

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMENSE DARCY
RIBEIRO**

SABRINA LUZIA GREGIO DE SOUSA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM
MICROSSATÉLITES COM CARACTERÍSTICAS PARA
SELEÇÃO DE GADO DE CORTE.**

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO - 2008

SABRINA LUZIA GREGIO DE SOUSA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS EM
MICROSSATÉLITES COM CARACTERÍSTICAS PARA
SELEÇÃO DE GADO DE CORTE.**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof^a. CELIA RAQUEL QUIRINO

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO 2008

Ao meu Tio Gregio (*in memorian*)

para que desta forma eu possa deixar registrado a minha admiração e o meu agradecimento por ter nos deixado seu exemplo de que pessoas que procuram cultivar a alma e os sentimentos, sem medo de demonstrarem pureza e bondade, tornam-se realmente PESSOAS.

DEDICO.....

A

meu pai Jorge Carlos Dias de Sousa, minha inspiração profissional e à minha mãe Geneci Gregio de Sousa, o exemplo de dedicação materna que pretendo seguir pelo resto da minha vida;

Aos

anjos que Deus me enviou para que eu chamasse de irmãos, Tatiana, minha companheira, cúmplice e amiga e aos meus “pequenos” Jorge Júnior e Jorge Filho;

Ao

meu marido Raul, pelo carinho e incentivo na finalização deste trabalho e à minha filha Isabella, meu mais belo projeto de vida, pelos meus momentos de ausência, para que um dia ao ler esta dedicatória ela possa entender que tudo que faço hoje e sempre é pensando em um melhor futuro para ela.

OFEREÇO.....

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre colocar oportunidades à minha frente;

Ao meu pai, Jorge Carlos Dias de Sousa pela ajuda fundamental em todas as coletas de dados de produção realizadas neste trabalho;

À minha mãe Geneci Gregio de Sousa, por todo o carinho e por me fortalecer nos momentos difíceis;

À minha irmã, Tatiana Luzia Gregio de Sousa, pela sua amizade, proteção e companheirismo;

Aos meus irmãos Jorge Carlos Dias de Sousa Júnior e Jorge Carlos Dias de Sousa Filho simplesmente por existirem;

Ao meu marido, Raul Castro Carriello Rosa, pelo carinho, companheirismo e compreensão nos momentos em que precisei;

À minha avó que em muitos momentos, aos 73 anos viajou até Campos dos Goytacazes para me ajudar nos cuidados com minha filha durante os momentos difíceis deste trabalho;

A todos os meus tios e tias, especialmente à minha Tia Claudinha, pela atenção, pelo carinho e pelas palavras doces nos momentos difíceis;

Ao meu sogro Júlio Felix Carriello Rosa pelo carinho e amor a minha filha Isabella;

À minha sogra Maria Regina Castro Carriello Rosa, por uma ajuda muito especial nestes longos quatro anos, cercando minha filha de muita dedicação amor e carinho;

À professora Célia Raquel Quirino, por ter confiado em mim para a realização do primeiro trabalho na área da Genética Molecular dentro do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Animal;

Ao professor Gonçalo Apolinário de Sousa Filho pelas dicas, pela atenção e por ter aberto as portas do Núcleo de Análises Genômicas em todas as etapas deste trabalho;

À professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira por ter me proporcionado a oportunidade de realizar treinamentos, sempre que necessário, na Escola de Veterinária da UFMG, me acolhendo sempre da melhor forma;

Ao professor Victor Cruz Rodrigues, por ter participado de várias etapas importantes de minha formação profissional;

A Claudia Salviano Teixeira pela atenção e por suas dicas essenciais para a finalização deste trabalho, todo o meu agradecimento e admiração;

Ao Eduardo Coelho da Escola de Veterinária da UFMG, por toda ajuda durante as vezes em que precisei estar no Laboratório de Genética desta Instituição;

Às amigas Adriane de Souza Nunes e Alena Torres Neto, exemplos de que mães dedicadas podem ser pesquisadoras dedicadas e competentes, pela força e pelo incentivo nos momentos difíceis;

A toda equipe do Núcleo de Análises Genômicas da UENF, os meus amigos: Adriane, Valéria, Natália, Frederico, Mariana, Daiana e Verônica pelos momentos alegres, pela insubstituível “paradinha para o café”, pelo carinho nas horas difíceis e pela convivência agradável que eu jamais esquecerei;

Ao amigo, o técnico do Setor de Genética Molecular Aplicada à Produção Animal, Thiago Correa da Silva pela ajuda essencial na finalização deste trabalho e por estar sempre a disposição para me ajudar;

Aos colegas biólogos da área Molecular Aline Intorne e Vinícius pelas dicas importantes e pela generosidade com que sempre me ajudaram;

Aos proprietários das Fazendas Consorciadas e Garcia, Aprígio Lopes Xavier e Alcebíades Paes Garcia, por terem permitido a coleta de dados em suas propriedades;

Ao proprietário da Fazenda Alvorada Dante Ramenzoni e todos os seus funcionários pela acolhida agradável no período de coleta de dados de Carcaça;

À Associação de Criadores de Guzerá do Sudeste, por terem contribuído de maneira generosa à coleta de dados desta pesquisa.

Aos amigos Maria Raquel Garcia e Luciano Canelas por todo o carinho dado a minha filha Isabella nos momentos em que ela esteve com eles para que eu trabalhasse no laboratório;

Aos amigos Lia e Cláudio Marciano pelos agradáveis momentos em que estivemos juntos;

À minha “fiel escudeira”, minha amiga Gilliana Dutra Neves, presente em muitos momentos importantes de minha vida em Campos dos Goytacazes, agradeço o companheirismo e amizade em todos os momentos;

Às amigas da Rural, Henriette Jordão, Lilian Shimidt e Amanda Guedes, pela amizade e por todo o carinho (AMIGAS PARA SEMPRE!) e às minhas irmãs de república, Cristiana do Couto Miranda, Fernanda Lignon e Ana Clara Pires Milhomem, cuja convivência eu nunca esquecerei;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro -UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), pelo oferecimento desse curso;

A todos os amigos os quais tive a oportunidade de conhecer e conviver na Universidade Estadual do Norte Fluminense por todas as horas de alegria proporcionadas;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Meu pacto é um pacto sagrado com a paz, a felicidade, a harmonia e o sucesso, as realizações construtivas, a simpatia e a boa vontade com todos. Quero sorrir, cumprindo meu dever. Quero ser útil, sem nunca esmorecer.

Lao-Tsé

Grandes realizações são possíveis quando se dá importância aos pequenos começos.

Lao-Tsé

Quem conhece a sua ignorância revela a mais profunda sapiência. Quem ignora a sua ignorância vive na mais profunda ilusão. Para ganhar conhecimento, adicione coisas todos os dias. Para ganhar sabedoria, elimine coisas todos os dias.

Lao-Tsé

É melhor lançar-se à luta em busca do triunfo mesmo expondo-se ao insucesso, que formar fila com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito; E vivem nessa penumbra cinzenta sem conhecer nem vitória nem derrota.

Franklin Roosevelt

“Nunca esteja satisfeito com o que você realiza, porque é tudo claro em comparação com o que você é capaz de fazer no futuro.”

Rabbi Nochem Kaplan – Rabino

Luto com incessante esforço para não ficar no rol daqueles que apenas passam pela vida sem ter criado a sua história!

Balsa melo (poeta da solidão)

LISTA DE SIMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

AOL - Área de Olho de Lombo

EGC – Espessura de Gordura de Cobertura

EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha

MAR – Marmoreio

PCQ – Peso de Carcaça Quente

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCost – Peso de Corte Costilhar

PDiant – Peso de Corte Dianteiro

PSerr – Peso de Corte Serrote

QTLs – Locus da Característica Quantitativa

RFLP – Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição

STR – Seqüências Repetidas em Tandem

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT.....	xiii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1- Análise Genômica.....	4
2.2-Marcadores Moleculares.....	6
2.3- QTLs (Locos da Característica Quantitativa).....	8
2.4- Marcadores Microssatélite.....	10
2.4.1-Marcadores Microssatélites na busca de QTLs de importância econômica em Gado de Corte.....	13
3. TRABALHOS.....	18
3.1- OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE PARA ANÁLISE DE REGIÕES CANDIDATAS NA PRODUÇÃO ANIMAL.....	19
3.1.1.RESUMO.....	19
3.1.2. ABSTRACT.....	21
3.1.3. INTRODUÇÃO	22
3.1.4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1.4.1 Animais e coleta de material.....	25
3.1.4.2 Extração de DNA genômico.....	25
3.1.4.3 Seleção de Iniciadores.....	25
3.1.4.4 Análise da seqüência dos primers.....	26
3.1.4.5Otimização da Reação em Cadeia da Polimerase	27

3.1.4.6 Padronização das condições da PCR.....	28
3.1.4.7 Padronização da temperatura.....	28
3.1.4. 8 Corrida Eletroforética.....	29
3.1.4.9 Detecção de bandas.....	30
3.1.4.9.1 Com Bromato de Etídeo.....	30
3.1.4.9.2 Com Nitrato de Prata.....	30
3.1.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1.6 CONCLUSÕES.....	39
3.1.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
3.2-ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS STRS LIGADOS Á REGIÕES CANDIDATAS NOS CROMOSSOMOS 4 E 14 COM CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM GADO DE CORTE.....	41
3.2.1.RESUMO.....	41
3.2.2. ABSTRACT.....	43
3.2.3. INTRODUÇÃO	45
3.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.2.4.1 Animais e coleta de material.....	48
3.2.4.2 Coleta de dados de produção	48
3.2.4.3 Extração de DNA genômico.....	49
3.2.4.4Seleção de Iniciadores.....	49
3.2.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase.....	51
3.2.4. 6 Corrida Eletroforética.....	52
3.2.4.7 Detecção de bandas com Nitrato de Prata.....	53
3.2.4.8 Análise Estatística.....	53
3.2.5 RESULTADOS	55

3.2.6 DISCUSSÃO.....	65
3.2.7 CONCLUSÕES.....	69
3.2.8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
3.3- ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NOS LOCUS MICROSSATÉLITES BM1500, CSSM66 E BM8215 COM PESO DE CARÇAÇA EM ANIMAIS ORIUNDOS DO CRUZAMENTO DE <i>BOS TAURUS X BOS INDICUS</i>	73
3.3.1.RESUMO.....	73
3.3.2. ABSTRACT.....	75
3.3.3. INTRODUÇÃO	76
3.3.4. MATERIAIS E MÉTODOS	78
3.3.4.1 Animais e coleta de material.....	78
3.3.4.2 Abate e Coleta de dados de Carçaça	78
3.3.4.3 Extração de DNA genômico.....	79
3.3.4.4 Seleção de Iniciadores.....	79
3.3.4.5 Reação em Cadeia da Polimerase.....	81
3.3.4. 6 Corrida Eletroforética.....	81
3.3.4.7 Detecção de bandas com Nitrato de Prata.....	82
3.3.4.8 Análise Estatística.....	82
3.3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
3.3.6 CONCLUSÕES.....	88
3.3.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
6. ANEXO.....	101

RESUMO

SOUSA, SABRINA LUZIA GREGIO de. D.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2008. Associação de polimorfismos em microssatélites com características para seleção de gado de corte. Orientador: Célia Raquel Quirino. Conselheiros: Adriane Nunes de Souza, Cláudia Salviano Teixeira, Victor Cruz Rodrigues.

Este trabalho teve como objetivo otimizar e padronizar a utilização de marcadores microssatélites, associando estes locus microssatélites, ligados a regiões candidatas nos cromossomos 4 e 14, a características de produção em bovinos de corte. Para tanto se utilizou três primers, citados na literatura, por estarem ligados a regiões candidatas, realizando a análise em 129 animais dos grupos genéticos Guzerá; Nelore; e de três cruzamentos F_2 terminal [($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Limousin x $\frac{1}{4}$ Nelore), ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simbrasil x $\frac{1}{4}$ Nelore), ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simental x $\frac{1}{4}$ Nelore)]. Os primers foram analisados pelo programa Oligo 6.0, após a análise, estes foram sintetizados e realizou-se a PCR. Após a realização da PCR, os produtos amplificados foram analisados em eletroforese vertical no gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%. As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta, a partir dos fenótipos obtidos em eletroforese. Após serem computados os resultados dos animais testados para os locus microssatélites citados, foi feita a análise estatística (SAS, 1996), para associação entre os dados quantitativos e moleculares. Como resultado da

padronização verificou-se que para o primer BM1500, a temperatura ideal de anelamento foi de 58°C com 40 ciclos, sendo cerca de 1% superior à indicada pelo fabricante e cerca de 10 % superior à indicada pelo programa Oligo. Para o primer CSSM66, a temperatura ideal de anelamento foi de 59°C com 35 ciclos de repetição, sendo cerca de 1% superior à indicada pelo fabricante e cerca de 4% superior à indicada pelo programa Oligo. Para o primer BM8215 a temperatura ideal foi de 61°C, com 30 ciclos de repetição, sendo cerca de 7% superior à indicada pelo fabricante e cerca de 13% superior à indicada pelo programa Oligo. Tais modificações na temperatura e no número de ciclos foram realizadas para diminuir a quantidade de bandas inespecíficas visualizadas nas primeiras amplificações. Na associação às características de produção foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) nas características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha (EGCP), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Marmoreio (MAR), Peso, Peso de Carcaça Quente (PCQ), Peso de Corte Serrote (PSerr), Peso de Corte Dianteiro (PDiant) e Peso de Corte Costilhar (PCost) entre os grupos G1, G2, G3, G4 e G5. Não foram verificadas associações entre tamanhos de alelo para os marcadores BM1500, BM8215 e CSSM66 e as características Peso de Carcaça Quente (PCQ), Peso de Corte Serrote (PSerr), Peso de Corte Dianteiro (PDiant) e Peso de Corte Costilhar (PCost). Não sendo verificadas também, associações entre os tamanhos de alelo para os marcadores BM8215 e CSSM66 e as características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha (EGCP), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Marmoreio (MAR) e Peso. Foram encontradas associações entre as características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha (EGCP), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Marmoreio (MAR), Peso e os tamanhos de alelo do marcador BM1500, com o alelo BM1500*138 apresentando maiores valores para as características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha (EGCP) na análise dentro dos grupos G1, G3, G4 e G5, tendo sido encontrado no G2 maiores valores para as mesmas características nos animais portadores do alelo BM1500*140. Conclui-se que o marcador BM1500 deve ser testado em populações maiores de animais zebuínos para que seja comprovada a contribuição de cada alelo deste loco marcador em características de interesse

econômico. As informações de associação de marcadores ligados a genes candidatos devem ser avaliadas por população de estudo, pois um alelo marcador afetando uma característica em uma população pode não estar em outra.

ABSTRACT

SOUSA, SABRINA LUZIA GREGIO de. D.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August 2008. Association between polymorphism found in microsatellites loci and characteristics used for beef cattle selection. Adviser: Célia Raquel Quirino. Committee Members: Adriane Nunes de Souza, Cláudia Salviano Teixeira, Victor Cruz Rodrigues.

This study has as objective to optimize and to standardize the utilization of microsatellites markers, associating these microsatellite locus, that are bond to candidates regions in chromosome 4 and 14, with productive characteristics in beef cattle. It was used three primers from the literature due its association with the candidates regions. These primers were analyzed by the Oligo 6.0 program, and then synthesized and a PCR was done. After PCR, its amplified products were analyzed by a vertical electrophoresis with 8% non-desnaturing polyacrylamise gel. The allele frequencies were estimated by direct counting the electrophoresis fragments. Statistics analysis was performed using the SAS program (1996) associating quantitative and molecular data. As the result of the standardization for BM1500, CSSM66 and BM8215 primers, the ideal annealing temperature was 58 °C with 40 cycles, 59 °C with 35 cycles and 61 °C with 30 cycles respectively. Changes in temperature were design to obtain less nonspecific amplified products. Significant differences ($P < 0,05$) were found in Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling score (MAR), weight (W), weight of hot carcass (WHC), weight of forequarter (WF), weight of hindquarter (WH) and weight of spareribs (WS) characteristics between G1, G2, G3, G4 and G5

groups. It wasn't verified association between the size of the allele for BM1500, BM8215 and CSSM66 primers and weight of hot carcass (WHC), weight of forequarter (WF), weight of hindquarter (WH) and weight of spareribs (WS) characteristics. Also it wasn't verified association between the size of the allele for BM8215 and CSSM66 primers and Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling score (MAR), weight (W) characteristics. Associations between Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling score (MAR), weight (W) characteristics and the size of the allele for BM1500 primer were found, the BM1500*138 allele showing higher values for Longissimus Dorsi Area (LDA) and Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT) in G1, G3, G4 and G5 groups. The G2 group had high values for the same characteristics in animals with the BM1500*140 allele. It can be concluded that the BM1500 primer should be tested in larger populations of Zebu proven to be the contribution of each allele in this marker into characteristics of economic interest. The information's about associations between markers related to a candidate gene has to be tested into the studied population, due a marker that affect one population can be absent in another.

1- INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de mapas genéticos é uma ferramenta que vem sendo utilizada como auxílio em programas de seleção de animais, pela identificação de marcadores ligados a locos de características quantitativas (QTL) de importância econômica, detectando assim, indivíduos mais produtivos com maior eficiência que os programas clássicos de seleção.

Mapas genéticos fornecem a base para mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs), melhorando assim o potencial para realizar a seleção e o progresso genético, especialmente àquelas características difíceis e/ou com alto custo de avaliação. Incluem-se nesta categoria, características de carcaça e de qualidade de carne que podem variar amplamente entre raças e tipos biológicos (Wheeler *et al.*, 1997).

As diferenças nas seqüências de moléculas de DNA, detectadas por técnicas moleculares, podem ser responsáveis de maneira direta por diferenças no fenótipo ou podem estar ligadas, no mesmo cromossomo, ao polimorfismo que afeta o fenótipo dos animais.

De acordo com Stone *et al.*, (1999), a capacidade de predizer, de forma mais exata, o mérito genético para características de carcaça no início da vida dos animais permitiria uma abordagem mais direta no germoplasma, reduzindo a quantidade de dados onerosos e dispendiosos necessários para o processo de seleção e fornecendo um meio de avaliação genética mais precoce.

Embora os conhecimentos da genética quantitativa, aliados ao uso de técnicas computacionais e estatísticas, tenham assegurado um progresso genético contínuo de todas as características de produção, essa seleção é realizada sem o conhecimento do número de genes que atuam na característica de interesse, nem do efeito de cada gene. Assim, os conhecimentos de genética quantitativa aliados à genética molecular podem se tornar uma grande estratégia ao melhoramento genético animal, ao promover um aumento na intensidade de seleção, melhorando a acurácia desta (Ledur & Schimdt, 2005).

Desta maneira torna-se essencial a identificação dos polimorfismos das estruturas genéticas que possam estar relacionadas às características de interesse dentro dos Sistemas de produção de carne, visando à identificação de genótipos superiores em idades precoces, contribuindo dentre outras coisas para a maior rentabilidade dos sistemas de produção.

De acordo com Ihara et al., (2004), na busca por QTLs relacionados a características de produção de carne é crescente o uso de marcadores microssatélites, pelo fato destes serem excelentes marcadores genéticos, devido ao seu elevado polimorfismo e abundante distribuição ao longo do genoma, tornando-se um instrumento essencial para o mapeamento de características poligênicas.

De acordo com Machugh et al. (1998) e Macneil & Grosz (2002), as metas propostas para a utilização de marcadores moleculares dentro do melhoramento animal só podem ser alcançadas quando há uma associação entre os marcadores e as características quantitativas de interesse zootécnico, sendo um dos principais objetivos do estudo de QTL (Quantitative Trait Loci), fornecendo subsídios que possam ser utilizados em esquemas de SAM (Seleção Assistida por Marcadores).

Muitos estudos têm sido realizados na busca por QTLs, analisando regiões cromossômicas que possam ser associadas a características de importância econômica em gado de corte, utilizando marcadores microssatélite. Dentre estes se destacam estudos que analisam cromossomos que contêm regiões candidatas, como os cromossomos 4 e 14 (Mizoshita *et*

al., 2005; Mizoguchi *et al.*, 2005; Mizoshita *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Thaller, 2003; Stone, 1999).

A avaliação dos polimorfismos encontrados nestas regiões pode concretizar-se em importantes informações aos programas de melhoramento genético de animais de raças zebuínas, contribuindo com informações que possam ser usadas em programas de seleção assistida por marcadores moleculares.

No entanto, verifica-se uma carência de resultados de pesquisas que forneçam subsídios para associação de genótipos moleculares a quantitativos na produção de animais zebuínos.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo associar polimorfismos dos locos microssatélites já citados na literatura: BMS1500 (cromossomo 4), BMS8215 (cromossomo 14) e CSSM66 (cromossomo 14) com características de produção em animais de raças zebuínas e seus cruzamentos.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Análise Genômica

A variação genética para produtividade depende da variação alélica em um grande número de locos e a expressão gênica destes locos é altamente afetada pelos fatores do meio ambiente, sendo assim, segundo Martinez & Machado (2002), o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo.

A variação da característica ou a variação genética de características de interesse econômico é de natureza quantitativa; e os locos individuais que afetam a expressão da característica são denominados QTL (locos de característica quantitativa) (Geldermann, 1995).

Progressos genéticos contínuos na genética molecular têm permitido a localização de marcadores genéticos ao longo do genoma de interesse, possibilitando os primeiros trabalhos de inferência sobre locos de características quantitativas (Paz, 2002).

De acordo com Paz (2002), o uso de marcadores genéticos para identificar QTLs começou com os trabalhos de Sax (1923), citando que tal estudo foi estabelecido com o intuito de demonstrar a ligação entre diferentes genes de efeito maior e determinantes da variação quantitativa. Este autor também comentou que Sax estudou a associação entre a pigmentação e o padrão da coloração da casca com o tamanho da planta do feijão, demonstrando a existência de segregação conjunta dos marcadores

qualitativos (pigmentação e padrão da coloração da casca) com os locos que controlam a expressão da característica quantitativa tamanho da planta.

Paz (2002) faz referência a outros trabalhos que surgiram com a intenção de estudar associações entre características quantitativas e marcadores qualitativos ou morfológicos, citando o trabalho de Rasmusson (1933), que associou a cor de flores (colorida e branca), consideradas como marcador, com o tempo de florescimento, considerado como característica quantitativa.

Thoday (1961) demonstrou que a dificuldade em encontrar evidência de que alguns locos gênicos estavam associados com determinada característica quantitativa, estaria relacionada com as deficiências na precisão quanto à localização dos marcadores.

Para Edwards *et al* (1987), o pequeno número de marcadores morfológicos distintos em uma mesma raça ou linhagem reduz a probabilidade de se encontrar associações significativas entre estes e os caracteres de importância econômica e concluem que isto se deve ao fato de que a probabilidade de que um polimorfismo selecionado aleatoriamente tenha efeito direto sobre uma característica é pequena, apesar do loco estar bem ligado ao QTL.

No entanto, para Guimarães & Moreira, (1999), devido ao número reduzido de marcadores fenotípicos disponíveis e a ausência de ligação destes com caracteres de importância econômica, verificou-se que os marcadores fenotípicos ou morfológicos tiveram aplicabilidade limitada em sistemas de produção.

A partir da década de 60, foram desenvolvidos os marcadores isoenzimáticos, uma classe de marcadores que se baseia nas diferenças na seqüência de aminoácidos das isoformas de uma determinada enzima, que ocorrem em uma espécie (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores moleculares surgiram somente em meados da década de 80, permitindo a análise do polimorfismo genético diretamente em nível de DNA (Sholötterer, 2004). Segundo Paz (2002), os avanços na área da genética molecular possibilitaram a localização de pontos de referências nos cromossomos denominados de marcadores moleculares.

2.2. Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Estes oferecem a possibilidade ao melhorista de acessar o genótipo do indivíduo ao invés de medir apenas o fenótipo, já que este é a expressão do genótipo sob condições ambientais específicas podendo mudar com o ambiente (Milach, 1998).

Os marcadores moleculares diferenciam-se basicamente pela tecnologia utilizada para revelar a variabilidade presente no DNA, bem como pela habilidade em detectar diferenças entre indivíduos, pelo custo, pela facilidade de uso, pela consistência e pela repetibilidade (Milach, 1998).

Existem duas grandes classes de marcadores que se diferenciam pela metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os marcadores identificados por hibridização estão os RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") e Minissatélites ou locos VNTR ("Variable Number of Tandem Repeats"). Os identificados por amplificação incluem os marcadores do tipo RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), AFLP ("Amplified Fragment Polymorphism") e Microsatélites ou SSR ("Simple Sequence Repeats") (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Marcadores moleculares permitem determinar genótipos de indivíduos em vários locos em muitas espécies (O'Brien, 1991). Esta biotecnologia possibilita estimativas de parâmetros populacionais como: frequências alélicas e genotípicas, usadas para comparações entre populações e estimativas de variação genética de DNA, as quais podem identificar diferenças genéticas que contribuem para gerar variabilidade fenotípica em populações (Moody *et al.* 1996).

Segundo Beckmann & Soller (1983), seleção utilizando técnicas moleculares pode ser mais eficiente do que a seleção massal para o caráter de interesse.

No entanto, marcadores associados à produção detectados em uma população podem não estar associados aos mesmos caracteres de produção em outra população. De acordo com Mattos (2000), a ocorrência de um marcador está intimamente relacionada à história evolutiva e contemporânea daquela população, desta forma a origem do rebanho e da raça, fluxo gênico,

mestiçagem, seleção artificial e o tamanho efetivo da população são fatores que influenciariam o comportamento de marcadores em diferentes populações.

A partir da elaboração do mapa genético bovino (Bishop *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 1994, 1997 e Kappes *et al.*, 1997) e do desenvolvimento de técnicas moleculares vários trabalhos começaram a ser conduzidos buscando associação entre marcadores moleculares e locos de características de interesse (QTLs). Dentre os marcadores moleculares amplamente utilizados na produção animal destacam-se os polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) e os marcadores do tipo microssatélite, altamente polimórficos, ambos obtidos pela técnica de PCR.

Tais marcadores podem ser utilizados na identificação de locos polimórficos, tendo o princípio básico de servir como base estrutural para detecção e localização de QTL, com efeitos sobre o fenótipo.

A recente abordagem de detecção e localização de QTLs de efeito no fenótipo está centrada no mapeamento do genoma e emprega a técnica de microssatélites (Rapley & McDonald, 1992), sendo usada para identificar regiões do genoma ou genes envolvidos com a característica quantitativa. Marcadores microssatélites são usados em estudos de correlação com características de interesse econômico e utilizados na identificação de locos que afetam caracteres quantitativos ou QTLs.

Estudos associando marcadores moleculares com características de composição de carcaça e crescimento de bovinos de corte foram relatados por Davis (1994) e estudos de associação de marcadores a produção de leite foram apresentados por Massey & Georges (1992), enquanto Cheng (1994), relataram estudos de associação de marcadores a doenças em aves.

Um dos primeiros resultados do emprego dos marcadores em análise de intervalo de QTLs foi relatado por Ron *et al.*, (1994), que identificaram QTL no cromossomo 21 dos bovinos com efeito de fenotípico para a produção de leite.

Georges *et al.* (1995) encontraram fortes evidências da presença de QTLs para características de produção de leite nos cromossomos 1, 6, 9, 10 e 20 dos bovinos, estes autores citaram que os efeitos dos diferentes QTLs contribuíram entre 11 e 52% da variância total dentro de famílias de meios-

irmãos. Os autores concluíram que em bovinos de leite, a disponibilidade de grandes famílias de touros tem contribuído para maior avanço no mapeamento de QTLs para características de produção.

Para Weller *et al.* (1990), o sucesso dos experimentos de associação de QTLs a marcadores moleculares pode ser atribuído ao desenvolvimento de métodos estatísticos e delineamentos genéticos adequados.

De acordo com Paz (2002), devido á utilização de marcadores e ao desenvolvimento dos programas de mapeamento do genoma de animais domésticos um número grande de marcadores é encontrado na literatura. Dentre estes marcadores desta-se a utilização crescente dos marcadores microssatélite, cobrindo cerca de 90% do genoma bovino (Bishop *et al.* 1994, Barendse *et al.*1997).

2.3. QTL (Locos da Característica Quantitativa)

Define-se como QTL, cada gene ou conjunto de genes adjacentes (ligados em um mesmo cromossomo), que influenciam um caráter quantitativo. Para a localização de QTLs é necessária a construção de mapas de ligação que ordenem genes e marcadores em função da frequência de recombinação entre eles; é necessária a varredura do genoma com marcadores aleatórios a intervalos regulares e também a análise de associação entre cada região e o fenótipo.

De acordo com Liu (1997), QTLs são identificados como associações estatísticas entre dados relativos a uma região genômica e à variabilidade fenotípica existente entre populações segregantes.

De acordo com Parmentier *et al.* (1999), em uma primeira etapa, os marcadores são avaliados nos estudos de correlação com características de interesse econômico e utilizados na identificação de regiões cromossômicas contendo QTLs de interesse. Posteriormente, novos marcadores são analisados e utilizados, objetivando o estreitamento progressivo da região cromossômica que contém o possível QTL de interesse e a identificação de marcadores fortemente ligados ao QTL, até que sejam identificados os genes responsáveis pela variação da característica, ou genes candidatos. Segundo

estes autores, a busca pela posição destes QTLs baseia-se em mapas de ligação, construídos utilizando-se marcadores altamente polimórficos.

Em bovinos, o desenvolvimento de mapas genéticos de alta densidade forneceu subsídios para os estudos de identificação de QTLs. O mapa atual abrange 2990 cM, com um intervalo médio de cerca de 3,0 cM, semelhante ao da resolução da maior parte dos atuais mapas genéticos de suínos, ovinos, e de frango (Rohrer *et al.*, 1996; Groenen *et al.*, 2000; Maddox *et al.*, 2001).

De acordo com Soller e Andersson (1998) em bovinos, para se ter uma boa cobertura de todo o genoma, é aconselhável genotipar a população segregante com cerca de 150 a 200 marcadores, o que representa uma densidade de um marcador para cada 20 cM .

No entanto, a identificação de QTLs pode ocorrer por meio de estudos de associações envolvendo genes candidatos e por mapas de ligação com marcadores. Para utilização de mapas de ligação na busca por QTLs existem duas situações em que o mapeamento de QTL conduz a resultados para uso em seleção. Na primeira abordagem para o mapeamento de QTL é realizado em experimentos de famílias de meios-irmãos ou irmãos completos, cada uma podendo ter centenas de indivíduos, que constituem a população onde ocorrerá a seleção, tal abordagem para detecção de QTL é realizada em gado de leite. A segunda abordagem ocorre quando se cria alto grau de desequilíbrio de ligação, como no caso de retrocruzamento ou F2, que usa cruzamento de animais de raças distintas (como o cruzamento entre zebuínos e taurinos), que pode gerar análises estatísticas com poder equivalente à análise de genes candidatos e os resultados podem ser usados na população proveniente do cruzamento. Estas duas situações requerem investimentos altos para avaliação dos animais em seleção, por necessitarem de um grande número de animais (Carrijo, 2004).

Segundo Soller (1994), só se consegue detectar diferenças médias entre marcadores genotípicos em uma população, quando há desequilíbrio de ligação entre o marcador e o QTL, citando que a probabilidade de detecção de QTL depende da quantidade de desequilíbrio de ligação entre este e o marcador, concluindo ainda que em uma população exogâmica, espera-se apreciável quantidade de desequilíbrio de ligação entre o marcador e QTL,

apenas quando estes estiverem associados e o tamanho efetivo da população for pequeno.

De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1998), a determinação da ligação genética entre marcadores e QTLs depende da existência do desequilíbrio de ligação entre alelos do marcador e do QTL. Este desequilíbrio de ligação gera efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados por análises estatísticas adequadas. Segundo estes autores, desequilíbrio de ligação entre dois locos ocorre quando as frequências genotípicas dos gametas diferem do produto das frequências dos alelos componentes, denotando a existência de uma associação significativa entre dois locos.

Para Ferreira e Grattapaglia (1998), nos programas de melhoramento a eficiência da seleção assistida por marcadores moleculares dependerá do número de QTLs que serão selecionados e da frequência de recombinação entre marcadores e QTLs.

Ihara *et al.* (2004) citam os microssatélites como excelentes marcadores genéticos devido ao seu elevado polimorfismo e abundante distribuição ao longo do genoma, tornando-se um instrumento essencial para o mapeamento de características poligênicas usando QTLs. Segundo o autor, o isolamento aleatório de microssatélites seria a melhor escolha para enriquecer marcadores em todo o genoma, seguida pela construção de um mapa genético de alta densidade para facilitar o estreitamento de regiões de interesse e identificar genes de importância.

2.4. Marcadores Microssatélite

Diferentes experimentos no início dos anos 80 demonstraram que os genomas eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de seqüências repetidas, umas mais complexas (minisatélites) e outras mais simples (Hamada *et al.*, 1982). As seqüências mais simples repetidas foram mais tarde denominadas “microssatélites” (Lift & Luty, 1989), consistem de pequenas seqüências de repetições (“sequence motif”).

Marcadores microssatélite se localizam próximo e não na própria posição do QTL no genoma, para estes marcadores é importante salientar que tais informações são úteis apenas para o touro em particular e sua família (Kinghorn, 2006).

Os microssatélites possuem uma elevada taxa de mutação, que varia entre 10^{-3} e 10^{-6} por locos por geração. Estas mutações ocorrem durante a replicação, na qual ocorre ganho ou perda de repetições, geralmente apenas uma repetição por vez, por um mecanismo de deslizamento da DNA polimerase. Com isso, cada alelo de um microssatélite se refere a variações no número de repetições encontradas (Foissac *et al.*, 1997; Cavalli-Sforza, 2003; Cullen *et al.*, 2003).

Segundo Goldstein e Schlötterer (1999), microssatélites são constituídos de pequenas seqüências de até seis nucleotídeos de comprimento repetidas em bloco, que podem ser detectados por hibridação com sonda específica ou mesmo pela construção de iniciadores específicos. Assim, a análise de locos microssatélites é realizada por meio de PCR, com iniciadores específicos complementares às regiões flangeadoras que são bastante conservadas (Lanza *et al.*, 2000).

Inicialmente, um dos maiores problemas apresentados pelos microssatélites era a obtenção de primers. A obtenção destes requer os seguintes passos: 1-DNA genômico total clivado com enzimas de corte freqüente; 2- Construção de biblioteca genômica de fragmentos pequenos; 3- Clones selecionados para a presença de microssatélites utilizando-se sondas sintéticas complementares aos elementos repetidos mais comuns no organismo (por exemplo, poli-GT para mamíferos onde elementos CA são mais comuns ou poli-AT para plantas onde elementos AT são mais comuns); 4- Clones positivos são seqüenciados para verificar a extensão do microssatélite; 5- Seleção de clones microssatélites, com seqüências flangeadoras adequadas; 6- Sequenciamento completo de clones selecionados; 7- Desenho e síntese de pares de primers usando softwares específicos; 8- PCR com primers construídos para verificar a extensão do polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Desta maneira uma das maiores limitações encontradas para os marcadores microssatélites, era a obtenção dos iniciadores. Porém,

atualmente a maioria das espécies de interesse agrônomo e zootécnico possui suas seqüências microssatélite conhecidas e seqüenciadas, o que favorece os estudos que têm como objetivo encontrar regiões cromossômicas que tenham influência em características de interesse econômico.

Desta maneira, tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores microssatélite são os que apresentam o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo, ou seja, "PIC" ("Polymorphism Information Content") na terminologia de marcadores moleculares (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Ainda segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um "alelo" diferente do mesmo loco, e o comprimento das repetições de nucleotídeos destes microssatélites é seguramente uma característica herdada e altamente variável dentro de uma raça.

Outra vantagem a ser considerada é a possibilidade de utilização em espécies relacionadas de iniciadores desenvolvidos para uma determinada espécie na detecção de locos microssatélites, processo denominado amplificação cruzada. Isso permite que outra espécie geneticamente próxima seja avaliada com os mesmos marcadores moleculares, sem a necessidade de gastos com o desenvolvimento de novos iniciadores. Iniciadores que se comportam desta forma são chamados de heterólogos. Essas características reunidas fazem com que estes marcadores moleculares sejam úteis para uma grande variedade de estudos (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Microssatélites têm sido observados em diversos organismos como em seres humanos (Lift & Luty, 1989), baleias, *Drosophila* (Tautz, 1989), camundongos (Love *et al*, 1990), bovinos e caprinos (Moore *et al*, 1991), entre outros. Os elementos repetidos mais freqüentes em mamíferos são extensões de di-nucleotídeos CA e TG (Hamada *et al*, 1982).

Considerando a freqüência dessas repetições microssatélites e o tamanho médio do genoma dos mamíferos foi possível construir mapas genéticos para espécies de interesse com inúmeros marcadores do tipo microssatélite.

2.4.1. Marcadores Microssatélites na busca de QTLs de importância econômica em Gado de Corte

Em bovinos, os mapas genéticos são compostos por uma combinação de marcadores RFLP e locos microssatélites fornecendo cobertura de aproximadamente 90% do genoma (Bishop *et al.*, 1994; Barendse *et al.*, 1997).

Para Ihara *et al.* (2004), o tempo, o trabalho e o custo de isolar regiões específicas de DNA de uma região cromossômica por marcador é substancialmente maior do que isolar marcadores microssatélite aleatoriamente.

As análises realizadas dentro de programas de Melhoramento Genético de Gado de Corte têm o objetivo de localizar regiões cromossômicas (QTLs) associadas a variações em características como : peso a diferentes idades, rendimento de cortes e nos últimos anos características que visam avaliar caracteres qualitativos da carne como maciez e marmoreio, buscando localizar genes que possam se tornar candidatos em programas de seleção.

De acordo com Miyata (2004), os marcadores microssatélites por serem altamente numerosos e polimórficos são apropriados para serem utilizados em estudos de associação com locos que controlem as características quantitativas. E ainda, de acordo com Carrijo (2004), marcadores microssatélites vem sendo utilizados em larga escala não só na construção de mapas de ligação em espécies, mas, principalmente dentro da produção animal na identificação de locos que controlem características quantitativas (QTLs).

De um modo geral, as pesquisas com marcadores microssatélites realizam uma verdadeira varredura do genoma sendo um método bastante efetivo na detecção de QTLs. Este método possibilita encontrar informações a respeito do número de QTLs, possibilitando informações que visam encontrar marcadores diretos (genes candidatos) ou detectando outros QTLs com efeitos sobre as características.

Neste contexto, muitos estudos têm sido realizados na busca por QTLs, analisando regiões cromossômicas que possam ser associadas a

características de importância econômica, utilizando marcadores microssatélite (Mizoshita *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Thaller, 2003; Stone, 1999).

Dentre estes estudos em gado de corte, destacam-se os estudos realizados para avaliar o peso vivo dos animais, como os realizados por Hetzel *et al.* (1997), que avaliaram uma população bovina resultante do cruzamento entre *Bos Taurus* X *Bos Indicus* e evidenciaram a existência de QTLs nos cromossomos 5, 18 e 21 para peso ao nascimento, nos cromossomos 6 e 14 para variações de crescimento em todas as idades e nos cromossomos 9 e 19 para crescimento pós-natal.

Stone *et al.* (1999) estudando 238 microssatélites nas progênes de touros *Bos Taurus* X *Bos Indicus* acasalados com vacas *Bos Taurus*, evidenciaram QTLs afetando a área do músculo longissimus no cromossomo 14, afetando os ossos da costela no cromossomo 5 e afetando o peso ao nascimento no cromossomo 1. Estes mesmos autores verificaram que o alelo proveniente do *Bos Indicus* aumentava o peso do osso da costela e diminuía a percentagem de carne em relação ao alelo *Bos Taurus* nas progênes estudadas.

Machado *et al.* (2003), nas análises de uma região do cromossomo 5 de bovinos, indicaram a presença de um QTL controlando o peso ao nascimento.

Casas *et al.* (2000) detectaram no cromossomo 5 QTL próximo ao loco IGF-1 afetando a deposição de gordura, rendimento no corte e maciez da carne. Nos cromossomos 17 e 27 detectaram QTLs para marmoreio e no cromossomo 29 detectaram um QTL para maciez da carne. Estes mesmos autores detectaram no cromossomo 6, QTLs para peso ao nascimento e peso ao ano. Casas *et al.* (2003) localizaram um QTL significativo para marmoreio no cromossomo 2 bovino identificado a um intervalo de 45 a 70 cM.

Ainda para a característica marmoreio, muitos estudos apontam a existência de QTLs em diferentes cromossomos do genoma bovino. Mizoshita *et al.* (2004) relataram a existência de QTLs significativos para marmoreio no cromossomo 5, em concordância com os resultados relatados por Stone *et al.* (1999) para o mesmo cromossomo.

Mizoshita *et al.* (2004) relataram, também, a existência de QTL localizado no cromossomo 14 para marmoreio, também relatado por Casas *et*

al. (2003) e Thalles *et al.*(2003). O citado QTL para marmoreio foi detectado na mesma região do cromossomo 14, onde Barendse *et al.*(1999) observaram a associação do microssatélite CSSM66 (próximo ao gene da Troglobulina). Esta região já foi alvo de estudo por pesquisadores que pretendiam associar QTLs à quantidade de gordura no leite (Grizart *et al.*, 2002 e Winter *et al.*, 2002).

Ainda, Mizogushi *et al.*(2005), em um estudo onde avaliaram a existência de QTLs relacionados a características economicamente importantes em uma população de gado Japanese Black, utilizando marcadores microssatélite, verificaram QTLs de influência significativa para a característica marmoreio nos cromossomos 4, 6 e 21.

Em características como marmoreio e outras características utilizadas na avaliação de acabamento precoce em gado de corte, destaca-se a avaliação por marcadores microssatélites de regiões candidatas nos cromossomos 4 e 14, devido às presenças dos genes da Leptina, Tiroglobulina e Diacylglycerol acyltransferase (Fitzsimmons *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 2003).

A leptina é um importante regulador do metabolismo energético, adiposo e reprodutivo. Isto, também, envolve a regulação de peso corporal e pode ser considerado um marcador biológico afetando a quantidade de gordura corporal em animais e humanos. (Oprzadek *et al.*, 2003). O gene da Leptina possui aproximadamente 18,9 kb, localiza-se no cromossomo 4 a 3,6 Kb 3' do stop códon (Pomp *et al.*, 1997) e é composto por três exons que perfazem aproximadamente 3,2 kb e dois íntrons que somados representam 15,7 kb (Salman, 2004).

O gene da leptina é considerado um gene candidato para performance, carcaça e qualidade de carne em bovinos (Fitzsimmons *et al.*, 1998; Buchaman *et al.*, 2002).

Estudos como os de Almeida *et al.* (2007) citam polimorfismos ligados ao gene da leptina influenciando na regulação do gene. Para estes autores, tais polimorfismos em marcadores ligados ao gene da leptina, afetariam a expressão fenotípica das características influenciadas por este gene, por influenciarem o controle de expressão do gene ou pelo desequilíbrio de

ligação dos alelos com algumas mutações do gene, alterando a função ou expressão deste. Outros estudos também descreveram a utilização de marcadores microssatélite localizados em regiões cromossômicas próximas ao gene da leptina (Stone *et al.* 1996; Wilkins & Davey. 1997).

De acordo com Fitzsimmons *et al.* (1998), estes marcadores podem estar potencialmente ligados a polimorfismos dentro do gene da leptina conduzindo a variações na composição de carcaça. Estes autores ao analisarem as variantes alélicas do microssatélite BM1500 (próxima ao gene da leptina) observaram que os alelos com 138pb (pares de base) estão relacionados com altos níveis de deposição de gordura na carcaça, enquanto alelos com 147 pares de base estão relacionados com níveis menores de deposição.

Almeida *et al.* (2007) ao analisarem as variantes do microssatélite BM1500 associando-as a ganho de peso de vacas no pós-parto citaram que os animais portadores do alelo de 136pb possuíam maior ganho de peso quando comparado aos animais portadores dos demais alelos (138pb, 142pb, 144pb, 146pb, 148pb, 150pb).

Da mesma maneira, que no cromossomo 4 (devido à presença do gene da Leptina), o cromossomo 14 dos bovinos tem sido alvo de análise através de varreduras com marcadores microssatélites. Neste cromossomo, Mizoshita *et al.* (2004) relataram a presença de um QTL afetando espessura de gordura de cobertura, tal QTL foi localizado na mesma região nos estudos realizados por Stone *et al.* (1999); Casas *et al.* (2001) e Moore *et al.* (2003). Estes autores citaram também a localização de um QTL para marmoreio na mesma posição onde Grisart *et al.* (2002) e Winter *et al.* (2002) identificaram o gene Diacylglycerol acyltransferase (DGTA1), associado à quantidade de gordura no leite. Na mesma região, Barendse (1999) observou associação de marmoreio com o microssatélite CSSM66, próximo ao gene da Tiroglobulina.

De acordo com Moore *et al.* (2003), a forte evidência de um QTL para deposição de gordura associado ao marcador CSSM66 indica a probabilidade de que os genes próximos (Gene Tiroglobulina e o gene Diacylglycerol acyltransferase) a este marcador afetem de forma considerável o metabolismo de lipídeos.

Outros estudos como os de Aswell *et al.* (2001) relatam a associação entre o microssatélite BMS1678, localizado no cromossomo 14 (próximo ao gene da Tiroglobulina) e percentagem de gordura, confirmando a possível associação de marcadores microssatélites neste cromossomo e características de deposição de gordura em gado de corte.

De acordo com Schenkel *et al.* (2005), antes das informações com marcadores ligados na busca por QTLs serem usadas de maneira eficiente em sistemas de produção, estudos com diferentes populações são necessários para proporcionar maior robustez aos resultados de associação dos polimorfismos genéticos com características de produção.

3. TRABALHOS

3.1. OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO USO DE MARCADORES MICROSSATÉLITE PARA ANÁLISE DE REGIÕES CANDIDATAS EM GADO DE CORTE.

3.1.1. RESUMO

Objetivou-se com este trabalho apresentar resultados da padronização da Reação em Cadeia da Polimerase com primers microsatélite visto que, existe a necessidade de se padronizar a técnica de PCR para as condições do Setor de Genética Molecular Aplicada à Produção Animal no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Foi padronizada a PCR para três primers microsatélite (BM1500, CSSM66 e BM8215), que tiveram suas seqüências analisadas pelo programa Oligo, antes de serem sintetizados para evitar a formação de heterodímeros e homodímeros. Como resultado da padronização verificou-se que para o primer BM1500, a temperatura ideal de anelamento foi de 58°C com 40 ciclos, sendo cerca de 1% superior à indicada pelo fabricante e cerca de 10% superior à indicada pelo programa Oligo, para o primer CSSM66 a temperatura ideal de anelamento foi de 59°C com 35 ciclos de repetição, sendo cerca de 1% superior à indicada pelo fabricante e cerca de 4% superior à indicada pelo programa Oligo. Para o primer BM8215 a temperatura ideal foi de 61°C, com 30 ciclos de repetição, sendo cerca de 7% superior à indicada pelo fabricante e cerca de 13% superior à indicada pelo programa Oligo. Tais modificações na temperatura e no número de ciclos foram realizadas para diminuir a quantidade de bandas inespecíficas visualizadas nas primeiras amplificações. Conclui-se que a padronização das condições de PCR é uma

etapa trabalhosa na técnica de microssatélite e que as condições ideais para a reação devem ser testadas por ambiente onde são realizadas. Diante disto é importante destacar que existe uma carência de relatos sobre a otimização da Reação em Cadeia da Polimerase para estes marcadores, ressaltando a importância destes resultados.

3.1.2. ABSTRACT

This study has as objective to show results from the PCR technique standardization with microsatellites primers, due its necessary to standardize the PCR technique for the Reprodução e Melhoramento Animal laboratory, Genética Molecular Aplicada à Produção Animal sector from Universidade Estadual do Norte Fluminense. Standardization was done for three microsatellites primers (BM1500, CSSM66 and BM8215), which had their sequence analyzed by the Oligo program, before being synthesized to avoid heterodimers and homodimers formation. As the result of the standardization for BM1500, CSSM66 and BM8215 primers, the ideal annealing temperature was 58 °C with 40 cycles, 59 °C with 35 cycles and 61 °C with 30 cycles, respectively. Changes in temperature and number of cycles were design to obtain less nonspecific amplified products. It can be concluded that the standardization of PCR technique conditions is necessary and the reaction should be tested in each laboratory that it's preformed. It's also important to stand out the lack of reports about polymerase chain reaction standardization for these markers, emphasizing the importance of these results.

3.1.3.INTRODUÇÃO

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) desenvolvida por Mullis, em 1983 (Mullis, 1990). Porém, a importância desta técnica só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação desta em doenças (Saiki *et al.*, 1985).

A Reação em Cadeia da Polimerase consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada pela DNA polimerase. A reação envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A primeira etapa da PCR consiste na desnaturação inicial da dupla fita de DNA que contém a seqüência a ser amplificada, ocorrendo quando a temperatura é elevada entre 92 e 96 °C. Na etapa de anelamento, a temperatura é rapidamente reduzida para 35 a 60°C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do primer utilizado, permitindo a hibridização DNA-DNA de cada primer com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Os dois primers curtos são hibridizados a filamentos opostos, cada um se liga a uma fita diferente do fragmento alvo nas posições que flanqueiam a região da seqüência a ser amplificada; estando orientados de forma que suas extremidades 3' apontem uma para a outra (Moura Duarte *et al.*, 1999). Em seguida, a temperatura é elevada para 72°C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers, esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este

ciclo é feito em algumas centenas de vezes, dobrando a quantidade de DNA da seqüência alvo em uma progressão geométrica.

A duração de um ciclo é de cerca de 5 minutos, consistindo de 15 segundos para a desnaturação, 30 segundos para o anelamento, 90 segundos para a extensão e mais o tempo mínimo necessário para a mudança de temperatura entre as fases, que é de 30 a 60 segundos para cada mudança (Nicholas, 1999).

De acordo com Saiki (1989), os primers utilizados na PCR não devem conter estruturas secundárias complexas, principalmente na extremidade 3', a partir da qual se dá a extensão da fita complementar, além deste fator, de acordo com este autor a complementariedade entre dois primers também deve ser evitada, pois resulta na formação de dímeros que reduzem o rendimento da PCR. O delineamento dos primers é, portanto, um procedimento complexo e, dada sua importância para o sucesso da técnica, o uso de softwares adequados pode ser empregado (Regitano, 2001).

Mesmo sendo uma técnica de muita aplicabilidade a Reação em Cadeia da Polimerase possui algumas variáveis críticas como: concentrações de magnésio, de desoxinucleotídeos e de DNA molde.

Como regra geral, segundo Saiki (1989), o excesso de magnésio resulta em acúmulo de produtos de amplificação inespecíficos e sua falta na redução do rendimento da PCR. A concentração de magnésio é dependente da concentração dos desoxinucleotídeos (dNTP), uma vez que esses se ligam ao magnésio tornando-o disponível no meio. Para tanto, concentrações de 1,5 mM de $MgCl_2$ são geralmente adequadas em presença de 200 μ M de cada dNTPs, podendo ser manipuladas, sabendo-se que a concentração de cada um dos dNTPs pode variar de 50 a 200 μ M, pois acima disto a incorporação errônea de nucleotídeos é favorecida. Ainda de acordo com Pinho (2005), a presença de EDTA e outros quelantes de magnésio dificultam sua concentração ótima, fixada entre 0,5 a 2,5 mM. Para a quantidade de DNA molde rotineiramente utiliza-se 100ng de DNA, dependendo da finalidade e do tamanho do genoma.

Ainda de acordo com Moura Duarte *et al.* (1999), a qualidade e a especificidade da amplificação dependem de condições como: o programa de ciclos de temperatura, a composição da mistura de amplificação e a quantidade e natureza do DNA-alvo na amostra. Segundo estes autores os resultados da amplificação podem variar entre os termocicladores de fabricantes diferentes, entre os termocicladores de um único fabricante e até entre diferentes reservatórios de amostras em uma única máquina. A DNA polimerase pode falhar durante a amplificação, introduzir ou deletar cópias da repetição no caso de microssatélites e produzir um conjunto heterogêneo de fragmentos, tornando difícil a interpretação. Em alguns casos, ocorre amplificação exata em algumas temperaturas e amplificação diferencial em outras temperaturas. Idealmente, pares de iniciadores deveriam amplificar somente *locos* alvo desejado. Porém, amplificação não específica pode ser observada se amplificar para um número elevado de ciclos. Assim, é preciso um limite para o número de ciclos como proteção contra produtos inespecíficos.

Para Paton *et al* (2000), as condições ideais de amplificação, com concentrações de Mg^{2+} , de enzimas, de primers e de temperaturas de anelamento devem ser definidas para cada par de primers.

Segundo Penner *et al.* (1993) e Warg *et al.* (1993), apud, Ferreira & Gratapaglia (1996), a padronização das condições de amplificação são imprescindíveis para se obter resultados satisfatórios da técnica de PCR, já que há uma variação entre ambientes diferentes (de laboratório para laboratório), assim como variações de perfis térmicos diferentes entre diferentes aparelhos termocicladores.

Portanto, este trabalho teve como objetivo apresentar resultados de padronização da Reação em Cadeia da Polimerase com primers microssatélite visto que, existe a necessidade de se padronizar a técnica de PCR para as condições do Setor de Genética Molecular Aplicada à Produção Animal no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

3.1.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.4. 1. Animais e Coleta de material

Foram utilizados para análise amostras de bovinos das raças Nelore, Guzerá e animais dos cruzamentos F₂ terminal ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simental x $\frac{1}{4}$ Nelore), ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Limousin x $\frac{1}{4}$ Nelore) e ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simbrasil x $\frac{1}{4}$ Nelore). Pela facilidade da colheita, o material escolhido para a extração do DNA, foi o bulbo íntegro de pêlo. Amostras de pêlo foram coletadas da vassoura da cauda dos animais, sendo armazenadas em envelopes de papel, estes foram identificados com o número de registro dos animais, fazenda e grupo genético.

3.1.4. 2. *Extração do DNA genômico*

Para a padronização dos microssatélites foram coletados de 5 a 8 bulbos íntegro em microtubos. Em seguida, adicionou-se 50 μ l de solução de lise (200Mm NaOH). Os microtubos foram colocados no termociclador e incubados a 97°C por 15 minutos. Na próxima etapa, adicionou-se 50 μ l de solução neutralizante (200Mm HCl; 100Mm Tris-HCl ph 8,5), homogeneizando bem. Após a realização de todas as etapas de extração as alíquotas foram armazenadas em geladeira a 4°C.

3.1.4. 3. *Seleção de iniciadores*

Em uma primeira etapa foi realizada busca na literatura e no banco de dados por seqüências de primers desenhados especificamente para bovinos e

que já tivessem sido citados como tendo associação com características economicamente importantes em gado de corte, desta busca foram selecionados três primers.

Tabela1: Seqüência dos primers utilizados na padronização.

Marcador	Cromossomo	Tamanho de alelos	Seqüência da literatura
BM1500	04	135-147pb	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG Reverse Primer Sequence: CCCATTGCTAGAACCCAGG
CSSM66	14	177-197pb	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG
BM8215	14	116-140pb	Forward Primer Sequence: CCAAAGAAGCTGAAGTTGACTG Reverse Primer Sequence: CTGACTTTTGCATTTCAACCC

3.1.4. 4. Análise da seqüência dos primers

Após a escolha destes primers foi realizada a análise de suas seqüências utilizando o programa Oligo versão 6.68. Tal procedimento foi utilizado com a intenção de obter maior especificidade dos primers selecionados na literatura, visando evitar seqüências que apresentem os nucleotídeos G e C em suas extremidades (principalmente 3`OH) devido à sua força de ligação com as bases correspondentes, podendo gerar amplificações inespecíficas, sendo também avaliada a possibilidade destes formarem dímeros reduzindo o rendimento da PCR. Na formação de dímeros foi avaliada a probabilidade de estes formarem heterodímeros (anelamento entre a seqüência *Reverse* e a seqüência *Forward*) e homodímeros (anelamento entre duas seqüências *Reverse* ou duas seqüências *Forward*).

Tabela 2: Seqüência original dos primers e seqüência modificada pelo Oligo versão 6.68.

Marcador	Cr	Seqüência da literatura	Seqüência modificada
BM1500	04	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG
		Reverse Primer Sequence: CCCATTGCTAGAACCCAGG	Reverse Primer Sequence: C*CCATTGCTAGAACCCAGG
CSSM66	14	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCT*GA
		Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG
BM8215*	14	Forward Primer Sequence: CCAAAGAAGCTGAAGTTGACTG	Forward Primer Sequence: CCAAAGAAGCTGAAGTTGACTG
		Reverse Primer Sequence: CTGACTTTTGCATTTCAACCC	Reverse Primer Sequence: CTGACTTTTGCATTTCAACCC

*Primer BM8215 não teve sua seqüência modificada pelo OLIGO versão 6.68

3.1.4. 5 Otimização da Reação em cadeia da polimerase

Todas as reações foram montadas em uma capela de fluxo laminar, para o preparo das reações foram usados tubos e ponteiras novas. O sistema de amplificação foi composto dos seguintes reagentes: Tampão 10 X (Promega), MgCl₂ (Promega), dNTP`s (Invitrogen), pares de iniciadores citados (Imprint do Brasil), Taq DNA polimerase (Promega) e DNA.

Todos os reagentes foram mantidos a – 20°C até o momento do uso, exceto o DNA molde que foi conservado a 4°C. Para o preparo da reação de amplificação a água foi o primeiro componente a ser colocado no microtubo e o último foi a Taq DNA Plimerase. Essa mistura foi dividida em microtubos com 8,0µl cada, sendo depois acrescentado 2,0 µl do DNA, fora da cabine de fluxo laminar, evitando contaminação das soluções estoque. Os microtubos contendo a reação e o DNA foram centrifugados e em seguida levados para o termociclador para os procedimentos necessários para a padronização das condições da PCR.

3.1.4. 6. Padronização da reação de PCR

Foram feitos vários testes para otimizar a PCR, conforme mostra a tabela 3 .

Tabela 3: Reagentes e suas respectivas concentrações antes e após a padronização.

Reação Inicial	Reação Padronizada
Reagente e Concentração (Fabricante)	
Tampão 10X[10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl] (Promega)	Tampão10X [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl] (Promega)
2,5 mM MgCl₂ (Promega)	1,5 mM MgCl ₂ (Promega)
2 mM dNTP`s (Invitrogen)	5 mM dNTP`s (Invitrogen)
20 pM dos pares de iniciadores (Imprint do Brasil)	5µM dos pares de iniciadores (Imprint do Brasil)
1U de Taq DNA polimerase (Promega)	1 U de Taq DNA polimerase (Promega)
50ng de DNA molde	50ng de DNA molde

3.1.4. 7. Padronização da temperatura

Na primeira análise de temperaturas de anelamento para cada marcador foi realizado um teste de gradiente de temperatura no termociclador Gradiente da marca EPPENDORF

Após o teste em gradiente de temperatura, todas as reações que seguiram foram realizadas no termociclador TC-412 (Analítica). Na tentativa de acabar com a inespecificidade trabalhou-se com cada primer separadamente, sendo realizadas variações na temperatura de anelamento e depois no número de ciclos por primer testado (Tabela 4).

Tabela 4: Programa base de utilização com reações de amplificação com marcadores microssatélite.

Fases	Temperatura (°C)	Tempo	
1- desnaturação	94	1 minuto	
2- desnaturação	94	1 minuto	} X ₂ ciclos
3-anelamento	X ₁	1 minuto	
4-extensão	72	1 minuto	
5-extensão	72	5 minutos	
Estoque	4	99horas	

X₁=Temperatura por par de primers; X₂=Número de ciclos por par de primers

Neste tópico foram comparadas as temperaturas de anelamento propostas pelo fabricante dos pares de iniciadores utilizados com as temperaturas de anelamento indicadas após a análise das seqüências de cada par de primers pelo programa Oligo versão 6.68. As temperaturas indicadas pelo fabricante dos pares de primers foram 57, 4; 58,8 e 57,1°C para os pares de primers BM1500, CSSM66 e BM8215, respectivamente. Enquanto que as temperaturas propostas pelo programa Oligo versão 6.68 foram 52,3; 57 e 53,1°C para os pares de primers BM1500, CSSM66 e BM8215, respectivamente.

3.1.4. 8. Corrida Eletroforética

Foram utilizadas na corrida eletroforética 10µl de produtos da PCR, já com o tampão de amostra, aplicados em cada canaleta do gel de poli-acrilamida não desnaturante a 8% [6,0ml de solução TBE 5X (54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico, 20ml de EDTA (0,5M pH 8,0), 8,0ml de solução de acrilamida 30% (72,5g de acrilamida, 2,5g de bis acrilamida, água destilada q.s.p 250ml de água destilada), 300µl de PSA 10%; 20 µl de TEMED (ANRESCO) e 30ml de água destilada.

As amostras depois de aplicadas foram submetidas à eletroforese, com a separação eletroforética ocorrendo por aproximadamente seis horas, a 100 V e 30 milliampers. Esta eletroforese foi realizada na cuba vertical do aparelho

de DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad), com tampão TBE 1X (600ml de TBE 5X, 2,4L de água destilada). As placas do aparelho possuíam cerca de 16cm de altura x 20cm de largura. Como base para a análise das bandas dos microssatélite foi usado o padrão de peso molecular pGEM(Promega), que apresenta bandas de 2645 a 51 pares de bases.

3.1.4. 9. Detecção de bandas

3.1.4. 9. 1.Com Brometo de etídeo

A revelação das bandas com Brometo de Etídeo foi realizada utilizando-se uma solução com 250 ml de TBE 1X e 25ml de Brometo de Etídeo (10mg/ml). O gel foi incubado por cinco minutos, em seguida transferido para solução contendo TBE 1X. Para visualização das bandas o gel foi fotografado sob luz ultravioleta no Fotodocumentador Eagle Eye II, marca Stratagene, utilizando sempre um padrão de peso molecular para estimativa do tamanho dos fragmentos.

3.1.4. 9. 2. Com Nitrato de Prata

Com a intenção de comparar os possíveis métodos de revelação das bandas, utilizou-se a coloração com Nitrato de Prata. Neste método, o gel de poliacrilamida a 8% foi colocado em uma solução de fixação (90ml de água Milli Q, 0,5 ml de ácido acético e 10 ml de etanol) por 10 minutos. Em seguida foi acrescentado ao gel solução de coloração (0,2g de Nitrato de Prata e 50ml de água Milli Q) e incubado por mais 10 minutos. As primeiras soluções foram retiradas e o gel foi lavado com 100ml de água Milli Q, por 1 minuto, a água foi desprezada sendo adicionada a solução de revelação (3,0g de hidróxido de sódio, 0,5ml de formol; 100ml de água Milli Q)por 10 minutos.

Os géis foram guardados na geladeira em solução fixadora, e posteriormente embalados em plásticos, colocados em um trasiluminador e fotografados com uma câmera digital SONY, modelo Cyber-Shot DSC-F828 para análise das bandas.

3.1.5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram otimizados os primers BM1500 e CSSM66 em reações de 20 μ L, testando cinco temperaturas de anelamento (53,1°C; 56,3°C; 58,5°C; 59,5°C e 61,4°C) em termociclador com gradiente de temperatura da marca EPPENDORF, que podem ser visualizadas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Procurou-se realizar variações de gradiente de temperatura que se aproximassem das temperaturas indicadas na literatura para os primers BM1500, que eram de 58 °C segundo Steigleder *et al.* (1997) e Fitzsimmons *et al.* (1998) e 57 °C conforme Almeida *et al.* (2007). Para o primer CSSM66, 60 °C seria a temperatura de anelamento ideal, segundo Moore *et al.* (2003) e USDA Meat Animal Research Center (<http://www.marc.usda.gov/genome/genome.html>).

Foram visualizadas bandas na região de aceite para os marcadores BM1500 e CSSM66 (Figura 1 e 2). A revelação destes resultados foi realizada corando o gel de poliacrilamida 8% com Brometo de Etídeo, tal procedimento é extremamente trabalhoso, devido a pouca espessura do gel de poliacrilamida, o que dificulta sua manipulação, principalmente ao ser levado ao Fotodocumentador para a visualização das bandas. Na avaliação dos resultados verificou-se a presença de produtos inespecíficos, que podem ser decorrentes de amplificação não otimizada, quer seja por concentrações de reagentes ou por problemas nas temperaturas de anelamento.

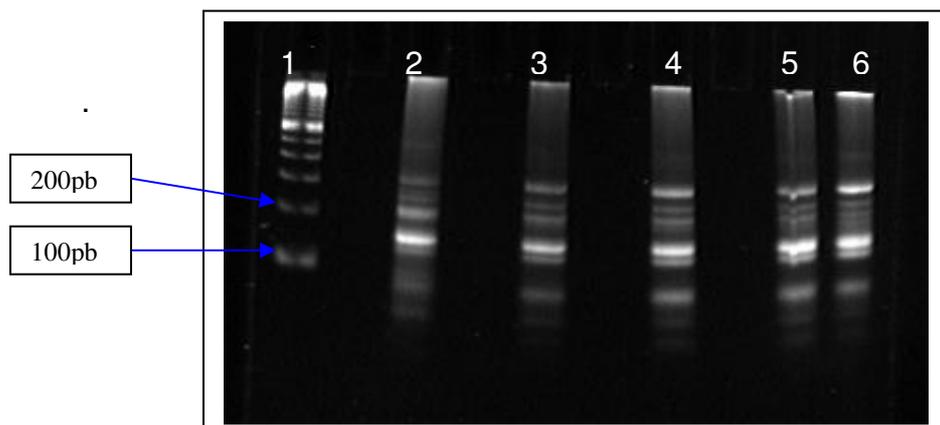


Figura 1: Teste do gradiente de temperatura para o primer BM1500 (135-147pb), no gel de poliacrilamida 8%, corado com Brometo de Etídeo. Canaleta 1 – padrão de peso molecular 100pb; Canaleta 2- 53,1°C; Canaletas 3 – 56,3°C; Canaletas 4 – 58,5°C; Canaletas 5 – 59,5°C e Canaletas 6 – 61,4°C.

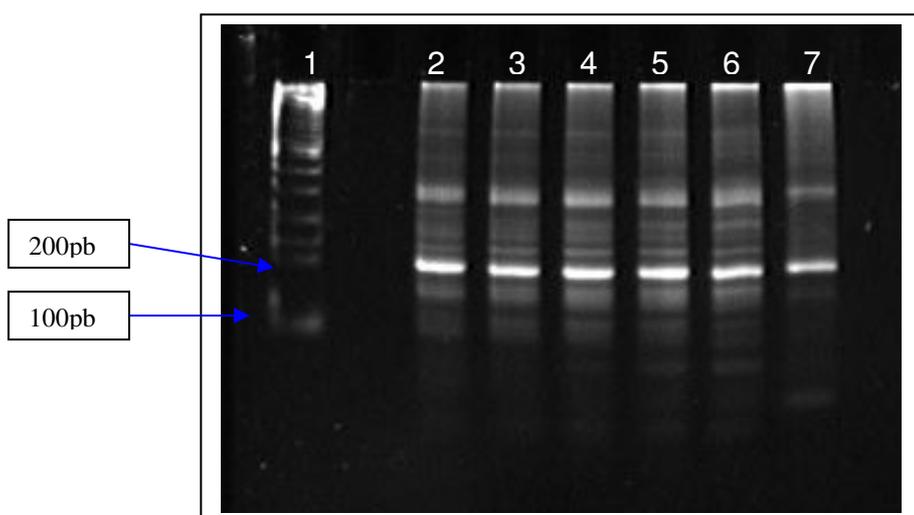


Figura 2: Teste do gradiente de temperatura para o primer CSSM66 (177-197pb), no gel de poliacrilamida 8%, corado com Brometo de Etídeo. Canaleta 1 – padrão de peso molecular 100pb; Canaleta 2- 53,1°C; Canaletas 3 – 56,3°C; Canaletas 4 – 58,5°C; Canaletas 5 – 59,5°C e Canaletas 6 – 61,4°C.

Na tentativa de confirmar tais resultados foi realizado um teste com o primer BM1500 nas mesmas condições citadas anteriormente, porém utilizando 58°C de temperatura de anelamento e 40 ciclos de repetição, em tal teste confirmou-se a inespecificidade dos produtos da reação (Figura 3).

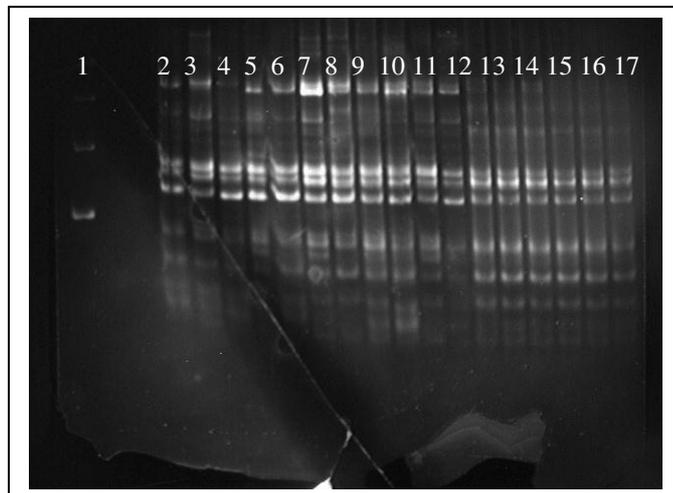


Figura 3: Teste para o primer BM1500(135-147pb), no gel de poliacrilamida 8%, corado com Brometo de Etídeo. Canaleta 1 – padrão de peso molecular 100pb; Canaleta 2- 17- amostras de DNA bovino amplificadas com o primer BM1500.

Buscou-se propor uma alternativa para resolver os problemas das bandas inespecíficas geradas na PCR. Para tal, foram realizados testes que incluíam variações na concentração de reagentes como $MgCl_2$ e dNTPs, na temperatura de anelamento e no número de ciclos de repetição.

A etapa seguinte da padronização da PCR para primers microssatélites incluiu a variação da concentração do cloreto de magnésio e dos desoxinucleotídeos. Tais alterações levaram em consideração citações de literatura como as de Saiki (1989), que relata que o excesso de $MgCl_2$ resulta em acúmulo de produtos de amplificação inespecíficos e sua falta na redução do rendimento da PCR. Relatando, também, que a concentração de $MgCl_2$ é dependente da concentração dos desoxinucleotídeos (dNTP), uma vez que esses se ligam ao magnésio tornando-o disponível no meio.

Desta maneira a segunda PCR para otimização da reação foi realizada em microtubos contendo 10 μ L de reação composta de Tampão 10 X [10 mM

Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 5 mM dNTP`s e 5µM dos pares de iniciadores citados, 1 U de Taq DNA polimerase e 50ng de DNA, variando desta forma as concentrações de cloreto de magnésio e dNTPs.

Na segunda parte da padronização da PCR, os géis foram corados com Nitrato de Prata. Na interpretação dos resultados verificou-se que em todos os primers foram visualizados produtos inespecíficos (Figura 4, 6 e 8), tais produtos foram mais visíveis no gel corado com Nitrato de prata do que no gel corado com Brometo de Etídeo. Esse resultado mostra que quando não se visualiza as bandas inespecíficas no gel corado com esse método, não significa que elas não estejam presentes. Possivelmente, o Brometo de Etídeo utilizado como corante para o gel de poliacrilamida pode não ser eficiente na detecção dessas bandas.

Tais resultados sugeriam a necessidade de realizar alterações em relação à temperatura de anelamento e ao número de ciclos de repetição, visto que as alterações na concentração de reagentes não foram suficientes para a diminuição na quantidade de produtos inespecíficos. Desta maneira para os primers BM1500, CSSM66 e BM8215 a temperatura utilizada como base para variação foi a de 60°C (maior temperatura dentre a indicada para os três primers) e o número de ciclos foi o máximo proposto para reações de microssatélite, 40 ciclos.

A figura 5 mostra o primer BM1500 com a temperatura ideal de anelamento de 58°C e 40 ciclos de repetição, tais modificações na temperatura de anelamento foram suficientes para diminuir consideravelmente a quantidade de produtos inespecíficos visualizados na figura 4. A temperatura ideal para o BM1500 foi inferior à temperatura ideal para os outros dois primers (CSSM66 e BM8215) e o número de ciclos de repetição maior do que o ideal para os demais primers. A temperatura de anelamento ideal foi cerca de 1% superior à indicada pelo fabricante do primer (57,4°C) e cerca de 10 % superior à indicada pelo programa Oligo (52,3°C).

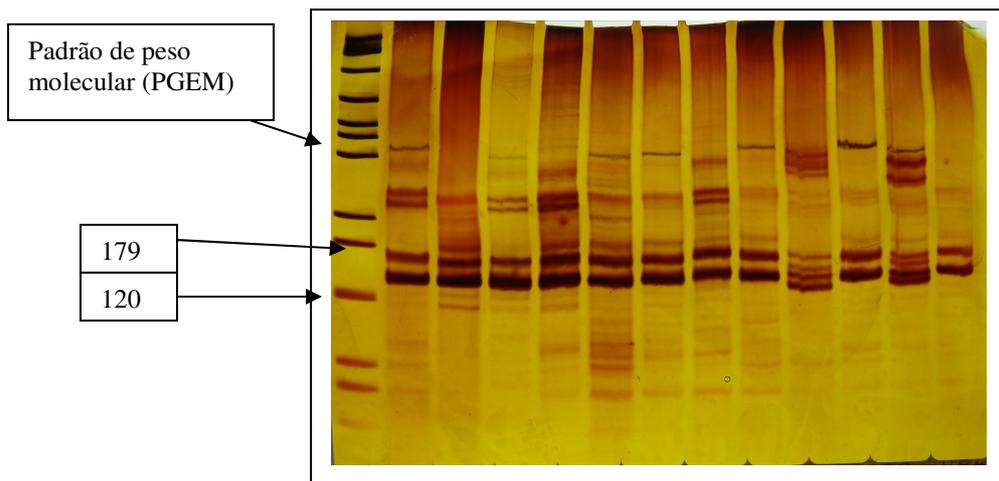


Figura 4: Gel de acrilamida a 8% do primer BM1500 (135-147pb) apresentando muitas bandas inespecíficas.

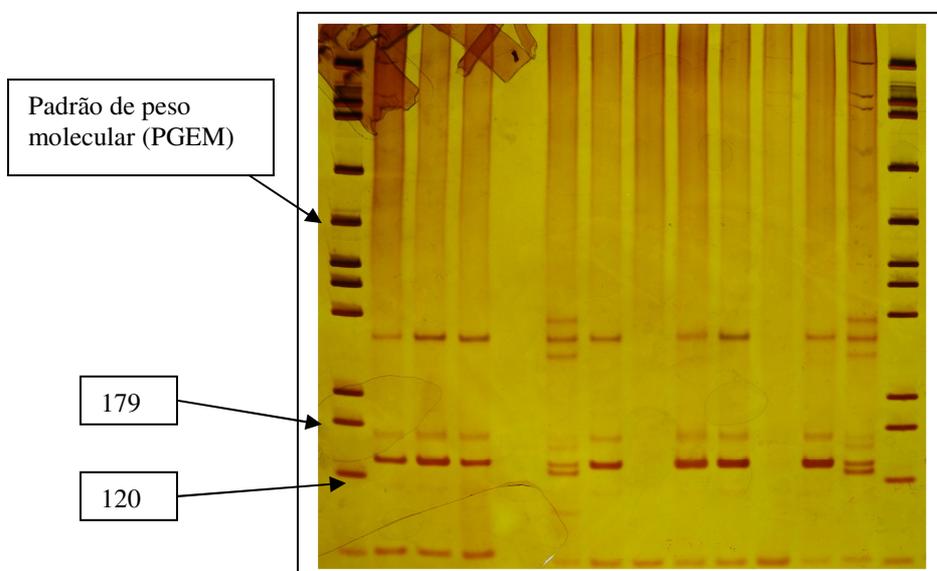


Figura 5: Gel de acrilamida a 8% do primer BM1500 (135-147pb), onde as bandas apresentaram-se de forma satisfatória devido à padronização da temperatura e número de ciclos.

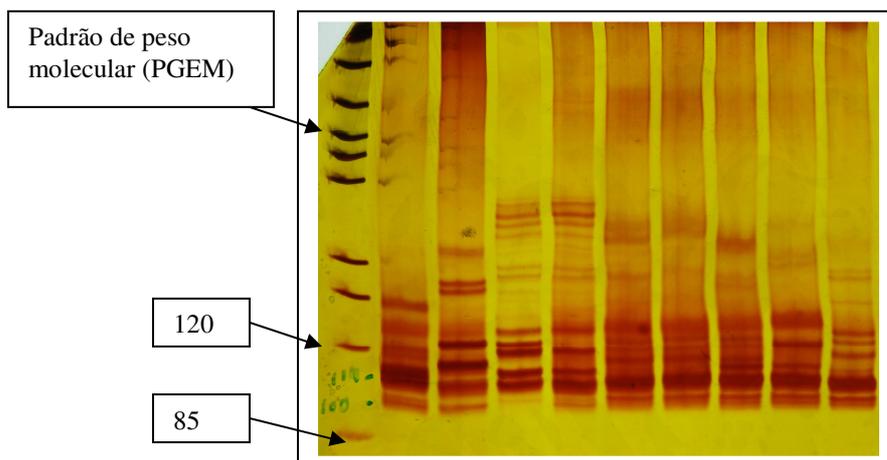


Figura 6: Gel de acrilamida a 8% do primer BM8215 (116-140pb) apresentando muitas bandas inespecíficas.

Para o primer BM8215 (Figura 7) a temperatura ideal de anelamento foi superior à utilizada como base, sendo de 61°C e superior às temperaturas ideais para os primers BM1500 e CSSM66, com um número de ciclos de repetição 10 ciclos inferior ao inicial e ao ideal para o primer BM1500 e cinco ciclos inferior ao ideal para o primer CSSM66. A temperatura de anelamento ideal foi cerca de 7% superior à indicada pelo fabricante (57,1°C) e cerca de 13% superior à indicada pelo programa Oligo (53,1°C).

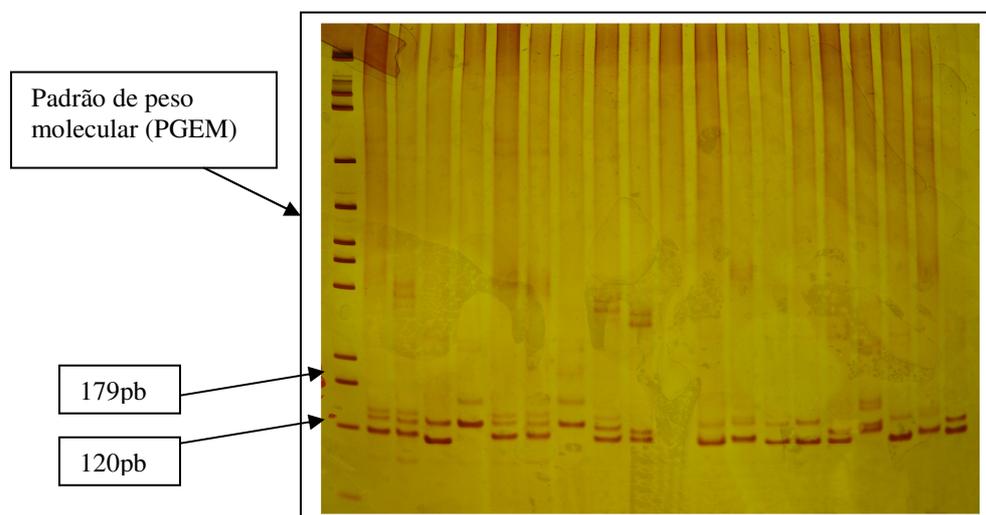


Figura 7: Gel de acrilamida a 8% do primer BM8215 (116-140pb), onde as bandas apresentaram-se de forma satisfatória devido à padronização da temperatura e número de ciclos.

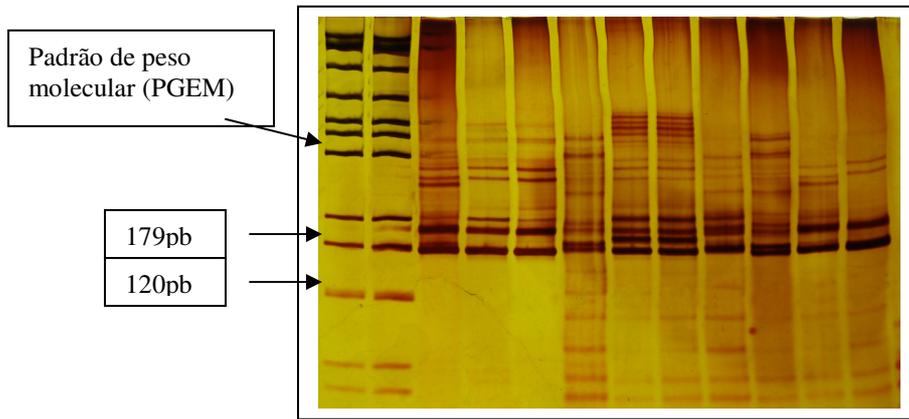


Figura 8: Gel de acrilamida a 8% do primer CSSM66 (177-197pb) apresentando muitas bandas inespecíficas.

Para o primer CSSM66 a temperatura ideal de anelamento foi de 59°C (Figura 9), cerca de 1°C inferior à temperatura base, superior ao primer BM1500 e inferior ao primer BM8215, com o número de ciclos de repetição maior que para o primer BM8215 e menor que o primer BM1500. A temperatura de anelamento ideal foi cerca de 1% superior à indicada pelo fabricante (58,8°C) e cerca de 4% superior à indicada pelo programa Oligo (57°C).

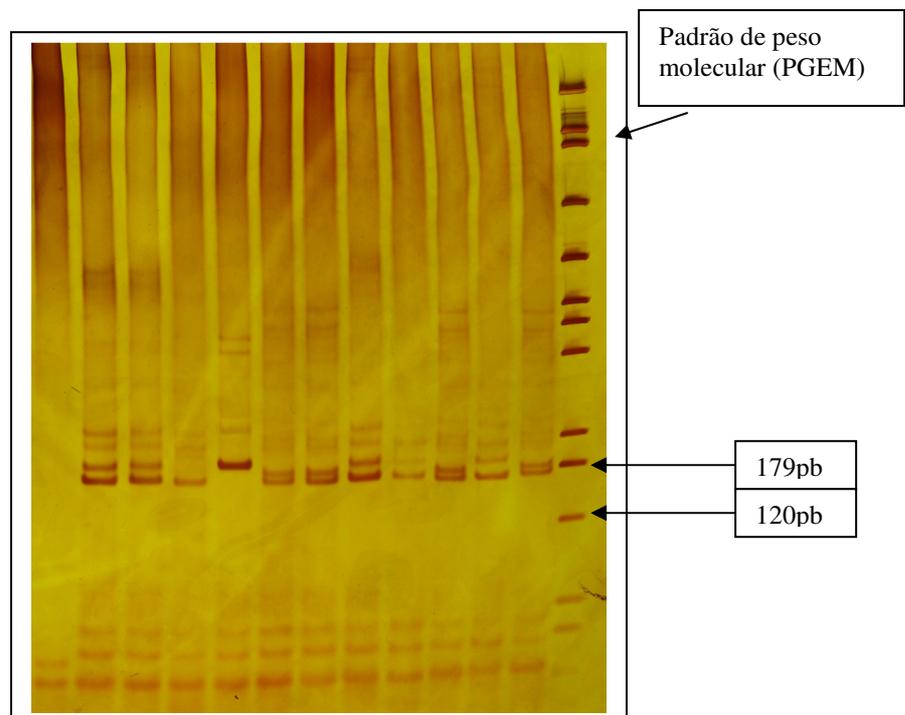


Figura 9: Gel de acrilamida a 8% do primer CSSM66 (177-197pb), onde as bandas apresentaram-se de forma satisfatória após a padronização da temperatura e número de ciclos.

Os resultados revelaram diminuição de produtos inespecíficos para todos os primers após a otimização da reação em Cadeia da Polimerase para cada primer. Os resultados encontrados neste estudo confirmam as citações de autores como Paton *et al.* (2000), que relatam que condições ideais de amplificação, como concentrações de magnésio, de enzimas, de primers e de temperaturas de anelamento devem ser definidas para cada par de primers.

Concordando também com Penner *et al.* (1993) e Warg *et al.* (1993), apud, Ferreira e Gratapaglia (1996), que citam que a padronização das condições de amplificação são imprescindíveis para se obter resultados satisfatórios da técnica de PCR, já que há uma variação entre ambientes diferentes (de laboratório para laboratório).

Tabela 5: Primers utilizados, sua localização, seqüência utilizada neste trabalho, número de ciclos de repetição, temperaturas propostas pelo fabricante, propostas pelo programa Oligo e otimizadas para pesquisa.

Primer	Cr	Seqüência utilizada	Nº ciclos	Tº Fabricante	Tº Oligo	Tº otimizada
BM1500	04	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG		57,4°C	52,3	58
		Reverse Primer Sequence: CCATTGCTAGAACCCAGG	40			
CSSM66	14	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCT	30	58,8°C	57	59
		Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTG G				
BM8215	14	Forward Primer Sequence: CCAAAGAAGCTGAAGTTGACTG		57,1°C	53,1	61
		Reverse Primer Sequence: CTGACTTTTGCATTTCAACCC	35			

3.1.6. CONCLUSÕES

Devido à aplicabilidade dos marcadores microssatélite na construção de mapas genéticos e na busca por locos de influência em características de interesse em diversas espécies, resultados de estudos que visem relatar a otimização da técnica microssatélite demonstram importância relevante, visto que, a padronização das condições de PCR é uma etapa difícil desta técnica. Isso se torna ainda mais necessário devido à sensibilidade das técnicas moleculares a diferentes ambientes.

Diante disto é importante destacar que existe uma carência de relatos sobre a otimização da Reação em Cadeia da Polimerase para estes marcadores, ressaltando a importância destes resultados.

3.1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERREIRA, M. E, GRATAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM.
- FERREIRA, M. E, GRATAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 220p.
- MOURA DUARTE, F. A.; ZAGO, M. A.; BARROS, M. P. M.; ROSSI, E. R. – tradução e revisão (1999). DNA Thechnology in Forensic Science. In: Tipagem do DNA: Considerações Técnicas. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP.
- MULLIS, K. B. 1990. The unusual origin of the polimerase chain reaction. Scientific American, v.262, p.36-42.
- NICHOLAS, F. W. 1999. Biologia Molecular. In: Introdução à Genética Veterinária. Porto Alegre: Artmed, p.57-91.
- PATON, D. J.; MCGOLDRICK, A.; BELAK, S.; *et al.* 2000. Classical swine fever vírus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. Veterinary Microbiology, v. 73, n.2, p.159-174.
- REGITANO, L. C. A & COUTINHO, L. L. 2001. Biologia aplicada á Produção Animal. Brasília: Embrapa. 215p.
- SAIKI, R. K., S. SCHARFF, FALONAK, B. MULLIS, G. T. HORN *et al.*, 1985 Enzymatic amplification of *beta-globin* genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. Science 230 1350-1354.
- SAIKI, R. K. 1989. The design and optimization of the PCR. In: ERLICH, H. A., ed. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. UK: Macmillan Publishers, p.7-16.

3.2. ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS STRS LIGADOS À REGIÕES CANDIDATAS NOS CROMOSSOMOS 4 E 14 COM CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO EM GADO DE CORTE

3.2.1. RESUMO

O objetivo deste estudo foi associar locos microssatélites, ligados a regiões candidatas nos cromossomos 4 e 14 às características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha (EGCP), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Marmoreio (MAR) e peso em bovinos de corte. Para tanto foram utilizados os primers microssatélite BM1500, CSSM66 e BM8215, citados na literatura como associados a regiões candidatas. Após serem computados os resultados dos animais testados para os locos microssatélites citados, foi feita a análise estatística (SAS, 1996), para associação entre os dados quantitativos e moleculares. Foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) nos grupos genéticos para as características AOL, EGC, EGCP, Peso, MAR. Não sendo verificadas associações entre os tamanhos de alelo para os marcadores BM8215 e CSSM66 e as características AOL, EGCP, EGC, Peso. Foram encontradas associações entre as características AOL, EGCP, EGC, Peso e MAR e os tamanhos de alelo do marcador BM1500, com o alelo BM1500*138 apresentando maiores valores para as características EGC, EGC e AOL na análise dentro dos grupos G1, G3, G4 e G5, tendo sido encontrado no G2 maiores valores para as mesmas características nos animais portadores do alelo BM1500*140. Conclui-se que as informações de associação de

marcadores ligados a genes candidatos devem ser avaliadas por população de estudo, pois um alelo marcador afetando uma característica em uma população pode não estar em outra.

3.2.2.ABSTRACT

This study has as objective to associate microsatellites locos, related to candidate regions in chromosome 4 and 14, with Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling score (MAR) and weight (W) characteristics in beef cattle. It was used BM1500, CSSM66 and BM8215 microsatellites primers, listed in the literature as associated with the candidates regions. The allele frequencies were estimated by direct counting the electrophoresis fragments. Statistics analysis was performed using the SAS program (1996) associating quantitative and molecular data. There was significant difference ($P>0,05$) in genetics groups for Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling score (MAR) and weight (W) characteristics. Also, it wasn't verified association between the size of the allele for BM8215 and CSSM66 primers and Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), and weight (W) characteristics. Associations between Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT), subcutaneous fat thickness (SFT), marbling score (MAR) and weight (W) characteristics with the size of the allele for BM1500 primer were found, the BM1500*138 allele showing higher values for Longissimus Dorsi Area (LDA), Picanha subcutaneous fat thickness (PSFT) and subcutaneous fat thickness (SFT) in G1, G3, G4 and G5 groups. The G2 group had higher values for the same characteristics in animals with the BM1500*140 allele. It can be concluded that the information's about association of markers related to candidates genes must be evaluated for each studied population, since one

marker allele that influences one population can be missing in another population.

3.2.3.INTRODUÇÃO

Na pecuária de corte, a redução dos custos de produção é alcançado com a redução da idade de abate. Para tanto é necessário o uso de práticas de manejo adequadas e seleção de animais mais precoces, e ainda, que apresentem potencial genético para obter maior desenvolvimento muscular e deposição de gordura de suas carcaças em curto espaço de tempo. Neste contexto, a seleção é feita em características quantitativas, de natureza poligênica, sendo realizada sem o conhecimento do número de genes que atuam na característica de interesse nem do efeito de cada gene.

De acordo com Ihara et al (2007), marcadores microssatélite são excelentes marcadores para estudos de localização de QTLs quando se analisam características poligênicas, devido ao fato de serem altamente polimórficos e possuírem distribuição abundante no genoma.

Neste contexto muitos estudos têm sido realizados na busca por QTLs analisando regiões cromossômicas que possam ser associadas a características de importância econômica. (Stone, 1999; Casa et al., 2000; Casas et al., 2001; Kim et al., 2003; Thaller, 2003; Mizoshita et al., 2004).

Para a análise de características de acabamento precoce em gado de corte destaca-se a avaliação de regiões candidatas nos cromossomos 4 e 14, devido a presença dos genes da leptina, tiroglobulina e diacylglycerol acyltransferase (Fitzsimmons et al., 1998; Moore et al., 2003).

A leptina é um importante regulador do metabolismo energético, adiposo e reprodutivo. Também envolve a regulação de peso corporal e pode ser considerado um marcador biológico afetando a quantidade de gordura corporal em animais e humanos. (Oprzadek et al., 2003).

O gene da leptina possui aproximadamente 18,9 kb, localiza-se no cromossomo 4 a 3,6 Kb 3' do stop códon (Pomp et al., 1997). É composto por três exons que perfazem aproximadamente 3,2 kb e dois íntrons que somados representam 15,7 kb (Salman, 2004).

O gene da leptina é considerado gene candidato para performance, carcaça e qualidade de carne em bovinos (Fitzsimmons et al, 1998; Buchaman et al., 2002; Lagonigro, 2003). Muitos polimorfismos de nucleotídeo simples (SNP) também são reportados no gene da leptina com alguns polimorfismos associados ao exon 2 (Buchaman et al., 2002; Nkrumah et al., 2005) ou na região promotora (Buchaman et al., 2002; Crews et al., 2004).

Almeida et al (2007) citam polimorfismos ligados ao gene da leptina influenciando na regulação do gene. Para estes autores tais polimorfismos afetariam a expressão fenotípica das características influenciadas por este gene, por influenciarem o controle de expressão do gene ou pelo desequilíbrio de ligação dos alelos com algumas mutações do gene, alterando sua função ou expressão. Muitos marcadores microssatélite altamente polimórficos foram citados na mesma região cromossômica do gene da leptina, descrevendo polimorfismos ligados ao gene (Stone et al. 1996; Wilkins e Davey. 1997).

De acordo com Fitzsimmons et al. (1998), estes marcadores estariam potencialmente ligados a polimorfismos dentro do gene da leptina, conduzindo a variações na composição de carcaça. Ao analisarem as variantes alélicas do microssatélite BM1500 (próxima ao gene da leptina), estes autores observaram que os alelos com 138 pares de base estão relacionados com altos níveis de deposição de gordura na carcaça, enquanto alelos com 147 pares de base estão relacionados com níveis menores de deposição.

Almeida et al. (2007) analisaram as variantes do microssatélite BM1500 associando-as a ganho de peso de vacas no pós-parto, citando que os animais portadores do alelo de 136 pares de base possuíam maior ganho de peso quando comparados aos animais portadores dos demais alelos (138pb, 142pb, 144pb, 146pb, 148pb, 150pb).

Da mesma maneira que o cromossomo 4, devido à presença do gene da leptina, o cromossomo 14 do bovino tem sido alvo de análise por marcadores microssatélites.

Neste cromossomo Mizoshita et al. (2004) relataram a presença de um QTL afetando espessura de gordura de cobertura, tal QTL foi localizado na mesma região nos estudos realizados por Stone et al.(1999); Casas et al. (2001) e Moore et al. (2003). Estes autores citaram também a localização de um QTL para marmoreio na mesma posição onde Grisart et al. (2002) e Winter et al. (2002) identificaram o gene DGTA1, associado à quantidade de gordura no leite. Já Barendse (1999) observou associação de marmoreio com o microssatélite CSSM66, próximo ao gene da tiroglobulina.

De acordo com Moore et al. (2003), a forte evidência de um QTL para deposição de gordura associado ao marcador CSSM66, indica a probabilidade de que os genes próximos a este marcador (Gene tiroglobulina e o gene diacylglycerol acyltransferase) afetem de forma considerável o metabolismo de lipídeos.

Aswell et al. (2001) encontraram associação entre o microssatélite BMS1678, localizado no cromossomo 14 (próximo ao gene da Tiroglobulina) e percentagem de gordura, confirmando a associação de marcadores microssatélites neste cromossomo e características de deposição de gordura em gado de corte.

De acordo com Schenkel et al. (2005), antes de estas informações serem usadas de maneira eficiente em sistemas de produção, estudos com diferentes populações são necessários para proporcionar maior robustez aos resultados de associação dos polimorfismos genéticos com características de produção.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar o polimorfismo de regiões STRs (BM1500, BM8215 e CSSM66) localizadas nos cromossomos 4 e 14, associando-os a características como: área de olho de lombo, espessura de gordura de cobertura, espessura de gordura de cobertura de picanha, marmoreio (obtidas por meio da técnica de ultrassonografia) e peso de abate em animais de raças zebuínas de rebanhos elite das raças Nelore e Guzerá e em animais de cruzamentos de *B. taurus taurus* com raças zebuínas.

3.2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.4. 1. *Animais* e Coleta de material

Foram utilizados dados de 129 animais com peso médio de $497 \pm 93,8\text{kg}$, sendo o G1= 51 fêmeas da raça Guzerá, G2= 50 fêmeas da raça Nelore; o G3= 8 fêmeas oriundas do cruzamento de touro Limousin com fêmeas Nelore (F_1), finalizando com macho Guzerá obtendo o F_2 terminal ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Limousin x $\frac{1}{4}$ Nelore), o G4= 12 fêmeas oriundas do cruzamento de touro Simbrasil com fêmeas Nelore (F_1), finalizando com macho Guzerá obtendo o F_2 terminal ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simbrasil x $\frac{1}{4}$ Nelore), o G5= 8 fêmeas oriundas do cruzamento de touro Simental com fêmeas Nelore (F_1), finalizando com macho Guzerá obtendo o F_2 terminal ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simental x $\frac{1}{4}$ Nelore).

Amostras de pêlo foram coletadas da vassoura da cauda dos animais, sendo armazenadas em envelopes de papel, estes foram identificados com o número de registro dos animais, fazenda e grupo genético.

3.2.4. 2. *Coleta de dados de produção*

Foram coletados dados da avaliação das características da carcaça por meio de ultrasonografia no animal vivo. Foram avaliadas: a espessura de gordura de cobertura (EGC), espessura de gordura de cobertura de picanha (EGCP), área de olho do lombo (AOL) (entre a 12^a e 13^a costelas) e marmoreio, com a utilização do aparelho de ultra-som Aloka 500V, equipado

com transdutor de 3,5 MHz de 17,2 cm com capacidade de fornecimento de medidas imediatamente (modo real-time).

O marmoreio foi determinado pelo ultra-som, obtendo-se o grau de marmoreio de acordo com a quantidade de gordura entremeada aparente. Seguindo a seguinte escala: Abundante (6), moderado (5), médio (4), pequeno (3), leve (2) e traço (1) de acordo com Muller (1980).

3.2.4. 3. *Extração do DNA genômico*

Foram coletados de 5 a 8 bulbos íntegros em microtubos. Em seguida adicionou-se 50µl de solução de lise (200Mm NaOH). Os microtubos foram colocados no termociclador e incubados a 97°C por 15 minutos. Na próxima etapa, adicionou-se 50µl de solução neutralizante (200Mm HCl; 100Mm Tris-HCl ph 8,5), homogenizando bem. Após a realização de todas as etapas de extração as alíquotas foram armazenadas em geladeira a 4°C.

3.2.4. 4. *Seleção de iniciadores*

Na primeira etapa foi realizada busca na literatura e no banco de dados por seqüências de primers desenhados especificamente para bovinos e que já tivessem sido citados como tendo associação com características economicamente importantes em gado de corte, desta busca foram selecionados três primers (Tabela 1).

Tabela 1: Seqüência dos primers utilizados na padronização

Marcador	Cromossomo	Tamanho de alelos	Seqüência da literatura
BM1500	04	135-147pb	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG Reverse Primer Sequence: CCCATTGCTAGAACCCAGG
CSSM66	14	177-197pb	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG
BM8215	14	116-140pb	Forward Primer Sequence: CCAAAGAAGCTGAAGTTGACTG Reverse Primer Sequence: CTGACTTTTGCATTTCAACCC

Após a escolha destes primers foi realizada a análise de suas seqüências utilizando o programa Oligo versão 6.68. Foram feitas algumas alterações nos desenhos dos primers BM1500 e CSSM66, com a intenção de obter maior especificidade dos primers selecionados (Tabela 2).

Tabela 2: Seqüência original dos primers e seqüência modificada pelo Oligo versão 6.68.

Marcador	Cr	Seqüência da literatura	Seqüência modificada
BM1500	04	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG
		Reverse Primer Sequence: CCCATTGCTAGAACCCAGG	Reverse Primer Sequence: C*CCATTGCTAGAACCCAGG
CSSM66	14	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAG CT*GA
		Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAG CTTGG

3.2.4. 5. Reação em cadeia da polimerase

Todas as reações foram montadas em capela de fluxo laminar, para o preparo das reações foram usados tubos e ponteiros novas. O sistema de amplificação foi composto dos reagentes: Tampão10X [10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl] (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 5 mM dNTP`s (Invitrogen), 5µM dos pares de iniciadores (Imprint do Brasil), 1 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 50ng de DNA molde.

Todos os reagentes foram mantidos a – 20°C até o momento do uso, exceto o DNA molde que foi conservado a 4°C. Para o preparo da reação de amplificação a água foi o primeiro componente a ser colocado no microtubo e o último foi a Taq DNA polimerase. Essa mistura foi dividida em microtubos com 8,0µl cada, sendo depois acrescentado 2,0 µl do DNA, fora da cabine de fluxo laminar, evitando possíveis contaminações das soluções estoque.

Os microtubos contendo a reação e o DNA foram centrifugados e em seguida levados para o termociclador TC-412 (Analítica). O programa utilizado na PCR está representado na tabela 3. Cada primer possuía temperaturas e números de ciclos diferentes, para o primer BM1500 a temperatura de anelamento foi de 58°C com 40 ciclos de repetição, para o primer CSSM66 a

temperatura de anelamento foi de 59°C com 30 ciclos de repetição, para o primer BM 8215 a temperatura de anelamento foi de 61°C com 35 ciclos de repetição.

Tabela 3: Programa base de utilização com reações de amplificação com marcadores microssatélite.

Fases	Temperatura (°C)	Tempo
1- desnaturação	94	1 minuto
2- desnaturação	94	1 minuto
3-anelamento	X ₁	1 minuto
4-extensão	72	1 minuto
5-extensão	72	5 minutos
Estoque	4	99horas

X₂ ciclos

X₁=Temperatura por par de primers; X₂=Número de ciclos por par de primers

3.2.4. 6. *Corrida Eletroforética*

Foram utilizadas na corrida eletroforética 10µl de produtos da PCR, já com o tampão de amostra 2X, aplicados em cada canaleta do gel de poliacrilamida não desnaturante a 8% [6,0ml de solução TBE 5X (54g de Tris base, 27,5g de ácido bórico, 20ml de EDTA (0,5M pH 8,0), 8,0ml de solução de acrilamida 30% (72,5g de acrilamida, 2,5g de bis acrilamida, água destilada q.s.p 250ml de água destilada), 300µl de PSA 10%; 20 µl de TEMED (ANRESCO) e 30ml de água destilada.

As amostras depois de aplicadas foram submetidas à eletroforese por aproximadamente seis horas, a 100 V e 30 milliampers. A corrida foi realizada em cuba vertical do aparelho de DCodeTM Universal Mutation Detection System (BioRad), com tampão TBE 1X (600ml de TBE 5X, 2,4L de água destilada). As placas do aparelho possuíam cerca de 16cm de altura x 20cm de largura. Como base para a análise das bandas dos microssatélite foi usado o padrão de peso molecular pGEM (Promega), que apresenta bandas de 2645 a 51 pares de bases.

3.2.4. 7. Detecção de bandas com Nitrato de Prata

Para a detecção das bandas utilizou-se a coloração com Nitrato de Prata. Neste método o gel de poliacrilamida a 8% foi colocado em uma solução de fixação (90ml de água Milli Q, 0,5 ml de ácido acético e 10 ml de etanol) por 10 minutos. Em seguida foi acrescentado ao gel solução de coloração (0,2g de Nitrato de Prata e 50ml de água Milli Q) e incubado por mais 10 minutos. As primeiras soluções foram retiradas e o gel foi lavado com 100ml de água Milli Q, por 1 minuto, a água foi desprezada sendo adicionada a solução de revelação (3,0g de hidróxido de sódio, 0,5ml de formol; 100ml de água Milli Q) por 10 minutos.

Os géis foram guardados na geladeira em solução fixadora, e posteriormente embalados em plásticos, colocados em trasiluminador e fotografados com câmera digital SONY, modelo Cyber-Shot DSC-F828 para posterior análise das bandas.

As informações moleculares foram então incorporadas às planilhas de dados quantitativos, para verificar se havia alguma influência dos marcadores BM1500, CSSM66 e BM8215 na Área de Olho de Lombo, Espessura de Gordura de Cobertura, Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha e Marmoreio.

3.2.4. 8. Análise Estatística

As freqüências alélicas foram estimadas por contagem direta, a partir dos genótipos obtidos em eletroforese. Após serem computados os resultados dos animais testados para os locos microssatélites citados, foi feita a análise estatística.

Foi realizada a análise de variância para verificar o efeito de grupo genético e dos diferentes tamanhos alelos nas características de produção estudadas de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + GG_i + TA_j + e_{ijk}$$

onde:

Y_{ijk} = característica de produção (Peso, área de olho de lombo, espessura de gordura de cobertura e marmoreio),

μ = média geral,

GG_i = efeito fixo do i -ésimo grupo genético,

TA_j = efeito fixo do k -ésimo tamanho de alelo,

e_{ijk} = erro aleatório.

Foi testada, também, a interação entre grupo genético e tamanho de alelos, entretanto, como a mesma não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$), foi excluída do modelo final de análise.

3.2.5.RESULTADOS

O número de alelos por locos na população estudada variou de 3 (CSSM66) a 6 (BM8215). A frequência de alelos por grupo genético para os marcadores BM1500, CSSM66 e BM8215 é apresentada na tabela 4.

Para o marcador BM1500 localizado no cromossomo 4, foram detectados quatro alelos de aproximadamente 138; 140; 142 e 146 pares de base.

Para o marcador CSSM66, localizado no cromossomo 14, foram detectados três alelos de aproximadamente 177; 179 e 190 pares de base.

No BM8215, localizado no cromossomo 14, foram detectados seis alelos de 116, 120, 126, 132, 138 e 140 pares de bases aproximadamente.

Tabela 4: Freqüência de alelos para os dois diferentes marcadores STR nos cinco diferentes grupos genéticos.

STRs	Alelos (%)					
Grupo Genético						
Cromossomo 04						
BM1500	138	140	142	146		
G1-Guzerá	15,1	33,9	32,1	18,9		
G2-Nelore	42	58	—	—		
G3- Limousin-Nel-Guz	38	62	—	—		
G4-Simbrasil-Nel-Guz	7,7	92,3	—	—		
G5- Simental-Nel-Guz	20	80	—	—		
Cromossomo 14						
CSSM66	177	179	190			
G1-Guzerá	54,9	22,5	22,5			
G2-Nelore	83,9	16,1	-			
G3- Limousin-Nel-Guz	58,3	16,7	25			
G4-Simbrasil-Nel-Guz	78,6	14,3	21,4			
G5- Simental-Nel-Guz	40	40	20			
BM8215	116	120	126	132	138	140
G1-Guzerá	18,3	48,3	11,7	13,4	-	8,3
G2-Nelore	-	45,7	15,7	12,3	14	12,3
G3- Limousin-Nel-Guz	16,7	41,6	8,3	16,7	-	16,7
G4-Simbrasil-Nel-Guz	10	38	5,2	5,2	-	42,6
G5- Simental-Nel-Guz	45,5	36,5	-	9,1	-	9,1

%= freqüência do tamanho dos alelos na amostra

O alelo BM1500*138 foi mais freqüente no G2, composto por animais da raça Nelore (42%), enquanto o alelo BM1500*140 foi mais freqüente no G4 (92,3%), composto pelo F₂ terminal (½ Guzerá x ¼ Limousin x ¼ Nelore). Somente os animais do G1 apresentaram os alelos BM1500*142 e BM1500*146, apresentando maior freqüência do alelo BM1500*142 (32,1%).

Para o marcador CSSM66, verificou-se que em todos os grupos genéticos existiam animais portadores dos alelos CSSM66*177 e CSSM66*179. O alelo CSSM66*177 foi mais freqüente no G2 (83,9%), o alelo CSSM66*179 foi mais freqüente no G5 (40%). Para o alelo CSSM66*190 foram verificadas maiores freqüências no G3 (25%). Sendo também verificado que os animais do G2, da raça Nelore, não apresentaram o alelo CSSM66*190.

Na análise do marcador BM8215, verificou-se que os animais dos grupos G1, G2 e G3 apresentaram maior freqüência do alelo BM8215*120, enquanto os animais do G4 e G5 apresentaram maiores freqüências dos alelos BM8215*140 e BM8215*116, respectivamente. Não foi detectada a presença do alelo BM8215*126 no G5, verificou-se também que somente os animais do G2 não foram portadores do alelo BM8215*116 e que somente estes animais foram os portadores do alelo BM8215*138.

Na análise de variância foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre grupos genéticos para as características AOL, EGCP, EGC e Peso. Foram verificadas, também, diferenças significativas entre tamanhos de alelos do marcador BM1500 para AOL, EGCP, EGC e Peso. Porém, não foram verificadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre as características citadas e os tamanhos de alelos para os marcadores CSSM66 e BM8215.

As médias e os respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microssatélite CSSM66 e BM8215 são apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microsatélite CSSM66.

Alelo	Características			
	AOL (cm ²)	EGC(mm)	EGCP(mm)	Peso(kg)
CSSM66*177 (108)	70,2±12,7 ^a	5,2 ±1,6 ^a	7,3±2,1 ^a	504,6±95,1 ^a
CSSM66*179 (33)	72,1 ±14,2 ^a	5,2±1,7 ^a	7,0±2,4 ^a	493,6±102,2 ^a
CSSM66*190 (22)	69,7±16,7 ^a	5,1±1,7 ^a	6,6±2,5 ^a	484,5±106,1 ^a

AOL – Área de olho de lombo em cm²; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm.

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Tabela 6: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microsatélite BM8215.

Alelo	Características			
	AOL (cm ²)	EGC(mm)	EGCP(mm)	Peso(kg)
BM8215*116 (20)	68,0±16,9 ^a	5,5 ±1,8 ^a	6,5±2,7 ^a	485,1±122,4 ^a
BM8215*120 (71)	71,1 ±13,0 ^a	5,3±1,6 ^a	7,5±2,2 ^a	501,9±98,6 ^a
BM8215*126 (18)	69,3±9,9 ^a	4,5±1,3 ^a	6,8±1,8 ^a	493,2±50,0 ^a
BM8215*132 (19)	71,9±12,1 ^a	5,1 ±1,2 ^a	7,1±1,6 ^a	490±85,7 ^a
BM8215*138 (8)	69,4±4,9 ^a	4,7±0,7 ^a	7,3±0,5 ^a	467,1±55,2 ^a
BM8215*140 (23)	69,6±10,5 ^a	5,6±2,0 ^a	7,5±2,3 ^a	491,1±67,7 ^a

AOL – Área de olho de lombo em cm²; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

A Área de Olho de Lombo apresentou média geral de $70,3 \pm 12,7 \text{ cm}^2$; na Espessura de Gordura de Cobertura a média geral foi de $5,2 \pm 1,5 \text{ mm}$, na Espessura de Gordura de Cobertura Picanha de $7,0 \pm 2,2 \text{ mm}$ e para o peso a média geral foi de $497,7 \pm 93,8 \text{ Kg}$

Na Tabela 7 se apresentam as médias para as características, de acordo com o grupo genético. Os maiores valores para as características Peso e Área de Olho de Lombo foram verificados nos animais do G1 ($521,9 \pm 109,3 \text{ kg}$ e $75,9 \pm 16,3 \text{ cm}^2$, respectivamente), enquanto que os maiores valores para Espessura de Gordura de Cobertura e Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha foram detectados no G4 ($7,6 \pm 1,1 \text{ mm}$ e $9,3 \pm 1,8 \text{ mm}$, respectivamente).

Tabela 7: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e peso em relação aos grupos genéticos estudados.

GG (n)	Características			
	AOL (cm^2)	EGC (mm)	EGCP (mm)	Peso (Kg)
1 (51)	$75,9 \pm 16,3^a$	$5,2 \pm 1,8^{bc}$	$7,1 \pm 2,7^a$	$521,9 \pm 109,3^a$
2 (50)	$68,8 \pm 7,2^{bc}$	$4,6 \pm 0,9^c$	$7,3 \pm 1,2^a$	$507,3 \pm 79,5^a$
3 (8)	$57,7 \pm 4,4^d$	$4,3 \pm 0,9^c$	$4,1 \pm 1,1^{dc}$	$424,6 \pm 34,9^b$
4 (12)	$68,9 \pm 7,6^b$	$7,6 \pm 1,1^a$	$9,3 \pm 1,8^b$	$484,3 \pm 25,7^a$
5 (8)	$58,5 \pm 4,5^{cd}$	$5,7 \pm 0,8^b$	$4,7 \pm 0,8^c$	$377,7 \pm 37,4^b$

GG – Grupo Genético; n – número de animais; AOL – Área de olho de lombo em cm^2 ; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Com relação ao tamanho de alelos (tabela 8), quando a análise foi feita em relação às variações da característica AOL por tamanho de alelo, o alelo BM1500*146 apresentou os maiores valores para AOL ($76,8 \pm 16,3 \text{ cm}^2$).

Em relação às variações da característica EGC por tamanho de alelo (tabela 8), as médias dos alelos BM1500*140 e BM1500*146 que apresentaram os maiores valores para EGC ($5,5 \pm 1,6$ e $5,5 \pm 1,9 \text{ mm}$

respectivamente), não foram diferentes. As médias para os alelos BM1500*138 e BM1500*142 ($5,1 \pm 1,7$ e $4,5 \pm 1,1$ mm) foram diferentes.

Na análise feita em relação às variações da característica EGCP por tamanho de alelo (tabela 8), os alelos BM1500*146, BM1500*140 e BM1500*138 apresentaram os maiores valores ($7,9 \pm 2,5$; $7,4 \pm 2,3$ e $7,3 \pm 2,4$, respectivamente), as médias de EGC destes alelos foram iguais e as médias destes alelos e a do alelo BM1500*142 ($6,8 \pm 1,4$) foram diferentes.

Para a característica peso (tabela 8) verificou-se que os alelos BM1500*146, BM1500*140 e BM1500*138 apresentaram os maiores valores ($519,2 \pm 113,3$; $520,2 \pm 106,3$ e $503,0 \pm 95,3$, respectivamente), entretanto, as médias não foram diferentes. As médias destes alelos foram diferentes à média do alelo BM1500*142 ($454,2 \pm 61,8$).

Tabela 8: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microssatélite BM1500.

Alelo	Características			
	AOL (cm ²)	EGC (mm)	EGCP(mm)	Peso (kg)
BM1500*138 (37)	$69,6 \pm 13,1^b$	$5,1 \pm 1,7^{ab}$	$7,3 \pm 2,4^{ab}$	$503,0 \pm 95,3^a$
BM1500*140 (80)	$72,1 \pm 15,2^{ab}$	$5,5 \pm 1,6^a$	$7,4 \pm 2,3^{ab}$	$520,2 \pm 106,3^a$
BM1500*142 (17)	$69,8 \pm 9,5^b$	$4,5 \pm 1,1^b$	$6,8 \pm 1,4^b$	$454,2 \pm 61,8^b$
BM1500*146 (10)	$76,8 \pm 16,3^a$	$5,5 \pm 1,9^a$	$7,9 \pm 2,5^a$	$519,2 \pm 113,3^a$

AOL – Área de olho de lombo em cm²; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Ao considerar a variação da AOL por tamanho de alelos dentro de cada grupo genético (tabela 9) verificou-se que no G1 o maior valor para a característica foi detectado nos animais portadores do alelo BM1500*138, com valores 1,4% superiores que os portadores do alelo BM1500*140 e 15,7 e 5,2% superior que os valores da característica para os portadores dos alelos BM1500*142 e BM1500*146, respectivamente. Para o G2, G3 e G4 e os

animais portadores do alelo BM1500*140 apresentaram valores superiores para a característica quando comparado aos portadores do alelo BM1500*138 (10,6% 2,1% e 1,4%, respectivamente). No G5 os portadores do alelo BM1500*138 apresentaram valores cerca de 10% superiores para AOL que os portadores do alelo BM1500*140.

Para a variação da EGC por tamanho de alelos dentro de cada grupo genético (tabela 9) verificou-se que no G1 o maior valor para a característica foi detectado nos animais portadores do alelo BM1500*138, com valores 7,1% superiores que os portadores dos alelos BM1500*140, e 33,3 e 9,0% superior que os portadores dos alelos BM1500*142 e BM1500*146, respectivamente. No G2 animais portadores do alelo BM1500*140 obtiveram valores para a característica cerca de 11,6% superior. Para o G3, G4 e G5 os animais portadores do alelo BM1500*138 apresentaram valores superiores (2,3%; 18,4% e 5,2%, respectivamente) para a característica quando comparado aos portadores do alelo BM1500*140.

Na variação da EGCP por tamanho de alelos dentro de cada grupo genético (tabela 9) verificou-se que no G1 o maior valor para a característica foi detectado nos animais portadores do alelo BM1500*138, com valores 8,7% superiores que os portadores dos alelos BM1500*140, e 27,9 e 10,1% superior que os portadores dos alelos BM1500*142 e BM1500*146, respectivamente. No G2 animais portadores do alelo BM1500*140 obtiveram valores para a característica cerca de 7,1% superior. Para o G3, G4 e G5 os animais portadores do alelo BM1500*138 apresentaram valores superiores (5%; 18,2% e 17%, respectivamente) para a característica quando comparado aos portadores do alelo BM1500*140.

Na variação do peso por tamanho de alelos dentro de cada grupo genético (tabela 9) verificou-se que no G1 o maior valor para a característica foi detectado nos animais portadores do alelo BM1500*140, com valores 0,6% superiores que os portadores dos alelos BM1500*138; 27,4 e 11,4% superior que os portadores dos alelos BM1500*142 e BM1500*146, respectivamente. No G2 e G3 animais portadores do alelo BM1500*140 obtiveram valores para a característica cerca de 10,3 e 2,0% superior que o alelo BM1500*138. Para

o G4 e G5 os animais portadores do alelo BM1500*138 apresentaram valores superiores (1,7% e 7,4%, respectivamente) para a característica quando comparado aos portadores do alelo BM1500*140.

Tabela 9: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e Peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o microssatélite BM1500, dentro dos cinco grupos genéticos estudados.

GG	TA	N	Características			
			AOL (cm ²)	EGC (mm)	EGCP(mm)	Peso (kg)
1	138	8	80.8±15.3	6.0±2.1	8.7±2.9	575.0±105.0
1	140	18	79.7±19.8	5.6 ±1.8	8.0±2.4	578.8±111.5
1	142	17	69.8±9.5	4.5 ±1.1	6.8±1.4	454.2±61.8
1	146	10	76.8±16.3	5.5±1.9	7.9±2.5	519.2±113.3
2	138	21	64.8±5.2	4.3±0.9	7.0±1.1	478.6±62.5
2	140	29	71.7±7.1	4.8±0.8	7.5±1.1	528.0±84.9
3	138	5	56.5±4.0	4.4±1.1	4.2±1.3	416.2±31.3
3	140	8	57.7±4.4	4.3±0.9	4.1±1.1	424.6±34.9
4	138	1	67.9	9.0	11	493.0
4	140	12	68.9±7.6	7.6±1.1	9.3±1.8	484.3±25.7
5	138	2	64.4±1.3	6.0±0.0	5.5±0.7	406.0±11.3
5	140	8	58.5±4.4	5.7±0.8	4.7 ±0.8	377.7±37.4

GG – Grupo Genético; TA – Tamanho de alelo em pares de bases; N – número de animais; AOL – Área de olho de lombo em cm²; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm

O teste do Qui-quadrado mostrou associação ($P < 0,05$) entre marmoreio e tamanho de alelos dos marcadores BM1500, CSSM66 e BM8215 (Tabelas 10, 11 e 12).

Na tabela 10 verifica-se que a maioria dos animais portadores dos alelos BM1500*138 e BM1500*140, apresentaram traços pequenos de marmoreio, enquanto que a maioria dos animais que portavam os alelos BM1500*142 e BM1500*146 apresentava traços médios de marmoreio.

Tabela 10: Associação entre marmoreio e tamanho de alelo para o marcador microssatélite BM1500.

Escala de Marmoreio	Tamanho de alelo			
	138	140	142	146
	Frequência (%)			
3- Pequeno	54%	41%	11%	6%
4- Médio	26%	36%	64%	54%
5- Moderado	21%	24%	23%	40%

Para o marcador CSSM66 (tabela 11), a maioria dos animais portadores do alelo CSSM66*177, apresentou traços pequenos de marmoreio, enquanto a maioria dos animais portadores dos alelos CSSM66*179 e CSSM66*190 apresentaram traços médios de marmoreio.

Tabela 11: Associação entre marmoreio e tamanho de alelo para o marcador microssatélite CSSM66.

Escala de Marmoreio	Tamanho de alelo		
	177	179	190
	Frequência (%)		
3- Pequeno	47%	34%	5%
4- Médio	33%	42%	60%
5- Moderado	20%	24%	35%

No loco marcador BM8215 (tabela 12), todos os animais portadores do alelo BM8215*138 apresentaram traços pequenos de marmoreio, com a maioria dos animais portadores do alelo BM8215*132 apresentando traços médios de marmoreio, enquanto que para os traços moderados de marmoreio a maior contribuição foi do alelo BM8215*116.

Tabela 12: Associação entre marmoreio e tamanho de alelo para o marcador microssatélite BM8215.

Escala de Marmoreio	Tamanho de alelos					
	116	120	126	132	138	140
	Freqüência (%)					
3- Pequeno	15%	40%	56%	37%	100%	35%
4- Médio	45%	38%	27%	53%	-	35%
5- Moderado	40%	22%	17%	10%	-	30%

3.2.6.DISSCUSSÃO

O presente estudo encontrou para o marcador BM1500 nos grupos genéticos estudados, animais portadores de alelos de aproximadamente 138, 140, 142 e 146 pares de bases. Para todos os grupos genéticos estudados verificou-se a maior frequência do alelo de 140 pares de base. Sendo verificada a presença dos alelos de 142 e 146 pares somente em animais da raça Guzerá.

Alelos de 138 e 140 pares de bases foram citados em outros estudos como os estudos de Stone et al. (1996) e Fitzsimmons et al. (1998). Fitzsimmons et al. (1998) citaram a maior frequência do alelo 138 para animais da raça Aberdeen Angus, enquanto os animais da raça Charolês apresentaram maior frequência do alelo 147, não encontrado neste estudo. Tendo estes autores citado também a presença do alelo 149 que não foi verificada no presente estudo.

Almeida et al. (2007) também citaram a presença do alelo de 138 pares de bases (alelo presente em todos os grupos genéticos deste estudo) para animais das raças Aberdeen Angus e Charolês e de 142 pares de bases apenas para animais da raça Charolês, verificando a maior frequência de alelos não encontrados no presente estudo, como o de 144 pb para Aberdeen Angus, tendo citado também a presença de alelos de 136, 148 e 150 pares de bases que não foram verificados no presente estudo.

Em outro estudo Almeida et al. (2003) ao analisarem animais Brangus-lbagé relataram a presença de alelos não encontrados nos animais nesta pesquisa (135, 137, 139, 141, 143, 149 pares de bases).

Passos et al. (2007) ao estudarem o polimorfismo do microsatélite BM1500 em uma população composta por animais Brangus-lbagé verificaram animais portadores de alelos de 135, 137, 141, e 149 pares de bases, que não foram identificados no presente estudo.

Já Steigleder et al. (2004) ao analisarem a variabilidade genética de uma população de Gado Crioulo, detectaram para o microsatélite BM1500

alelos que não foram detectados no presente estudo como os alelos de 135, 141, 143, 145 e 147 pares de base.

Os resultados desta pesquisa sugerem que os alelos de 142 e 146 pares de bases podem estar presentes com mais freqüência nos animais *Bos indicus* ou em animais provenientes do cruzamento *Bos indicus* x *Bos taurus*. No entanto, são necessários mais estudos para confirmar tais freqüências em populações de zebuínos.

Para o marcador CSSM66 foram relatados alelos de 198 pares de bases, descrito por Moore et al. (2003). Na presente pesquisa este alelo não foi encontrado.

A variabilidade por locos para os marcadores BM1500 e CSSM66 foi baixa para todos os grupos genéticos estudados, o que pode ser consequência do pequeno número de animais que compõem as populações estudadas, desta forma a avaliação de maior número de animais por grupo genético seria necessária.

O marcador BM8215, apresentou o locus mais informativo dentre os locos microssatélite citados no presente estudo. Pinto et al. (2008) citaam que locos informativos são definidos como aqueles que apresentam número de alelos igual ou superior a três. Não foram encontradas na literatura referências para número e tamanho dos alelos para este marcador.

O marcador CSSM66, localizado no cromossomo 14, não apresentou associação com as características Área de Olho de Lombo, Espessura de Gordura de Cobertura, Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha. Sobretudo para as características de espessura de gordura, estes resultados contrastam com os resultados obtidos por Mizoshita et al. (2004); Casas et al. (2001) e Stone et al. (1999), que citam evidência de QTL afetando espessura de gordura de cobertura próximo ao marcador CSSM66. No entanto, verificou-se associação entre este marcador e a característica marmoreio, fato que corrobora com os estudos de Barendse et al. (1999), que observaram a mesma associação para o microssatélite CSSM66.

Para o marcador BM8215 foi verificada associação somente com a característica marmoreio, porém nenhum estudo de associação deste marcador com as demais características obtidas pela técnica de ultra-som foi encontrado na literatura. Entretanto Misoshita et al.(2004) e Kim et al. (2003)

relataram a presença de QTL afetando peso de carcaça localizado na mesma posição deste marcador.

Foi observada associação entre os alelos do marcador BM1500 e as características estudadas. Os resultados encontrados no presente estudo suportam a hipótese da existência de QTLs de efeito significativo para Área de Olho de Lombo, Espessura de Gordura e Marmoreio, no cromossomo 4 dos bovinos (Mizoshita et al., 2004; Mizogushi et al., 2004; Casas et al., 2003 e Thaller et al., 2003).

Almeida et al. (2003) citam que para o loco marcador BM1500 o fato de este estar no mesmo loco do gene da leptina pode significar que os polimorfismos neste marcador estariam afetando a expressão fenotípica das características influenciadas pelo gene da leptina, por influenciarem o controle de expressão do gene ou pelo desequilíbrio de ligação dos alelos com algumas mutações do gene, alterando a função ou expressão deste.

Para a característica Área de Olho de Lombo, Espessura de Gordura de Cobertura, Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha, Peso e Marmoreio foram verificadas associações dos alelos BM1500*146 e BM1500*140, quando os efeitos foram considerados para a população toda em estudo, sem separar a análise por grupo genético.

A análise dentro de cada grupo genético mostra a relação de diferentes alelos com os maiores valores para as características de deposição de gordura, o que pode significar uma necessidade de avaliar os resultados de associação por grupo genético, tal análise se faz necessária devido às diferenças na formação genética dos grupos estudados.

Para Espessura de gordura de cobertura e espessura de gordura de cobertura de picanha os maiores valores no G1, G3, G4 e G5 estavam associados ao alelo BM1500*138. Estes resultados concordam com os encontrados por Fitzsimmons et al. (1998), que citaram os animais portadores do alelo BM1500*138 como os que apresentaram maior deposição de gordura. Para o G2 os resultados apresentados discordam do resultado descrito por Fitzsimmons et al. (1998), pois para estes animais da raça Nelore, os indivíduos portadores do alelo BM1500*140 apresentaram os maiores valores para as características de deposição de gordura.

Os alelos envolvidos na associação com as características de deposição de gordura em Guzerá podem estar em desequilíbrio de ligação, fato que justifica o relatado no presente estudo, onde se encontrou associação com os mesmo alelos nos animais provenientes dos cruzamentos F_2 terminal ($\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simental x $\frac{1}{4}$ Nelore; $\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Limousin x $\frac{1}{4}$ e $\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simbrasil x $\frac{1}{4}$ Nelore).

Tais resultados podem significar que a estreita relação entre os alelos do marcador e o QTL (desequilíbrio de ligação), para as características de deposição de gordura no cromossomo 4, são devido à contribuição da raça guzerá na formação dos indivíduos F_2 deste estudo. O macho Guzerá que finalizou o cruzamento F_2 terminal do presente relato era proveniente do rebanho Guzerá estudado e provavelmente tem alto grau de parentesco com todos os demais animais da raça aqui descritos.

Os resultados deste estudo sustentam a hipótese de Schenkel et al, 2005 de que antes das informações sobre polimorfismos genéticos serem usadas de maneira eficiente em sistemas de produção, estudos com diferentes populações são necessários para proporcionar maior robustez aos resultados de associação destes com características de produção.

3.2.7. CONCLUSÕES

A escassa associação dos locos CSSM66 e BM8215 com as características estudadas poderia ser explicada pela ausência de uma estreita relação entre o loco do marcador e o QTL, com efeito, nas características citadas ou poderia ser resultado do pequeno número de animais por grupo genético em estudo.

A existência de uma associação entre alelos encontrados no loco marcador BM1500 e as características de deposição de gordura poderia estar relacionada com o fato de este marcador estar localizado no mesmo loco que o gene da leptina, gene relacionado ao metabolismo de lipídeos, indicando a influência de polimorfismos ligados ao gene da leptina na regulação e expressão do gene.

A existência das associações citadas no presente trabalho merece estudos mais aprofundados, para que tais informações sejam transferidas às populações compostas pelos mesmos grupos genéticos aqui estudados.

3.2.8.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. E. M et al. 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal Animal Breeding and Genetics*, v.120, n.106-113.
- ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A., TERRA, G. NEVES, J. P., GONÇALVES, P. B. D. 2007. Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.1, p.206-211.
- ASHWELL, M. S., VAN TASSELL, C. P., and SONSTEGARD, T. S. 2001. A Genome Scan To Identify Quantitative Trait Loci Affecting Economically Important Traits in a US Holstein Population. *J. Dairy Sci.* 84:2535–2542
- BARENDSE, W. J. 1999. Assessing lipid metabolism. International Patent No. WO 99/23248, World Int. Property Org.
- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONS C.J., VAN KESSEL A.G., THUE T.D., Winkelman, SimD.C. & Schmutz S.M. (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection and Evolution* 34, 105–16.
- CASAS, E., S. D. SHACKELFORD, J. W. KEELE, R. T. STONE, KAPPES, S.M.and KOOHMARAIE, M.. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:560–569.
- CASAS E., STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M. & KOOHMARAIE M. (2001) A comprehensive search for QTL affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *Journal of Animal Science* 79, 854–60
- CREWS, D. H., J. D. NKRUMAH, J. YU, and S. S. MOORE. 2004. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin gene with feedlot and carcass characteristics of crossbred steers. *Can. J. Anim. Sci.* 84:749–750.
- FITZSIMMONS C.J., SHMUTZ S., BERGEN R.D. & MCKINNON J.J. (1998). A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome* 9, 432–4.

- GRISART, B., W. COPPIETERS, F. FARNIR, L. KARIM, C. FORD, P. BERZI, N. CAMBISANA, M. MNI, S. REID, P. SIMON, R. SPELMAN, M. GEORGES, and R. SNELL. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle; identification of missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12:222–231.
- IHARA N, TAKASUGA A, MIZOSHITA K, TAKEDA H, SUGIMOTO M, *et al.* 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14, 1987–1998
- KIM, J.-J., F. FARNER, J. SAVELL, and J. F. TAYLOR. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1933–1942.
- LAGONIGRO, R., P. WIENER, F. PILLA, J. A. WOOLLIAMS, and J. L. WILLIAMS. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim. Genet.* 34:371–374
- MIZOSHITA K., WATANABE T., KUBORA C., YAMAKUCHI H., TODOROKI J. & SUGIMOTO Y. (2004) Quantitative trait loci for growth and carcass traits in a half-sib family constructed from purebred Japanese Black (Wagyu) cattle population. *Journal of Animal Science* 82,3415–20.
- MOORE, S. S., C. LI, J. BASARAB, W. M. SNELLING, J. LNEELAND, B. MURDOCH, C. HANSEN, and B. BENKEL. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate gene for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 81:1919–1925.
- NKRUMAH, J. D., C. LI, J. YU, C. HANSEN, D. H. KEISLER, and S. S. MOORE. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *J. Anim. Sci.* 83:20–28
- OPRZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L. *et al.* Polymorphisms at *loci* of Leptina (LEP), PIT1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in black-and-white bulls. *Animal Science Papers and Reports*, v.21, n.3, p.135-145, 2003.
- POMP D., ZOU T., CLUTTER A.C. & BARENDSE W. (1997) Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage

- analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science* 75, 1427.
- SALMAN, A. K. D. Polimorfismos no Gene da Obesidade (Leptina) em Diferentes Grupos Genéticos de Bovinos de Corte Terminados no Sistema Superprecoce. Tese (Doutorado) – UNESP/FMVZ, julho/2004, 42 p.
- SCHENKEL FS, MILLER SP, YE X, MOORE SS, NKRUMAH JD, LI C, YU J, MANDELL IB, WILTON JW, WILLIAMS JL 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim Sci* 83: 2009-2020.
- STONE R.T. et al. 1996 The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian genome*, v.7, p.399.
- STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M. & KOOHMARAIE M. (1999) A primary screen of the bovine genome for QTL affecting carcass and growth traits. *Journal of Animal Science* 77, 1379–84.
- THALLER, G., C. KUEHN, A. WINTER, G. EWALD, O. BELLMANN, J. WEGNER, H. ZUEHLKE, and R. FRIES. 2003. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* 34:354–357.
- WILKINS RJ, DAVEY H.W. 1997. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. *Anim Genet* 28, 376
- WINTER, A., W. KRAEMER, F. WERNER, S. KOLLERS, S. KATA, G. DURSTEWITZ, J. BUITKAMP, J. E. WOMACK, G. THALLER, and R. FRIES. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9300–9305.

3.3. ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NOS LOCOS MICROSSATÉLITES BM1500, CSSM66 E BM8215 COM PESO DE CARÇAÇA E DE CORTES COMERCIAIS EM ANIMAIS PROVENIENTES DE CRUZAMENTOS F₂ TERMINAL.

3.3.1. RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi realizar a associação dos locos marcadores BMS1500 (cromossomo 4), CSSM66 (cromossomo 14) e BM8215 (cromossomo 14) com características de carcaça como: Peso de Carcaça Quente (PCQ), Peso de Corte Serrote (PSerr), Peso de Corte Dianteiro (PDiant) e Peso de Corte Costilhar (PCost) de animais provenientes de cruzamento F₂ terminal. Após a realização da PCR, os produtos amplificados foram analisados em eletroforese vertical no gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%. As frequências alélicas foram estimadas por contagem direta, a partir dos fenótipos obtidos em eletroforese. Após serem computados os resultados dos animais testados para os locos microssatélites citados, foi feita a análise estatística (SAS, 1996) para associação entre os dados quantitativos e moleculares. Foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) nas características PCQ, PSerr, PDiant e PCost entre os grupos genéticos estudados. Porém não foram verificadas associações entre tamanhos de alelo para os marcadores BM1500, BM8215 e CSSM66 e as características PCQ, Pserrt, Pcost e Pdiant. Conclui-se que estudos com populações maiores são necessários para a associação de características de produção a locos marcadores. Para o cromossomo 14, estudos com um maior número de marcadores microssatélite, sobretudo na região que compreende

entre 45-51cM são necessários devido às fortes evidências da localização de QTLs de efeito para peso de carcaça nesta região.

3.3.2. ABSTRACT

The aim of this work was to associate the locos of BM1500 (chromosome 4), CSSM66 (chromosome 14) and BM8215 (chromosome 14) markers with carcass characteristics such as: weight of hot carcass (WHC), weight of forequarter (WF), weight of hindquarter (WH) and weight of spareribs (WS) characteristics in F2 terminal crossbreeding animals. After PCR, its amplified products were analyzed by a vertical electrophoresis with 8% non-desnaturing polyacrylamide gel. The allele frequencies were estimated by direct counting the electrophoresis fragments. Statistics analysis was performed using the SAS program (1996) associating quantitative and molecular data. Significant differences ($P < 0,05$) were found in weight of hot carcass (WHC), weight of forequarter (WF), weight of hindquarter (WH) and weight of spareribs (WS) characteristics between the studied genetics groups. It wasn't verified association between the size of the allele for BM1500, BM8215 and CSSM66 primers and weight of hot carcass (WHC), weight of forequarter (WF), weight of hindquarter (WH) and weight of spareribs (WS) characteristics. It was concluded that studies with larger populations are needed to associate productive characteristics with markers locos. Further studies with more microsatellites markers number of the chromosome 14 are necessary, especially in the region within 45-51cM, due its strong evidence of localizations of QTLs that affect weight of carcass in this region.

3.3.3.INTRODUÇÃO

A pecuária de corte exerce hoje papel de destaque no agronegócio nacional, diante disto é essencial que os sistemas de produção se fortaleçam com ferramentas eficazes para a seleção de melhores genótipos, consolidando a posição da pecuária nacional.

O tempo necessário para a análise de características de abate de fundamental importância à pecuária de corte, constitui-se em uma das dificuldades encontradas para alavancar o progresso genético das mesmas.

Os métodos de avaliação do potencial genético para características de carcaça em bovinos não estão bem estabelecidos. De acordo com Stone *et al.* (1999), a capacidade de predizer de forma mais exata o mérito genético para características de carcaça no início da vida dos animais permitiria uma abordagem mais direta no germoplasma, reduzindo a quantidade de dados onerosos e dispendiosos necessários para o processo de seleção e fornecendo meios de avaliação genética mais precoce.

O desenvolvimento de mapas genéticos é uma ferramenta que vem sendo utilizada como auxílio em programas de seleção de animais, pela identificação de marcadores ligados a locos de características quantitativas (QTLs) de importância econômica, detectando assim, indivíduos mais produtivos com maior eficiência que os programas clássicos de seleção.

Mapas genéticos fornecem a base para mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs), melhorando assim o potencial para realizar a seleção e o progresso genético, especialmente para aquelas características difíceis e/ou com alto custo para avaliação. Incluem-se nesta

categoria características de carcaça e de qualidade de carne que podem variar amplamente entre raças e tipos biológicos (Wheeler *et al.* 1997).

De acordo com Ihara *et al.* (2004), na busca por QTLs relacionados à características de produção de carne é crescente o uso de marcadores microssatélites, pelo fato destes serem excelentes marcadores genéticos, por seu elevado polimorfismo e abundante distribuição ao longo do genoma, tornando-se instrumento essencial para o mapeamento de características poligênicas.

Muitos estudos têm sido realizados na identificação de QTLs, analisando regiões cromossômicas que possam ser associadas a características de importância econômica em gado de corte, por meio de marcadores microssatélite. Dentre estes se destacam análises em cromossomos que contêm regiões candidatas, como os cromossomos 4 e 14 (Mizoshita *et al.*, 2005; Mizoguchi *et al.*, 2005; Mizoshita *et al.*, 2004; Casas *et al.*, 2000; Casas *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Thaller, 2003; Stone, 1999).

No cromossomo 14 se destacam estudos de busca por QTLs para peso de carcaça, usando de marcadores microssatélite. Mizoshita *et al.*, (2004) sugerem a existência de QTL de efeito significativo em peso de carcaça a 45-51cM neste cromossomo, o QTL nesta região já havia sido citado por Kim *et al.* (2003). Mizoguchi *et al.* (2005) citaram para o mesmo cromossomo QTL localizado entre 22-39cM.

Já Mizoshita *et al.* (2005) confirmaram presença de QTL para peso de carcaça, no cromossomo 14, onde estão mapeados cerca de 26 marcadores microssatélite, dentre eles o marcador BM8215.

Assim, este trabalho tem como objetivo realizar a associação de polimorfismos do locos microssatélites localizados nos cromossomos 4 (BMS1500) e 14 (CSSM66 e BM8215) com características de carcaça de animais oriundos do cruzamento *Bos Taurus* x *Bos Indicus*.

3.3.4.MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.4.1.Animais e Coleta de material

Foram utilizados dados de animais provenientes dos seguintes cruzamentos F₂ terminal :

- A. ½ Guzerá x ¼ Limousin x ¼ Nelore – 8 animais
- B. ½ Guzerá x ¼ Simbrasil x ¼ Nelore – 12 animais
- C. ½ Guzerá x ¼ Simental x ¼ Nelore – 8 animais

Amostras de pêlo foram coletadas da vassoura da cauda dos animais, sendo armazenadas em envelopes de papel, estes foram identificados com o número de registro dos animais, fazenda e grupo genético.

3.3.4.2. Abate e Coleta de Dados de Carcaça

Os animais abatidos foram submetidos a um jejum de 18 horas. As carcaças após o abate foram pesadas ainda quentes, obtendo-se o peso de carcaça quente.

As duas meias carcaças foram obtidas por corte longitudinal da carcaça, abrangendo a sínfise Isquio-pubiana, a coluna vertebral e o esterno, com a utilização de uma serra elétrica.

Após a obtenção das duas meias carcaças, foram separados os quartos dianteiro e traseiro entre a quinta e sexta costelas para a realização das análises relacionadas às características de rendimento da carcaça e de seus cortes comerciais.

Em seguida a obtenção dos quartos dianteiro e traseiro, foi retirado do

quarto traseiro o corte costilhar, ou ponta de agulha, começando o corte pela virilha, dirigindo-se para o lombo e seguindo paralelamente a linha dorsal a distância média de 20 cm da coluna vertebral. Obtendo-se então o quarto traseiro subdividido em Ponta de Agulha ou Corte costilhar e Corte Serrote ou Traseiro Especial. (Barros & Vianni, 1979; Sousa, 1983).

Foram então obtidos os pesos dos cortes comerciais da carcaça e o peso de carcaça quente.

3.3.4.3. *Extração do DNA genômico*

Foram coletados de 5 a 8 bulbos íntegros em microtubos. Em seguida adicionou-se 50µl de solução de lise (200Mm NaOH). Os microtubos foram levados ao termociclador e incubados a 97°C por 15 minutos. Na próxima etapa, adicionou-se 50µl de solução neutralizante (200Mm HCl; 100Mm Tris-HCl pH 8,5), homogeneizando bem. Após a realização de todas as etapas de extração as alíquotas foram armazenadas em geladeira a 4°C.

3.3.4.4. *Seleção de iniciadores*

Em uma primeira etapa foi realizada uma busca na literatura e no banco de dados por seqüências de primers desenhados especificamente para bovinos e que já tivessem sido citados como tendo associação com características economicamente importantes em gado de corte, desta busca foram selecionados três primers (tabela 1).

Tabela1: Seqüência dos primers utilizados na padronização

Marcador	Cromossomo	Tamanho de alelos	Seqüência da literatura
BM1500	04	135-147pb	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG
			Reverse Primer Sequence: CCCATTGCTAGAACCCAGG
CSSM66	14	177-197pb	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA
			Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG
BM8215	14	116-140pb	Forward Primer Sequence: CCAAGAAGCTGAAGTTGACTG
			Reverse Primer Sequence: CTGACTTTTGCATTTC AACCC

Após a escolha destes primers foi realizada a análise de suas seqüências utilizando o programa Oligo versão 6.68 (Tabela 2). O procedimento foi utilizado objetivando obter maior especificidade dos primers selecionados na literatura. O primer BM8215 não teve sua seqüência modificada.

Tabela 2: Seqüência original dos primers e seqüência modificada pelo Oligo versão 6.68.

Marcador	Cr	Seqüência da literatura	Seqüência modificada
BM1500	04	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG	Forward Primer Sequence: GATGCAGCAGACCAAGTGG
		Reverse Primer Sequence: CCCATTGCTAGAACCCAGG	Reverse Primer Sequence: C*CCATTGCTAGAACCCAGG
CSSM66	14	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	Forward Primer Sequence: ACACAAATCCTTTCTGCCAG CT*GA
		Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG	Reverse Primer Sequence: AATTTAATGCACTGAGGAGC TTGG

3.3.4. 5. *Reação em cadeia da polimerase*

Todas as reações foram montadas em capela de fluxo laminar. Para o preparo das reações foram usados tubos e ponteiras novas. O sistema de amplificação foi composto de:

A mistura foi dividida em microtubos com 8,0µl cada, sendo depois acrescentado 2,0 µl do DNA, fora da cabine de fluxo laminar, evitando contaminação das soluções estoque.

Os microtubos contendo a reação e o DNA foram centrifugados e em seguida levados para ao termociclador TC-412 (Analítica). O programa utilizado na PCR esta descrito na tabela 4, cada primer possuía temperaturas e números de ciclos diferentes.

Tabela 4: Programa base de utilização com reações de amplificação com marcadores microssatélite.

Fases	Temperatura (°C)	Tempo	
1- desnaturação	94	1 minuto	
2- desnaturação	94	1 minuto	} X ₂ ciclos
3-anelamento	X ₁	1 minuto	
4-extensão	72	1 minuto	
5-extensão	72	5 minutos	
Estoque	4	99horas	

X₁=Temperatura por par de primers; X₂=Número de ciclos por par de primers

3.3.4. 6. *Corrida Eletroforética*

Foi realizada corrida eletroforética em gel de poliacrilamida não desnaturante a 8%, onde foram aplicados 10 µl do produto de PCR com tampão de amostra.

As amostras foram submetidas à eletroforese por aproximadamente seis horas, a 100 V e 30 milliampers, em cuba vertical do aparelho de DCode™ Universal Mutation Detection System (BioRad), com tampão TBE 1X

(600ml de TBE 5X, 2,4L de água destilada). Como base para a análise das bandas dos microssatélite foi usado o padrão de peso molecular pGEM (Promega), que apresenta bandas de 2645 a 51 pb.

3.3.4. 7. Detecção de bandas com Nitrato de Prata

Para a detecção das bandas utilizou-se a coloração com Nitrato de Prata. Os géis foram armazenados na geladeira em solução fixadora, e posteriormente levados ao trasiluminador e fotografados com uma câmera digital SONY, modelo Cyber-Shot DSC-F828 para análise das bandas.

As informações moleculares foram então incorporadas às planilhas de dados quantitativos, para verificar se a presença de alelos dos marcadores STR BM1500, CSSM66 e BM8215 estariam influenciando no Peso de carcaça quente, Peso de Costilhar, Peso de Serrote e Peso de Dianteiro.

3.3.4. 8. Análise Estatística

As freqüências alélicas foram estimadas por contagem direta, a partir dos genótipos obtidos em eletroforese. Após serem computados os resultados dos animais testados para os locos microssatélites citados, foi feita a análise estatística.

Realizou-se a análise de variância para verificar o efeito de grupo genético e dos diferentes tamanhos de alelos nas características de produção estudadas de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + GG_i + TA_j + e_{ijk}$$

onde:

Y_{ijk} = característica de produção (Peso de carcaça quente, Peso de Costilhar, Peso de Serrote e Peso de Dianteiro)

μ = média geral,

GG_i = efeito fixo do i -ésimo grupo genético,

TA_j = efeito fixo do k -ésimo tamanho de alelo,

e_{ijk} = erro aleatório.

Foi testada, também, a interação entre grupo genético e tamanho de alelos, entretanto, a mesma não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) e foi excluída do modelo final de análise.

3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A característica Peso de Carcaça Quente apresentou média geral de $228,8 \pm 18,2$ Kg. Para Peso de Corte Serrote a média geral foi de $57,2 \pm 4,3$ Kg. A média geral para Peso de Corte Costilhar foi de $14,5 \pm 1,5$ Kg, para Peso de Corte Dianteiro foi de $42,3 \pm 3,4$ Kg.

Na análise de variância foram verificadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre grupos genéticos para as características estudadas. Na Tabela 5, se apresentam as médias para as características, de acordo com o grupo genético. Os maiores valores para as características Peso de Carcaça Quente, Peso de Corte Serrote, Peso de Corte Costilhar e Peso de Corte Dianteiro foi verificado nos G2, animais oriundos do cruzamento F2 terminal $\frac{1}{2}$ Guzerá x $\frac{1}{4}$ Simbrasil x $\frac{1}{4}$ Nelore.

Tabela 5: Médias e respectivos desvios padrão das características Peso de carcaça Quente, Peso de Corte Serrote, Peso de Corte Costilhar e Peso de Corte Dianteiro em relação aos grupos genéticos estudados.

GG (n)	Características			
	PCQ (Kg)	PSerr (Kg)	PCost (Kg)	PDiant (Kg)
1 (8)	$220,2 \pm 15,9^b$	$54,9 \pm 3,9^b$	$14,5 \pm 1,2^b$	$39,0 \pm 3,0^b$
2 (12)	$253,3 \pm 16,0^a$	$64,0 \pm 4,2^a$	$16,2 \pm 1,2^a$	$48,2 \pm 3,2^a$
3 (8)	$213,5 \pm 21,0^b$	$53,9 \pm 4,6^b$	$12,9 \pm 1,7^c$	$38,8 \pm 4,1^b$

GG – Grupo Genético; n – número de animais; PCQ-Peso de carcaça Quente, PSerr -Peso de Corte Serrote, PCost -Peso de Corte Costilhar e PDiant-Peso de Corte Dianteiro
 * médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Não foram verificadas diferenças significativas ($P>0,05$) entre as características citadas e os tamanhos de alelos para os marcadores BM1500, CSSM66 e BM8215. As médias e os respectivos desvios padrão das características Peso de carcaça Quente, Peso de Corte Serrote, Peso de Corte Costilhar e Peso de Corte Dianteiro em relação ao tamanho dos alelos encontrados para o marcador microssatélite BM1500, CSSM66 e BM8215 são apresentados nas tabelas 6, 7 e 8.

Tabela 6: Médias e respectivos desvios padrão das características Peso de carcaça Quente, Peso de Corte Serrote, Peso de Corte Costilhar e Peso de Corte Dianteiro em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microssatélite BM1500.

Alelo	Características			
	PCQ (Kg)	PSerr (Kg)	PCost (Kg)	PDiant (Kg)
BM1500*138 (8)	225,4±17,8 ^b	57,0±4,4 ^a	14,1±1,6 ^a	41,0±3,9 ^a
BM1500*140 (28)	232,1 ±27,3 ^a	58,4±6,9 ^a	14,7±2,1 ^a	43,0±6,1 ^a

PCQ-Peso de carcaça Quente, PSerr -Peso de Corte Serrote, PCost -Peso de Corte Costilhar e PDiant-Peso de Corte Dianteiro

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Na Tabela 6 verifica - se que a média de PCQ foi superior no BM1500 140, enquanto que nas outras características as médias não foram diferentes. Nas tabelas 7 e 8 se verifica que as médias das características para os marcadores não foram diferentes.

Tabela 7: Médias e respectivos desvios padrão das características Peso de carcaça Quente, Peso de Corte Serrote, Peso de Corte Costilhar e Peso de Corte Dianteiro em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microsatélite CSSM66.

Alelo	Características			
	PCQ (Kg)	PSerr (Kg)	PCost (Kg)	PDiant (Kg)
CSSM66*177 (22)	230,2±27,2 ^a	57,9 ±7,0 ^a	14,5±2,0 ^a	42,4±6,1 ^a
CSSM66*179 (8)	235,4 ±23,4 ^a	59,0±5,8 ^a	15,0±2,3 ^a	44,3±5,2 ^a
CSSM66*190 (32)	214,8±27,3 ^a	54,2±5,8 ^a	13,7±2,6 ^a	39,2±5,7 ^a

PCQ-Peso de carcaça Quente, PSerr -Peso de Corte Serrote, PCost -Peso de Corte Costilhar e PDiant-Peso de Corte Dianteiro

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Tabela 8: Médias e respectivos desvios padrão das características Peso de carcaça Quente, Peso de Corte Serrote, Peso de Corte Costilhar e Peso de Corte Dianteiro em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o marcador microsatélite BM8215.

Alelo	Características			
	PCQ (Kg)	PSerr (Kg)	PCost (Kg)	PDiant (Kg)
BM8215*116 (9)	242,3±27,3 ^a	61,1 ±6,9 ^a	15,7±2,1 ^a	44,5±5,6 ^a
BM8215*120 (16)	224,3 ±25,9 ^a	56,4±6,5 ^a	14,0±1,9 ^a	41,8±6,3 ^a
BM8215*126 (2)	196,1±0,2 ^a	49,1±1,9 ^a	12,3±1,7 ^a	35,0±0,4 ^a
BM8215*132 (4)	230,5±35,8 ^a	58,0 ±9,4 ^a	14,0±1,9 ^a	43,0±8,3 ^a
BM8215*140 (11)	233,5±20,2 ^a	58,7±5,1 ^a	14,8±1,4 ^a	43,6±5,6 ^a

PCQ-Peso de carcaça Quente, PSerr -Peso de Corte Serrote, PCost -Peso de Corte Costilhar e PDiant-Peso de Corte Dianteiro

* médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem entre si.

Não foram encontradas na literatura citações que associassem os locos marcadores BM1500 e CSSM66 com características de carcaça. Entretanto, Fitzsimmons *et al.* 1998 e Moore *et al.*, 2003 afirmam que nestas regiões há genes relacionados ao metabolismo de lipídeos, levando a estudos de associação dos cromossomos 4 e 14 a características de deposição de gordura em gado de corte.

No entanto, os estudos citados por Mizoshita *et al.*(2004) e Mizoshita *et al.*(2005) sugerem a existência de QTL de efeito significativo em peso de carcaça entre 45-51cM do cromossomo 14, confirmando as citações de Kim *et al.*(2003) para a mesma região.

3.6. CONCLUSÕES

Desta forma os resultados do presente estudo sugerem que os locos marcadores BM1500 e CSSM66 não têm associação com as características peso de carcaça e de cortes comerciais para a população estudada e que poderiam haver outros locos marcadores associados ao QTL para as características.

A região 45-51cM do cromossomo 14 está mapeada e apresenta cerca de 26 marcadores microssatélite, dentre eles o marcador BM8215. Porém, no presente estudo não foi detectada associação entre este loco marcador e as características de carcaça estudadas, fato que pode ter ocorrido pela existência de outros locos marcadores associados ao QTL para a característica ou pelo pequeno número de animais do presente estudo, o que sugere a necessidade de mais estudos para associação destas regiões cromossômicas a características de carcaça.

Para o cromossomo 14 estudos com um maior número de marcadores microssatélite, principalmente, na região que compreende entre 45-51cM são necessários devido às fortes evidências da localização de QTLs de efeito para peso de carcaça nesta região.

3.7.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS,G.C; VIANNI, M C. Tecnologia aplicada às carnes bovina, suína de aves, da produção ao consumo. Seropédica: UFRRJ/DTA, 1979. 116p.
- CASAS, E., S. D. SHACKELFORD, J. W. KEELE, R. T. STONE, S.M. KAPPES, and M. KOOHMARAIE. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:560–569.
- CASAS E., STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M. & KOOHMARAIE M. 2001. A comprehensive search for QTL affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *Journal of Animal Science* 79, 854–60
- FITZSIMMONS C.J., SHMUTZ S., BERGEN R.D. & MCKINNON J.J. (1998). A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome* 9, 432–4.
- IHARA N, TAKASUGA A, MIZOSHITA K, TAKEDA H, SUGIMOTO M, *et al.* 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14, 1987–1998
- KIM, J.-J., F. FARNER, J. SAVELL, and J. F. TAYLOR. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross

between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1933–1942.

LAGONIGRO, R., P. WIENER, F. PILLA, J. A. WOOLLIAMS, and J. L. WILLIAMS. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim. Genet.* 34:371–374

MIZOGUCHI Y; WATANABE T; FUJINAKA K IWAMOTO E; SUGIMOTO Y. SHORT COMMUNICATION. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a JapaneseBlack (Wagyu) cattle population.(2005). *Animal Genetics*, 37, 51–54

MIZOSHITA K., WATANABE T., KUBORA C., YAMAKUCHI H., TODOROKI J. &SUGIMOTO Y. (2004) Quantitative trait loci for growth and carcass traits in a half-sib family constructed from purebred JapaneseBlack (Wagyu) cattle population. *Journal of Animal Science* 82,3415–20.

MIZOSHITA K., TAKANO A., WATANABE T., TAKASUGA, A., & SUGIMOTO Y. (2005) Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine Chromosome 14. *Mammalian Genome*.

MOORE, S. S., C. LI, J. BASARAB, W. M. SNELLING, J. LNEELAND, B. MURDOCH, C. HANSEN, and B. BENKEL. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate gene for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 81:1919–1925.

SOUSA, J. C. D.; Efeito do regime alimentar e tipo racial no desempenho animal e características da carcaça de bovinos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Santa Maria-RS, 1983, 90p.

STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M. & KOOHMARAIE M. (1999) A primary screen of the bovine genome for QTL

affecting carcass and growth traits. *Journal of Animal Science* 77, 1379–84.

THALLER, G., C. KUEHN, A. WINTER, G. EWALD, O. BELLMANN, J. WEGNER, H. ZUEHLKE, and R. FRIES. 2003. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* 34:354–357.

WHEELER, T. L., L. V. CUNDIFF, R. M. KOCH, M. E. DIKEMAN, AND J. D. CROUSE. 1997. Characterization of different biological types of steers (Cycle IV): Wholesale, subprimal, and retail product yields. *J. Anim. Sci.* 75:2389-2403.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Trabalhos de análise genômica podem proporcionar em curto prazo um aumento da eficiência do processo de seleção, por meio da seleção assistida por Marcadores, identificando genes candidatos para as características relacionadas à qualidade da carne dos bovinos, proporcionando em longo prazo o conhecimento dos mecanismos biológicos em nível de genes.

Análises genômicas baseadas na utilização de marcadores moleculares altamente polimórficos como os microssatélites oferecem grandes vantagens à busca de QTLs. A transferência destas informações de uma população para outra não deve ser realizada antes que tais informações sejam analisadas na população em estudo.

No Brasil é evidente a carência de informações no que diz respeito a resultados de pesquisa que comprovem a existência de QTLs de efeito significativo em animais de origem zebuína (*Bos Taurus Indicus*), que compõem cerca de 80% do germoplasma do Brasil. A maior parte dos resultados de pesquisa para a busca destes QTLs é realizada em animais de raças européias (*Bos Taurus Taurus*). Desta maneira, a transferência de informações destes QTLs a populações de *Bos Taurus Indicus* é contestável, evidenciando a necessidade da busca por tais informações para o rebanho nacional.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. E. M et al. 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal Animal Breeding and Genetics*, v.120, n.106-113.
- ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A.de. TERRA, G. NEVES, J. P., GONÇALVES, P. B. D. 2007. Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.1, p.206-211.
- ASHWELL, M. S., VAN TASSELL, C. P., AND SONSTEGARD, T. S. 2001. A Genome Scan To Identify Quantitative Trait Loci Affecting Economically Important Traits in a US Holstein Population. *J. Dairy Sci.* 84:2535–2542
- BARENDSE *et al.*, 1997. A médium-density genetic linkage map of the bovine genome. *Mammalian Genome*, v.8, p21-28.
- BARENDSE, W. J. 1999. Assessing lipid metabolism. International Patent No. WO 99/23248, World Int. Property Org.
- BECKMANN, J. S. & SOLLER, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and coasts. *Theor. Appl. Genet.* 65:35-43.
- BISHOP, M. D., KAPPES, S. M., KEELE, J. W. *et al.*, 1994. A genetc linkage map for cattle. *Genetics*, v. 136, p. 619-639.
- BUCHANAN F.C., FITZSIMMONS C.J., VAN KESSEL A.G., THUE T.D., Winkelman, SimD.C. & Schmutz S.M. (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection and Evolution* 34, 105–16.

- CARRIJO, S. M. Associação do polimorfismos do gene PIT1 com características de produção de carne em bovinos da raça Canchim. Tese (Doutorado). São Paulo: UFSCar. 2004.98p
- CASAS E., SHACKELFORD S.D., KEELE J.W., KOOHMARAIE M., SMITH T.P.L. & STONE R.T. (2003) Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of Animal Science* 81, 2976–83.
- CASAS E., STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M. & KOOHMARAIE M. (2001) A comprehensive search for QTL affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. *Journal of Animal Science* 79, 854–60
- CASAS, E., S. D. SHACKELFORD, J. W. KEELE, R. T. STONE, S.M. KAPPES, AND M. KOOHMARAIE. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:560–569.
- CAVALLI-SFORZA, L.L. *Genes, Povos e Línguas*. Sao Paulo: Companhia das Letras, 2003.
- CHENG, H. H. 1994. The chicken genetic map: a tool for the future. *Poultry Digest*, p.24-28.
- CREWS, D. H., J. D. Nkrumah, J. Yu, and S. S. Moore. 2004. Association of single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin gene with feedlot and carcass characteristics of crossbred steers. *Can. J. Anim. Sci.* 84:749–750.
- CULLEN, M.; MALASKY, M.; HARDING, A.; CARRINGTON, M. 2003. High-density map of short tandem repeats across the human major histocompatibility complex. *Immunogenetics*, v.54, pp.900-910,
- DAVIS, G. P., and DeNISE, S. K. 1998. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76:2331–2339.
- EDWARDS, M. D.; STUBER, C.V.; WENDEL, J.F. Molecular-marker-facilitated investigations of *Quantitative-Traits Loci* in maize. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics*, v.116, p.113-125, 1987
- FERREIRA, M. E, GRATAPAGLIA, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. 2ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 220p.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição. Brasília: EMBRAPA – CENARGEM. p. 15- 68.

- FITZSIMMONS C.J., SHMUTZ S., BERGEN R.D. & MCKINNON J.J. (1998). A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome* 9, 432–4.
- FOISSAC, A.; CROUUAU-ROY, B.; FAURE, S.; THOMSEN, M.; CAMBON-HOMSEN, A. Microsatellites in the HLA region: an overview. *Tissue Antigens*, v.49, pp.197-214, 1997.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in Georges *et al.* (1995) animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* v. 46, p. 319-330. 1975.
- GEORGES, M., D. NIELSEN, M. MACKINNON, A. MISHRA, R. OKIMOTO, A. PASQUINO, L. SARGEANT, A. SORENSEN, M. STEELE, X. ZHAO, J. E. WOMACK, and I. HOESCHELE. 1995. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics* 139:907–920.
- GOLDSTEIN, D. B.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellites. *Evolution and Applications*. 1. ed. Oxford University Press, 352 p.1999.
- GRISART, B., W. COPPIETERS, F. FARNIR, L. KARIM, C. FORD, P. BERZI, N. CAMBISANA, M. MNI, S. REID, P. SIMON, R. SPELMAN, M. GEORGES, and R. SNELL. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle; identification of missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res.* 12:222–231.
- GROSZ, M. D., AND M. D. MAcNEIL. 1999. The “spotted” locos maps to bovine chromosome 6 in a Hereford-cross population. *J. Hered.* 90:233–236.
- GUIMARÃES, C. T.; MOREIRA, M. A. *Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Plantas. Melhoramento de Espécies Cultivadas*. 1 ed. Editora UFV, Viçosa. 1999. v. 1, p. 715-740.
- HAMADA et al, 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukayotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79:6465:6469.
- HETZEL *et al.* 1997. Localisation of quantitative trait loci (QTL) for growth traits in of *Bos Taurus* x *Bos Indicus* cattle. In: PLANT & ANIMAL GENOME V CONFERENCE, P 12-16
- IHARA N, TAKASUGA A, MIZOSHITA K, TAKEDA H, SUGIMOTO M, *et al.* 2004. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. *Genome Res* 14, 1987–1998
- KAPPES, S. M., J. W. KEELE, R. T. STONE, R. A. MCGRAW, T. S. SONSTEGARD, T. P. L. SMITH, N. L. LOPEZ-CORRALES, and C. W.

- BEATTIE.1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7:235–249.
- KIM, J.-J., F. FARNER, J. SAVELL, and J. F. TAYLOR. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1933–1942.
- KINGHORN, B. 2006. Mapas Genéticos e detecção de genes de efeito maior. IN: *Melhoramento Genético Animal. Uso de Novas Biotecnologias.* Capítulo 7. Editores: Brian Kinghorn, Julius Van der Werf e Margaret Ryan. FEALQ. p 131-144
- LAGONIGRO, R., P. WIENER, F. PILLA, J. A. WOOLLIAMS, and J. L. WILLIAMS. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim. Genet.* 34:371–374
- LANZA, M. A.; GUIMARÃES, C. T.; SCHUSTER, I. Aplicação de marcadores moleculares no melhoramento genético. *Informe Agropecuário*, v. 21, p. 97-108. 2000.
- LEDUR, M. C. & SCHIMDT, G. S. Genética molecular: aplicação de tecnologias moleculares no melhoramento genético de aves. <http://www.bichoonline.com.br/artigos/embrapave0007.htm>.. Acesso em 14 de outubro de 2005.
- LIFT & LUTY,1989. A hypervariable microsatélite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J. Hum. Genet.* 44:398:401),
- LOVE et al, 1990. Toward construction map of the mouse genome using PCR analyzed microsatélites. *Nucl. Acid Res.* 18:4123:4130
- LIU, B. H. 1997. *Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis.* CRC Press, Boca Raton, FL.
- MACHADO, M. B.B. *et al.*2003. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. *Genet. Molec. Biol.* v.26, p. 259-265.
- MACHUGH, D. E. *et al.* 1998. Genetic structure of seven European cattle breeds assessed using 20 microsatellite markers. *Animal Genetics*, v.29, p. 333-340.
- MACNEIL, M. D., J. J. URICK, S. NEWMAN, AND B. W. KNAPP. 1992. Selection for postweaning growth in inbred Hereford cattle: The Fort Keogh, Montana Line 1 Example. *J. Anim. Sci.* 70:723–733.

- MACNEIL, M. D.; GROSZ, M. D. Genome-wide scans for QTL affecting carcass traits in Hereford × composite double backcross populations. *Journal Animal Science*. v.80, p.2316–2324, 2002.
- MADDOX, J.F., DAVIES, K.P., CRAWFORD, A.M., HULME, D.J., VAIMAN, D., CRIBIU, E.P., FREKING, B.A., BEH, K.J., COCKETT, N.E., KANG, N., et al. 2001. An enhanced linkage map of the sheep genome comprising more than 1000 loci. *Genome Res.* 11: 1275-1289
- MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A., 2002. Programa Genoma Brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Genético Animal
- MASSEY, J. M.; & GEORGES, M. 1992. Genmark's approach to markers assisted selection. *Animal Biotechnology*, v.3, n.1, p.95-109
- MATTOS, K. K. Polimorfismos de DNA nos genes BGH e PIT1 em populações zebuínas e mestiços com aptidão leiteira e sua associação com características de produção. 2000. 92p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade FEDERAL DE São Carlos.
- MILACH, S. C. K. 1998. Marcadores Moleculares em plantas/editado por Sandra Cristina Kothe Milach.-Porto Alegre ;S. C. K. Milach. 141p
- MIYATA, M. et al. 2004. Associação entre o marcador microssatélite ILSTS011 e o peso ao nascimento no cromossomo 14 (BTA14) de bovinos. Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. 8 e 9 de julho de 2004. Pirassununga, SP.
- MIZOGUCHI Y; WATANABE T; FUJINAKA K IWAMOTO E; SUGIMOTO Y. SHORT COMMUNICATION. Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in a JapaneseBlack (Wagyu) cattle population.(2005). *Animal Genetics*, 37, 51–54
- MIZOSHITA K., TAKANO A., WATANABE T., TAKASUGA, A., & SUGIMOTO Y. (2005) Identification of a 1.1-Mb region for a carcass weight QTL on bovine Chromosome 14. *Mammalian Genome*.
- MIZOSHITA K., WATANABE T., KUBORA C., YAMAKUCHI H., TODOROKI J. &SUGIMOTO Y. (2004) Quantitative trait loci for growth and carcass traits in a half-sib family constructed from purebred JapaneseBlack (Wagyu) cattle population. *Journal of Animal Science* 82,3415–20.
- MOODY, D. E. *et al.* Characterization of DNA polymorphisms of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. *J. Anim. Sci.*, v. 74, p.1784-1793, 1996.

- MOORE et al, 1991. The conservation of nucleotide micrisatelittes among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*. 10:654:660.
- MOORE, S. S., C. LI, J. BASARAB, W. M. SNELLING, J. LNEELAND, B. MURDOCH, C. HANSEN, and B. BENKEL. 2003. Fine mapping of quantitative trait loci and assessment of positional candidate gene for backfat on bovine chromosome 14 in a commercial line of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 81:1919–1925.
- MOURA DUARTE, F. A.; ZAGO, M. A.; BARROS, M. P. M.; ROSSI, E. R. – tradução e revisão (1999). *DNA Thechnology in Forensic Science*. In: *Tipagem do DNA: Considerações Técnicas*. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP.
- MULLIS, K. B. 1990. The unusual origin of the polimerase chain reaction. *Scientific American*, v.262, p.36-42.
- NICHOLAS, F. W. 1999. *Biologia Molecular*. In: *Introdução à Genética Veterinária*. Porto Alegre:Artmed, p.57-91.
- NKRUMAH, J. D., C. LI, J. YU, C. HANSEN, D. H. KEISLER, and S. S. MOORE. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *J. Anim. Sci.* 83:20–28
- O'BRIEN, S. J.; GRAVES, J. A. M. Reporto f the committee on comparative gene mapping. *Cytogenet. CELL genet.*, v.58, p. 1124-1151, 1991
- OPRZADEK, J.; FLISIKOWSKI, K.; ZWIERZCHOWSKI, L. *et al.* Polymorphisms at *loci* of Leptina (LEP), PIT1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in black-and-white bulls. *Animal Science Papers and Reports*, v.21, n.3, p.135-145, 2003.
- PARMENTIER, I. *et al.* Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.17, p.139-148,1999
- PATON, D. J.; MCGOLDRICK, A.; BELAK, S.; et al. 2000. Classical swine fever vírus: a ring test to evaluate RT-PCR detection methods. *Veterinary Microbiology*, v. 73, n.2, p.159-174.
- PAZ, C. C. P de, 2002. Associação entre polimorfismos genéticos e parâmetros da curva de crescimento em Gado de Corte. Tese (Doutorado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba. 2002.107p
- POMP D., ZOU T., CLUTTER A.C. & BARENDSE W. (1997) Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage

- analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science* 75, 1427.
- RAPLEY, E., McDONALD, B. Microsatellites: the genomic road map. *Today's Life Science*. V.1. p.62-65. 1992
- RASMUSSEN, A.J.M. A contribution to the theory of quantitative character inheritance. *HEREDITAS*, v.18, n.245-261, 1933.
- REGITANO, L. C. A & COUTINHO, L. L. 2001. *Biologia aplicada á Produção Animal*. Brasília: Embrapa. 215p.
- ROHRER, G.A., ALEXANDER, L.J., HU, Z., SMITH, T.P.L., KEELE, J.W., and BEATTIE, C.W. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. *Genome Res.* 6: 371-391.
- RON, M., M. BAND, A. YANAI, AND J. I. WELLER. 1994. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. *Anim. Genet.* 25:259.
- SAIKI, R. K., S. SCHARFF, FALONAK, B. MULLIS, G. T. HORNE, *et al.*, 1985. Enzymatic amplification of *beta-globin* genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230 1350-1354.
- SAIKI R., K., D. 1989. The design and optimization of the PCR. In: ERLICH, H. A., ed. *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. UK: Macmillan Publishers, p.7-16.
- SALMAN, A. K. D. Polimorfismos no Gene da Obesidade (Leptina) em Diferentes Grupos Genéticos de Bovinos de Corte Terminados no Sistema Superprecoce. Tese (Doutorado) – UNESP/FMVZ, julho/2004, 42 p.
- SAX, K. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics*, v.8,p.552-560, 1923.
- SCHENKEL FS, MILLER SP, YE X, MOORE SS, NKRUMAH JD, LI C, YU J, MANDELL IB, WILTON JW, WILLIAMS JL 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim Sci* 83: 2009-2020.
- SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews*, v. 5, p. 63-70. 2004.
- SOLLER, M. Markers assisted selection – an overview. *Animal Biotechnology*. v. 5 p.193-207 (1994)
- SOLLER, M.; ANDERSSON, L. Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. *Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz*, v.17, p. 329-345, 1998.

- STONE R.T. et al. 1996 The bovine homolog of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian genome*, v.7, p.399.
- STONE R.T., KEELE J.W., SHACKELFORD S.D., KAPPES S.M. & KOOHMARAIE M. (1999) A primary screen of the bovine genome for QTL affecting carcass and growth traits. *Journal of Animal Science* 77, 1379–84.
- TAUTZ, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA MARKERS. *Nucl. Acid Res.* 17:6462:6471.
- THALLER, G., C. KUEHN, A. WINTER, G. EWALD, O. BELLMANN, J. WEGNER, H. ZUEHLKE, and R. FRIES. 2003. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim. Genet.* 34:354–357.
- THODAY, J.M. Location of polygenes. *Nature*, v.191, p.368-370, 1961
- WELLER, J. I., Y. KASHI, and M. SOLLER. 1990. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 73:2525–2537.
- WHEELER, T. L., L. V. CUNDIFF, R. M. KOCH, M. E. DIKEMAN, AND J. D. CROUSE. 1997. Characterization of different biological types of steers (Cycle IV): Wholesale, subprimal, and retail product yields. *J. Anim. Sci.* 75:2389-2403.
- WILKINS RJ, DAVEY H.W. 1997. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. *Anim Genet* 28, 376
- WINTER, A., W. KRAEMER, F. WERNER, S. KOLLERS, S. KATA, G. DURSTEWITZ, J. BUITKAMP, J. E. WOMACK, G. THALLER, and R. FRIES. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: Diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:9300–9305 Winter *et al.* 2002

ANEXO

Tabela 1: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e Peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o microssatélite CSSM66, dentro dos cinco grupos genéticos estudados.

GG	TA	N	Características			
			AOL (cm ²)	EGC (mm)	EGCP(mm)	Peso (kg)
1	177	39	76.3±17.1	5.3±1.8	7.6±2.4	533.6±114.1
1	179	16	77.3±16.1	5.4 ±1.8	7.8±2.5	518.6±106.5
1	190	16	73.7±18.1	5.2 ±1.7	7.4±2.2	510.1±113.5
2	177	47	68.6±7.2	4.6±0.9	7.3±1.1	508.6±80.6
2	179	9	71.5±7.9	4.4±0.7	7.0±1.0	510.5±105.9
3	177	7	58.2±4.5	4.4±0.9	4.1±1.2	423.7±37.6
3	179	2	53.4±1.9	3.5±0.7	3.0±0.0	440.5±57.2
3	190	3	56.8 ± 3.2	4.0±0.0	3.6±0.5	432.6±6.6
4	177	11	67.5±6.3	7.5±1.1	9.2±1.9	484.8±26.9
4	179	2	77.8±8.5	8.5±0.7	9.5±0.7	489.0±14.1
4	190	1	60.9	8.0	9.0	440
5	177	4	57.6±5.5	6.0±0.8	5.0±0.8	371.0±38.0
5	179	4	59.4±3.7	5.5±1.0	4.5±1.0	384.5±41.2
5	190	2	61.7±2.5	5.0±1.4	4.0 ±1.4	379.5±26.1

GG – Grupo Genético; TA – Tamanho de alelo em pares de bases; N – número de animais; AOL – Área de olho de lombo em cm²; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm

Tabela 2: Médias e respectivos desvios padrão das características Área de Olho de Lombo (AOL), Espessura de Gordura de Cobertura (EGC), Espessura de Gordura de Cobertura da Picanha (EGCP) e Peso em relação ao tamanho (em pares de bases) dos alelos encontrados para o microssatélite BM8215, dentro dos cinco grupos genéticos estudados.

GG	TA	N	Características			Peso (kg)
			AOL (cm ²)	EGC (mm)	EGCP(mm)	
1	116	11	75.6 ±19.6	5.3±2.2	7.4±2.9	545.5±128.6
1	120	29	76.1±16.8	5.4 ±1.7	7.9±2.3	530.0±111.3
1	126	7	76.0±9.7	4.8 ±1.5	7.1±1.8	465.0±47.5
1	132	8	78.3±13.2	4.8±1.5	7.3±2.0	480.0±84.8
1	140	5	73.7±15.6	4.2±1.3	6.6±2.0	497.0±87.1
2	120	26	69.9±7.4	4.7±0.9	7.3±1.2	502.9±95.5
2	126	9	65.0±6.6	4.0±1.0	6.7±1.5	516.6±47.9
2	132	7	70.5±8.9	4.8±0.6	7.5±0.5	545.0±66.6
2	138	8	69.4 ±4.9	4.7±0.7	7.3± 0.5	465.1±55.2
2	140	7	71.7±8.6	4.2±0.7	7.0±1.1	530.4±77.3
3	116	2	54.9±0.6	4.0±0.0	3.5±0.7	429.0±2.8
3	120	5	58.9±5.3	4.4±1.1	4.2±1.3	433.6±36.2
3	126	1	54.8	4.0	3.0	481.0
3	132	2	61.1±4.7	5.0±0.0	5.0±0.0	383.0±16.9
3	140	2	57.4±7.6	4.5±2.1	4.5±2.1	426.0±36.7
4	116	2	64.4 ±4.9	7.0±0.0	9.0±0.0	493.5±3.5
4	120	7	69.5 ±6.9	8.0±0.8	10.1±0.8	494.4±21.8
4	126	1	76.5	7.0	9.0	493.0
4	132	1	71.8	8.0	9.0	499.0
4	140	8	68.7±8.6	7.8±1.3	9.5±2.3	479.1±30.7
5	116	5	58.0±3.7	6.0±0.7	4.8±0.4	371.4±44.3
5	120	4	60.3±5.6	5.5±1.0	4.7±1.2	390.7±22.2
5	132	1	52.7±0.0	6.0	5.0	390.0

5	140	1	65.4±0.0	6.0	6.0	414.0
---	-----	---	----------	-----	-----	-------

GG – Grupo Genético; TA – Tamanho de alelos em pares de bases; N – número de animais; AOL – Área de olho de lombo em cm²; EGC – Espessura de Gordura de Cobertura em mm; EGCP - Espessura de Gordura de Cobertura de Picanha em mm