, esse número deverá ser obtido dentro da progênie de um único touro (SOLLER, 1990).

Dado o número de indivíduos requerido para análise de ligação, pode-se ver que em gado de corte esse estudo é muito limitado, não só devido à escassez de dados fenotípicos, com raras exceções em alguns rebanhos, mas também pela necessidade de utilização de inseminação artificial como fator indispensável para obtenção de tantos produtos por touro. Contudo, o esforço envolvendo governo, universidade e empresas privadas pode permitir a formação de uma entidade como o "Dairy bull DNA repository" nos EUA (DA *et al.* 1994), como uma fonte de informação para estudos de ligação entre marcadores e QTL. Devido ao número de indivíduos necessários é imprescindível a necessidade da integração entre todos esses setores, sendo que as centrais de inseminação tem papel fundamental no fornecimento de sêmen para estudo de marcadores polimórficos, pela obtenção de touros informativos, os criadores como fornecedores de dados fenotípicos e

fornecimento de progênie dos touros informativos para genotipagem e a universidade responsável pela genotipagem dos touros e progênie e análise dos dados.

Enquanto que nas décadas de 70 e 80 as limitações para estudo de associação eram devido à carência de marcadores polimórficos suficientes para mapear as características quantitativas, atualmente a limitação encontra-se na obtenção de população com disponibilidade de dados fenotípicos e em desequilíbrio de ligação e relação custo/benefício para realização de tais estudos. Entretanto, existem alternativas para estudos de ligação entre QTL e marcadores pela utilização de marcadores múltiplos por cromossoma ("interval mapping"), que não diminui o número de progênie à ser genotipado, mas aumenta a probabilidade de detecção de ligação e genotipagem seletiva, pela utilização de indivíduos extremos para o valor da característica quantitativa. Nesse caso, o número de progênie à ser genotipada é reduzida, pois os extremos são os indivíduos mais informativos para estudos de ligação, entretanto, requer o conhecimento do desempenho de toda a população. A partir da discussão acima nota-se que a existência de desequilíbrio de ligação é fator indispensável para obtenção de associação entre marcador e QTL. A probabilidade de associação depende da herdabilidade da característica quantitativa, do grau de dominância existente entre os alelos alternativos do QTL, da magnitude do efeito gênico do QTL, dos erros Tipo I e II, da pressão de seleção existente sobre a característica e do número de famílias analisadas.

5. CONCLUSÕES

Sob as condições do presente trabalho os resultados obtidos permitem concluir que:

1. toda reação de amplificação deve ser otimizada, sendo que alguns fatores devem ser fixados, especialmente *Taq* DNA polimerase e dNTPs, e os demais serem variados, para obtenção do nível ótimo de amplificação;
2. a relação entre $MgCl_2$ e dNTPs na reação de amplificação deve ser sempre maior que 1, já que a disponibilidade do $MgCl_2$ depende da concentração de dNTPs;
3. a redução de "primers" na reação de amplificação pode ser compensada pelo aumento na concentração do $MgCl_2$;
4. excesso de *Taq* DNA polimerase contribui para aumento de produtos indesejáveis na reação, sendo que 0,75 é suficiente para a incorporação de 7 nmoles de dNTPs;
5. onde a variação dos demais fatores não promover sucesso na otimização, a variação do programa de amplificação, utilizando ciclos mais rápidos, diminuindo os tempos de anelamento e desnaturação, pode melhorar a amplificação;
6. a amplificação de fragmentos de alto peso molecular (acima de 800 pb) requer DNA de boa qualidade, já que o mesmo, quando fragmentado, não é amplificado;

7. a seleção praticada no rebanho Nelore não influenciou as frequências gênicas dos marcadores estudados;
8. o GH pode se constituir num importante marcador para heterozigose em cruzamentos entre Nelore e raças de corte européias;
9. em estudos de ligação gênica em rebanhos de cruzamento, mesmo havendo ajuste para heterose, não se deve agrupar os cruzados com os puros, a menos que a frequência genotípica seja semelhante;
10. análise de associação entre marcadores e QTL deve ser conduzida dentro de família;
11. a CSN3, LGB e GH não afetaram as características quantitativas estudadas, nas famílias analisadas;
12. o aumento do número de famílias, progênie por touro, utilização de marcadores altamente polimórficos (microsatélites) e distribuição de diversos marcadores ao longo de todos os cromossomos aumentam a probabilidade de detecção de ligação entre marcador e QTL;
13. o estudo de ligação de marcadores com características de importância econômica deve ser dirigido àquelas que têm sofrido menor pressão de seleção;

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, R.C., GRAVES, G., BUDOWLE, B. Polymerase Chain Reaction Amplification Products Separated on rehydratable polyacrilamide gels and stained with silver. **Biotechniques** 7(7): 736-744. 1989.
- ALEANDRI, R., BUTTAZZONI, G., SCHNEIDER, J.C. The effects of milk protein polymorphisms on milk components and Cheese-producing ability. **Journal of Dairy Science** 73:241-255. 1990.
- ASHWELL, M., REXROAD, C.E., MILLER, R.H., VANRADEN, P.M. Detection of quantitative trait loci for calving ease and type traits in an existing Holstein population. In: **PLANT AND ANIMAL GENOME V. Abstracts...**, 1997. [Http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-5j-294.html](http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-5j-294.html).
- BARENDESE, W., VAIMAN, D., KEMP, S.J., SUGIMOTO, Y., ARMITAGE, S.M., WILLIAMS, J.L., SUN, H.S., EGGEN, A., AGABA, M., ALEYASIN, S.A., BAND, M., BISHOP, M.D., BUITKAMP, J., BYRNE, K., COLLINS, F., COOPER, L., COPPETTIERS, W., DENYS, B., DRINKWATER, R.D., EASTERDAY, K., ELDUQUE, C., ENNIS, S., ERHARDT, G., FERRETTI, L., FLAVIN, N., GAO, Q., GEORGES, M., GURUNG, R., HARLIZIUS, B., HAWKINS, G., HETZEL, J., HIRANO, T., HULME, D., JORGENSEN, C., KESSLER, M., KIRKPATRICK, B.W., KONFORTOV, B., KOSTIA, S., KUHN, C., LENSTRA, J.A., LEVEZIEL, H., LEWIN, H.A., LEYHE, B., LIL, L., MARTIN BURRIEL, I., MCGRAW, R.A., MILLER, J.R., MOODY, D.E., MOORE, S.S., NAKANE, S., NIJMAN, I.J., OLSAKER, I., POMP, D., RANDO, A., RON, M., SHALOM, A., TEALE, A.J., THIEVEN, U., URQUHART, B.G.D., VAGE, D.I., VAN DE WEGHE, A., VARVIO, S., VELMALA, R., VILKKI, J., WEIKARD, R., WOODSIDE, C., WOMACK, J.E., ZANOTTI, M., ZARAGOZA, P. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mammalian Genome** 8:21-28. 1997.
- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. **Biotechnology** 5:573-576. 1987.
- BECKMANN, J.S., SOLLER, M. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. **Theoretical and Applied Genetics** 67: 35-43. 1983.
- BEEVER, J.E., DA, Y., LEWIN, H.A. A genome scan for QTL affectig growth traits in beef cattle. In: **PLANT AND ANIMAL GENOME V. Abstracts...**, 1997. <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-5j-295.html>

- BEEVER, J.E.; GEORGE, P.D.; FERNANDO, R.L.; STORMONT, C.J.; LEWIN, H.A. Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sib family of angus cattle. **Journal of Animal Science** 68(2):337-344. 1989.
- BELL, D.A., DEMARINE, D.M. Excessive cycling converts PCR products to random length higher molecular weight fragments. **Nucleic Acids Research** 19(18):5079. 1991.
- BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology** 43:61-70. 1995.
- BOEHRINGER MANNHEIM BIOCHEMICA. **PCR applications manual**. Boehringer Mannheim, 1995. 192p.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M., DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics** 32:314-331. 1980.
- BOURDON, R.M. **Understanding Animal Breeding**. 1.ed. Saddle River: Prentice-Hall, Inc., 1997. 523p.
- BOVENHUIS, H., VAN ARENDONK, J.A.M., KORVER, S. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science** 75:2549-2559. 1992.
- BRITO, F.V., FRIES, L.A. Proposta de um método para avaliação genética de bovinos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia** 23(2):181-188. 1994.
- BUDOWLE, B., CHAKRABORTY, R., GIUSTI, A.M., EISENBERG, A.J., ALLEN, R.C. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. **American Journal of Human Genetics** 48:137-144. 1991.
- CANTET, R.J.C., SMITH, C. Reduced animal model for marker assisted selection using best linear unbiased prediction. **Genetics, Selection and Evolution** 23:221-223. 1991.
- CARNWATH, J.W. Molecular genetic tools for animal biotechnology. **Embryo Transfer Newsletter** 12(1):8-15. 1994.
- COBB, D.B., CLARKSON, J.M. A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methos. **Nucleic Acids Research** 22(18):3801-3805. 1994.

- COWAN, C.M., DENTINE, M.R., COYLE, T. Chromosome substitution effects associated with k-casein and b-lactoglobulin in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science** 75:1097-1104. 1992.
- CRAWFORD, A.M.; BUCHANAN, F.C.; SWARBRICK, P.A. The use of dinucleotide repeats or microsatellite as genetic markers in domestic animals. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production** 51:79-83. 1991.
- DA, Y., RON, M., YANAI, A., BAND, M., EVERTS, R.E., HEYEN, D.W., WELLER, J.I, WIGGANS, G.R., LEWIN, HA. The Dairy bull DNA repository: a resource for mapping quantitative trait loci. In: **WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION**, 5, 1994, Guelph. *Proceedings...*Guelph:1994. v21, p.229-232.
- DEL LAMA, S.N., ZAGO, M.A. Identification of the κ -casein e β -lactoglobulin genotypes in Brazilian *Bos indicus* and *Bubalus bubalis* populations. **Brazilian Journal of Genetics** 19(1): 73-78. 1996.
- DODDS, K.G., MONTGOMERY, G.W., TATE, M.L. Testing for linkage between a marker locus and a major gene locus in half-sib families. **Journal of Heredity** 84:43-48. 1993.
- EENENNAAM, A.V., MEDRANO, J.F. Milk protein polymorphisms in California dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 74:1730-1742. 1991.
- FALCONER, D.S., MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4.ed. Essex: Longman Group Ltd, 1996. 464p.
- FAMULA, T.R., MEDRANO, J.F. Estimation of genotype effects for milk proteins with animal and sire transmitting ability models. **Journal of Dairy Science** 77:3153-3162. 1994.
- FERNANDO, R.L., GROSSMAN, M. Marker assisted selection using best linear unbiased prediction. **Genetics, Selection and Evolution** 21:467-477. 1989.
- FRIES, R. Mapping the bovine genome: methodological aspects and strategy. **Animal Genetics**, 24: 111-116. 1993.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics** 46:319-330. 1975.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers II. Expected effects. **Theoretical and Applied**

Genetics47:1-4. 1976.

GELDERMANN, H.; PIEPER, U.; ROTH, B. Effects of marked chromosome sections on milk performance in cattle. **Theoretical and Applied Genetics** 70:138-146. 1985.

GEORGES, M., NIELSEN, D., MACKINNON, M., MISHRA, A., OKIMOTO, R., PASQUINO, A.T., SARGEANT, L.S., SORENSEN, A., STEELE, M.R., ZHAO, X., WOMACK, J.E., HOESCHELE, I. Using a complete microsatellite map and the grand-daughter design to locate polygenes controlling milk production. In: **WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION**, 5, 1994, Guelph. *Proceedings...*Guelph: 1994. v21, p81-85.

GEORGES, M.; LEQUARRÉ, A.S.; CASTELLI, M., HANSET, R., VASSART, G. DNA fingerprinting in domestic animals using four different minisatellite probes. **Cytogenetic Cell Genetics**. 47:127-131. 1988.

GRAML, R., PICHNER, F. Relation of genetic distance between cattle breeds and heterosis of resulting crosses. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics** 15:173-180. 1984.

HALEY, C.S., KNOTT, S.A. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity** 69:315-324. 1992.

HATZEL, J., DAVIS, G., CORBET, S., SCACHERI, S., MAYNE, C., SCOTT, J., STEVENSON, R. Localization of quantitative trait loci (QTL) for growth traits in *Bos Taurus X Bos indicus* cattle. In: **PLANT AND ANIMAL GENOME V. Abstracts...**1997.
<http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/s13.html>

HEARNE, C.M.; GROSH, S.; TODD, J.M. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. **Trends in Genetics** 8:288-293. 1992.

HOESCHELE, I., BISCHOP, M., ZHANG, Q., ERNST, C., DOUD, L., EGGEN, A., JURGELLA, G., MURKVE, B., PFISTER-GENSKOW, M., THORBAHN, D., UIMARI, P., THALLER, G. Mapping economic trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large granddaughter design. In: **PLANT AND ANIMAL GENOME V. Abstracts...**1997.
<http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-9b-387.html>.

HOLMES, N.G. Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. **British Veterinary Journal**.150(5): 411-421. 1994.

HU, J., QUIROS, C.E. Identification of broccoli and cauliflower with RAPD

- markers. **Plant Cell Report** 10:505-511. 1991.
- INNIS, M.A., MYAMBO, K.B., GELFAND, D.H., BROW, M.A.D. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 85: 9436-9440. 1988.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J., WHITE, T.J. **PCR - PROTOCOLS - A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS**. Academic Press, Inc., USA. 482 p. 1990.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" of human DNA. **Nature** 314:67-72. 1985.
- JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Individual-specific "fingerprinting" of human DNA. **Nature** 316:76-79. 1985.
- KAPPES S.M. Use of gene technology in animal breeding: The bovine genome mapping project - status and future aspects. In: **GENE AND BIOTECHNOLOGY IN ANIMAL PRODUCTION AND MEAT PROCESSING**, 1996, Lillehammer, *Proceedings...* Lilleh: Norwegian Food Research. 1996. p.9-20.
- KAPPES, S.M., KEELE, J.W., STONE, R.T., MCGRAW, R.A., SONSTEGARD, T.S., SMITH, T.P.L., LOPEZ-CORRALES, N.L., BEATTIE, C.W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research** 7(3):1-15. 1997.
- KASHI, Y.; HALLERMAN, E.; SOLLER, M. Marker-assisted selection of candidate bulls for progeny testing programmes. **Animal Production**. 51:63-74.1990.
- KENNEDY, B.W.; GIBBINS, A.M.V.; GIBSON, J.P., SMITH, C. Coalescence of molecular and quantitative genetics for livestock improvement. **Journal of Dairy Science** 73:2619-2627. 1990.
- KENNEDY, B.W., QUINTON, M., ARENDONK, J.A.M. Estimation of Effects of Single Genes on Quantitative Traits. **Journal of Animal Science** 70:2000-2012. 1992.
- LAGZIEL, A., LIPKIN, E., SOLLER, M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics** 142:945-951.1996.
- LANDE, R., THOMPSON, R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. **Genetics** 124:743:756. 1990.

- LANDER, E.S., BOTSTEIN, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics** 121:185-199. 1989.
- LOWE, T., SHAREFKIN, J., YANG, S.Q., DIEFFENBACH, C.W. A computer program for selection of oligonucleotides for polymerase chain reaction.. **Nucleic Acids Research** 18(7):1757-1761. 1990.
- MACKINNON, M.J., GEORGES, M.A.J. The effects of selection on linkage analysis of quantitative traits. **Genetics** 132:1177-1185. 1992.
- MASOUDI, M., ZHOU, J.F., ZADWORN, D., ZHANG, J., KUHNLEIN, U. Genotyping of kappa-casein alleles in holstein dairy cattle using PCR and SSCP-PCR. In: **WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION**, 5, 1994, Guelph. *Proceedings...*Guelph: 1994. v21, p81-85.
- MAY, B., KRUEGER, C.C., ENG, W., PAUL, E., PERKINS, D.. **GENES IN POPULATIONS** v. 2, 1995.
- MICHA, R., HEYEN, W., BAND, M. Detection of economic trait loci in the US and Israeli Holstein populations with the aid of DNA microsatellites. In: **PLANT AND ANIMAL CONFERENCE V. Abstracts...**, 1997. <http://probe.nalusda.gov:8000/otherdocs/pg/pg5/abstracts/p-5j-298.html>.
- MICHELMORE, R.W., PARANI, I., KESSELI, R.V. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific regions using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 88:9829-9832. 1991.
- MOODY, D.E., POMP, D., BUCHANAN, D.S. Feasibility of the grandprogeny design for quantitative trait loci (QTL) detection in purebred beef cattle. **Journal of Animal Science** 75: 941-949. 1997.
- MOODY, D.E., POMP, D., NEWMAN, S., MACNEIL, M.D. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford Cattle and their associations with growth and maternal EPD in Line 1 Herefords. **Journal of Animal Science** 74: 1784-1793. 1996.
- NAKAMURA, Y., LEPPERT, M., O'CONNELL, P., WOLFF, R., HOLM, T., CULVER, M., MARTIN, C. FUJIMOTO, E., HOFF, M., KUMLIN, E., WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science** 235:1616-1622. 1987.
- NEJATI-JAVAREMI, A., SMITH, C., GIBSON, J.P. Effect of total allelic

relationship on accuracy of evaluation and response to selection. **Journal of Animal Science** 75:1738-1745. 1997.

NICHOLAS, F.W. **INTRODUCTION TO VETERINARY GENETICS**. 1.ed. Oxford: Oxford University Press, 1996. 317p.

RASMUSSEN, R., REED, G. Optimizing Rapid Cycle DNA Amplification Reactions. **The Rapid Cyclist** 1(1): 1-5. 1992

REITER, R.S., WILLIAMS, J.G.K., FELDMANN, K.A., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V., SCOLNIK, P.A. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 89:1477-1481. 1992.

ROCHA, J.L., BAKER, J.F., WOMACK, J.E., SANDERS, J.O., TAYLOR, J.F. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science** 70:3360-3370. 1992.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **PCR Methods and Applications** 4 (5): S185-S194. 1995.

RYCHLIK, W., SPENCER, W.J., RHOADS, R.E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acids Research** 18(21):6409-6412. 1990.

SABOUR, M.P., LIN, C.Y., LEE, A.J., McALLISTER, A.J. Association between milk protein genetic variants and genetic values of Canadian Holstein bulls for milk yield traits. **Journal of Dairy Science** 79:1050-1056. 1996.

SAIKI, R.D., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491. 1988.

SAIKI, R.D., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. Enzymatic Amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230:1350-1354. 1985.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCEVERO, A.B. A resposta do gado Nelore ao confinamento. In:

SYMPOSIUM: O NELORE DO SÉCULO XXI, 3, 1995, Ribeirão Preto. *Anais...Ribeirão Preto: Associação dos Criadores de Nelore do Brasil*, 1995. p.62-69.

SAS User's Guide: Statistical Analysis Systems. Cary, 1992.

SIMPSON, S.P. Detection of linkage between quantitative trait loci and restriction fragment length polymorphisms using inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics** 77:815-819. 1989.

SMITH, C., SMITH, D.B. The need for close linkages in marker-assisted selection for economic trait merit in livestock. **Animal Breeding Abstracts** 61(4):197-204. 1993.

SOLLER, M., BECKMANN, J.S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theoretical and Applied Genetics** 67:25-33. 1983.

SOLLER, M., BRODY, T., GENIZI, A. On the power of experimental designs for the detection of linkage between marker loci and quantitative loci in crosses between inbred lines. **Theoretical and Applied Genetics** 47:35-39. 1976.

SOLLER, M., GENIZI, A. The efficiency of experimental designs for the detection of linkage between a marker locus and a locus affecting a quantitative trait in segregating populations. **Biometrics** 34:47-55. 1978.

SOLLER, M., HAZAN, P.J. The use marker alleles for the introgression of linked quantitative alleles. **Theoretical and Applied Genetics** 51:133-137. 1977.

SOLLER, M. Genetic mapping of the bovine genome using deoxyribonucleic acid-level markers to identify loci affecting quantitative traits of economic importance. **Journal of Dairy Science** 73:2628-2646. 1990.

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology** 98:503-517. 1975.

STEEL, R.G.D., TORRIE, J.H., DICKEY, D.A. **PRINCIPLES AND PROCEDURES OF STATISTICS: A BIOMETRICAL APPROACH**. 3.ed. New York: McGraw-Hill, Inc., 1997. 666p.

TAYLOR, J.F., DAVIS, S.K., SANDERS, J.O., TURNER, J.W., SAVELL, J.W., MILLER, R.K., SMITH, S.B. The Angleton Project: 1996 update. In: **BEEF IMPROVEMENT FEDERATION RESEARCH SYMPOSIUM AND ANNUAL**

- MEETING**, 28, 1996, Birmingham. *Proceedings...* Colby: Beef Improvement Federation, 1996. P.28-37.
- TROYER, D.L., SMITH, J.E., LEIPOLD, W. Implications of genetic markers and maps for veterinary medicine. **Journal of American Veterinary Medical Association** 10:1376-1380. 1990.
- VASSART, G., GEORGES, M., MONSIEUR, R., BROCAS, H., LEQUARRE, A.S. CHRISTOPHER, E.A. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. **Science** 235:683-670. 1987.
- WANG, H., FLIEGEL, L., CASS, C.E., PENN, A.M.W., MICHALAK, M. WEINER, J.H., LEMIRE, B.D. Primers are decisive for sensitivity of PCR. **BioTechniques** 17(1):82-87. 1994.
- WELLER, J.I. Maximum likelihood techniques for the mapping and analysis of quantitative trait loci with the aid of genetic markers. **Biometrics** 42:627-640. 1986.
- WELLER, J.I., KASHI, Y., SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 73:2525-2537. 1990.
- WITTEWER, C.T., FILLMORE, G.C., GARLING, D.J. Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. **Analytical Biochemistry** 186: 328-331. 1990
- WITTEWER, C.T., G.C., GARLING, D.J. Rapid cycle DNA amplification: time and temperature optimization. **BioTechniques** 10(1):76-83. 1991
- YAO, J., AGGREY, S.E., ZADWORN, D., HAYES, J.F., KÜHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Genetics** 144(4): 1809-1816. 1996.
- ZHANG, H.M., BROWN, D.R., DeNISE, S.K., AX, R.I. Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. **Journal of Animal Science** 71:2276. 1993.