

KLEIBE DE MORAES SILVA

SEQUENCIAMENTO DO GENE DA A-FABP (PROTEÍNA DE LIGAÇÃO
DE ÁCIDOS GRAXOS – ADIPÓCITOS) E MAPEAMENTO DE LOCOS
DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS NO CROMOSSOMO 4 DE
SUÍNOS EM UM DELINEAMENTO F2

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586s
2005

Silva, Kleibe de Moraes, 1978-

Sequenciamento do gene da A-FABP (Proteína de ligação de ácidos graxos-adipócitos) e mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 de suínos em um delineamento F2 / Kleibe de Moraes Silva. – Viçosa : UFV, 2005.
xii, 121f. : il. ; 29cm.

Orientador: Simone Eliza Facioni Guimarães.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Animais - Melhoramento genético. 2. Mapeamento cromossômico. 3. Sequenciamento de nucleotídeo.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.082

KLEIBE DE MORAES SILVA

SEQUENCIAMENTO DO GENE DA A-FABP (PROTEÍNA DE LIGAÇÃO
DE ÁCIDOS GRAXOS – ADIPÓCITOS) E MAPEAMENTO DE LOCOS
DE CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS NO CROMOSSOMO 4 DE
SUÍNOS EM UM DELINEAMENTO F2

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Genética e Melhoramento, para
obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

APROVADA: 03 de Agosto de 2005.

Prof. Paulo Sávio Lopes
(Conselheiro)

Dr. Marcos Vinicius G. B. da Silva

Prof. Juarez Lopes Donzele

Prof^ª. Théa Mirian M. Machado

Prof^ª. Simone E. Facioni Guimarães
(Orientadora)

À minha esposa, Lívia.
Aos meus pais, Ilton e Maura.
Ao meu irmão, Dérsio.

“Grandes ambições e conquistas sem
contribuição não tem significado”

AGRADECIMENTO

A DEUS, fonte da vida, por me dar forças e direcionamento em todo momento.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realizar mais esta etapa da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A minha orientadora Prof^a. Simone Eliza Facioni Guimarães, pelo apoio, incentivo, paciência, confiança, e pelos longos anos convívio.

Aos meus conselheiros Prof. Paulo Sávio Lopes e Prof. Robledo de Almeida Torres pelas contribuições e sugestões, pelo apoio, incentivo e pela amizade.

Ao pesquisador Marcos Vinícius G. Barbosa da Silva da Embrapa Gado de Leite (CNPGL), pela amizade, pelo apoio e pelas sugestões nas análises dos dados.

Aos velhos amigos Aldrin, Amauri, Augusto, Fausto, Maria Amélia, Samuel e Dany pelo companheirismo, pela atenção e o aprendizado ao longo destes anos.

Aos colegas de curso Leandro, Alex, Luciara, Marcos (2mi2), Débora, Fábio, Karine, Katiene, Lindenberg, Frederico, André, Joãozinho, Jane e Carlos pelo convívio e pelos ricos debates no Grupo de Discussão.

Aos estagiários e amigos do LABTEC Ana Paula, Cristina, Virgínia Paulinha, Priscila, Miguel, Isabela, Michele, Nicola e Mário pela amizade, pelo apoio e pela imprescindível ajuda, sem os quais teria sido impossível a realização deste trabalho.

Aos amigos de longa data Lincoln, Elenice e Alexandre pelos anos de convívio, apoio e incentivo.

Aos Amigos da ABU-Pós, companheiros das sextas-feiras, que muito tem contribuído na minha permanência em Viçosa.

Aos funcionários da Granja de Melhoramento Genético de Suínos/DZO, que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Max F. Rothschild, coordenador do Projeto Norte Americano de Mapeamento Genômico de Suínos, pela doação dos primers para os marcadores microssatélites.

À maior e melhor banda de rock progressivo, Pink Floyd, que ao som da guitarra de David Gilmour tornou a escrita desta dissertação muito mais agradável.

À minha esposa Lívia, companheira em todos os momentos, pela paciência, compreensão, pelo apoio e incentivo.

BIOGRAFIA

Kleibe de Moraes Silva, filho de Ilton Rodrigues da Silva e Maura de Moraes Silva, natural de Dom Aquino, Estado de Mato Grosso, nasceu em 14 de agosto de 1978.

Em março de 1997, iniciou o curso de Zootecnia, pelo Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, onde foi bolsista de iniciação científica na área de Genética e Melhoramento Animal.

Em agosto de 2003, graduou-se em Zootecnia, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em setembro de 2003, iniciou o Mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento na Universidade Federal de Viçosa.

Em 03 de agosto de 2005, submeteu-se ao exame final de defesa de tese.

CONTEÚDO

Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
Objetivos Gerais.....	21
Referências Bibliográficas.....	22

CAPÍTULO 1

Estudo do gene da A-FABP (proteína de ligação de ácidos graxos - adipócitos) em suínos obtidos por cruzamento entre populações geneticamente divergentes.....	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Metodologia.....	36
Resultados e Discussão.....	41
Conclusões.....	43
Referências Bibliográficas.....	44

CAPÍTULO 2

Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 (SSC4) de uma população F2 de suínos: I - características de desempenho.....	46
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução.....	48
Metodologia.....	49
Resultados e Discussão.....	56
Conclusões.....	64
Referências Bibliográficas.....	65

CAPÍTULO 3

Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 (SSC4) de uma população F2 de suínos: II - Características de carcaça, cortes de carcaça, órgãos e vísceras.....	69
Resumo.....	69
Abstract.....	71
Introdução.....	72
Metodologia.....	74
Resultados e Discussão.....	84
Conclusões.....	95
Referências Bibliográficas.....	96

CAPÍTULO 4

Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 (SSC4) de uma população F2 de suínos: III - características de qualidade da carne.....	101
Resumo.....	101
Abstract.....	102
Introdução.....	103
Metodologia.....	104
Resultados e Discussão.....	111
Conclusões.....	118
Referências Bibliográficas.....	119

RESUMO

SILVA, Kleibe de Moraes; M.S.; Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2005. **Seqüenciamento do gene da A-FABP (Proteína de ligação de ácidos graxos - adipócitos) e mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 de suínos em um delineamento F2.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Conselheiro: Paulo Sávio Lopes e Robledo de Almeida Torres.

O conteúdo de gordura intramuscular tem sofrido um decréscimo contínuo devido à seleção para aumento da quantidade de carne magra na carcaça, o que tem provocado uma diminuição na qualidade da carne suína. Devido a suas propriedades fisiológicas, as proteínas ligadoras de ácidos graxos, foram sugeridas estar associadas ao aumento no conteúdo de gordura intramuscular, melhorando a qualidade da carne suína. A primeira parte deste trabalho foi realizado com o objetivo de seqüenciar as regiões codificadoras do gene da A-FABP (proteína de ligação de ácidos graxos - adipócitos), e comparar tais seqüências na busca de polimorfismos entre a raça naturalizada brasileira Piau e linhas comerciais (constituente da geração parental de um cruzamento F2) e comparar com as seqüências depositadas no GenBank. Após seqüenciamento foi feita comparação das seqüências de nucleotídeos entre as raças de suínos e a referência depositada no GenBank e verificou-se que não existe nenhum polimorfismo de nucleotídeos nos fragmentos seqüenciados nestes animais. O aumento no número de marcadores de DNA disponíveis, aliado ao desenvolvimento dos métodos de genotipagem e das metodologias estatísticas, tornou possível a identificação de loci de características quantitativas (QTL) responsáveis pela variação genética de características de importância econômica na suinocultura. A segunda parte deste trabalho foi realizado com o objetivo de mapear QTL no cromossomo 4 de suínos (SSC4) e associá-los a diversas características de desempenho, carcaça e qualidade da carne. Para isto, foi desenvolvida uma população F2 com 800 animais a partir do acasalamento da geração F1, obtida do cruzamento divergente entre machos da raça naturalizada brasileira Piau e 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White x Piétrain) e genotipada para 13 marcadores tipo

microssatélites. Foi utilizado o método de regressão por intervalo de mapeamento, por meio do programa QTL EXPRESS. Para as características de desempenho, foram encontrados um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para número de tetos na posição 73 cM e dois QTL significativos ($P < 0,05$) para peso aos 21 dias, sendo um na posição 45 e outro a 96 cM. Para as características de carcaça, órgãos e vísceras foram encontrados um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para comprimento de intestino na posição 75 cM, dois QTL significativos ($P < 0,05$), sendo um para peso de coração na posição 79 cM e o outro para peso de pulmão na posição 69 cM e um QTL significativo ($P < 0,01$) para espessura de bacon na posição 69 cM. Para as características de corte de carcaça foram identificados três QTL sugestivos ($P < 0,10$), sendo um para peso de pernil limpo na posição 95 cM, um para peso de paleta limpa na posição 95 cM e um para peso de costela na posição 7 cM. Para as características de qualidade da carne foram encontrados dois QTL sugestivos ($P < 0,1$), sendo um QTL associado a gordura intramuscular na posição 3 cM e um QTL associado a características de coloração da carne, mais especificamente ao índice de amarelo, também na posição 3 cM.

ABSTRACT

SILVA, Kleibe de Moraes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, 2005, August. **Sequence Analysis of Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein Gene (A-FABP) and Mapping Quantitative Trait Loci on Porcine Chromosome 4**. Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Committee Members: Paulo Sávio Lopes and Robledo de Almeida Torres.

The intramuscular fat content has decreased due to selection for lean meat content, what has been reduced the meat quality. Due to their physiologic properties, the fatty acid-binding proteins were suggested to be associated with the increase in the intramuscular fat content, what could improve the pork quality. The objective of the first part of this study was sequencing DNA fragments of the A-FABP gene and compare these sequences to find polymorphisms between the Brazilian naturalized Piau swine and commercial lines (parental generation of the F2 crossbred) and to compare with the one in GenBank. The sequences comparisons between the swine breeds and the GenBank reference showed no nucleotide polymorphism in the analyzed fragments. The increase number of available DNA markers, ally to the development of the genotyping methods and statistical methodologies, it was possible the identification of quantitative trait loci (QTL) responsible for the genetic variation of economic importance traits in pork industry. The objective of the second part of this study was mapping quantitative trait loci (QTL) on porcine chromosome 4 (SSC4), and associate them to several performance, carcass and meat quality traits. For this, a F2 pig population with 800 animals was established from a cross of the F1 generation, produced by crossing using two naturalized Brazilian Piau sires and 18 commercial dams (Landrace x Large White X Piétrain). The population was genotyped for 13 microsatellite markers. Data were analyzed by multiple regressions developed for analysis of outbred lines crosses, using QTL EXPRESS software. To performance traits was found one suggestive QTL ($P < 0,10$) for teat number located at about 73 cM and two significant QTL ($P < 0,05$) for weight at 21 days, one located about 45 cM and another at 96 cM. To carcass traits was found one suggestive QTL ($P < 0,10$) for intestine length

located at about 75 cM, two significant QTL ($P < 0,05$), one for weight of heart located at about 79 cM and another for weight of lung located at about 69 cM and one significant QTL ($P < 0,01$) for bacon depth located at about 69 cM. To carcass cuts traits were identified three suggestive QTL ($P < 0,10$), one for ham weight without skin and fat located at about 95 cM, one for shoulder blade weight without skin and fat located at about 95 cM and one for ribs weight located at about 7 cM. To meat quality traits were found two suggestive QTL ($P < 0,10$), one associated to intramuscular fat content located at about 3 cM and one associated to muscle color Minolta measurements, more specifically to the yellowness, located at about 3 cM.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento tradicional, baseado na teoria da genética quantitativa, tem assegurado ganhos contínuos em várias características de produção. A maior parte do progresso tem sido decorrente da seleção baseada na observação do fenótipo para determinada característica no animal ou em seus parentes. A seleção para características quantitativas, tais como a produção de leite e de carne, é complicada, pois a variação fenotípica é controlada por muitos genes de pequeno efeito que sofrem influência do meio ambiente e da interação entre o genótipo e o ambiente, o que diminui a eficiência da seleção. Apesar disso, ganhos genéticos expressivos nas principais espécies de animais domésticos foram e continuam sendo significativos. Com o surgimento e o grande desenvolvimento da biotecnologia estão sendo disponibilizadas ferramentas para elucidar o controle de características quantitativas, tornando possível prever o valor genético do animal independente da observação fenotípica.

Como o conhecimento dos genes envolvidos em determinada característica de interesse econômico é um processo muito laborioso e caro, é possível obter marcas genéticas ligadas a estes genes e monitorá-las de uma geração para outra. Tais marcas correspondem a segmentos de DNA que explicam a variação fenotípica da característica em estudo.

Neste contexto, a espécie suína é uma das que mais tem se beneficiado das novas tecnologias moleculares. Devido a importância da atividade suinícola, grandes investimentos têm sido feitos na pesquisa do genoma dos suínos com o objetivo de identificar os genes ou os locos envolvidos na determinação das características economicamente importantes. De acordo com ROTHSCILD e PLASTOW (1999), os esforços da comunidade científica internacional têm sido significativos para que o mapeamento genômico das espécies domésticas possa ser utilizado em programas comerciais. Desta forma, estas informações podem ser incorporadas às metodologias tradicionais de melhoramento e auxiliar na seleção dos melhores animais que serão usados como genitores da próxima geração (PEREIRA, 2000).

Com o objetivo de mapear e caracterizar locos que controlam diversas características fenotípicas de interesse econômico nos animais domésticos, diversos esforços internacionais foram iniciados a partir da década de 90 (ANDERSSON, 2001). Em suínos, para se ter uma idéia do sucesso alcançado por esses projetos genômicos, até 1980 somente 50 genes e marcadores tinham sido mapeados e até o momento já estão mapeados 4081 loci marcadores, dos quais 1588 são genes (<http://www.thearkdb.org>). No Brasil, a equipe do Laboratório de Biotecnologia Animal (LABTEC) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, tem trabalhado no estudo de genes e locos de características quantitativas (QTL) em uma população F2 obtida do cruzamento entre raças comerciais e a raça naturalizada Piau (GUIMARÃES et al., 2001).

O aumento no número de marcadores de DNA, juntamente com o desenvolvimento dos métodos de genotipagem, dos delineamentos experimentais, das metodologias estatísticas e da bioinformática, tornaram possíveis a execução de programas com o objetivo de identificar locos de características quantitativas (QTL) responsáveis pela variação genética e verificar as associações dos marcadores genéticos com características de importância econômica na suinocultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Identificação de Locos de Interesse Econômico

Existem dois procedimentos que são utilizados para detectar associações entre marcadores e características de interesse econômico. Um deles é o procedimento de gene candidato (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999), que se baseia no estudo da variação fenotípica de uma característica, em relação ao nível de polimorfismo na seqüência de nucleotídeos de genes previamente conhecidos por estarem envolvidos na fisiologia e desenvolvimento da mesma. O outro procedimento, denominado de varredura genômica, utiliza marcadores moleculares distribuídos por todo o genoma.

2.1.1. Gene Candidato

Define-se gene candidato como sendo um gene já clonado, seqüenciado, de função biológica conhecida e relacionado ao desenvolvimento de uma determinada característica (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999). Essas seqüências gênicas podem ser estruturais ou regulatórios em uma via bioquímica que afeta a característica. O procedimento de genes candidatos utiliza informações prévias sobre a função e a fisiologia de genes previamente identificados em humanos e camundongos, visando identificar mutações específicas em genes homólogos no genoma dos animais. Dentre as principais vantagens desta metodologia podem ser citadas: o alto poder estatístico, o baixo custo, a simplicidade operacional e a ampla aplicabilidade (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999).

Para detectar associações entre o gene candidato e a característica de interesse, é preciso localizar formas alternativas do gene, resultado de mutações de ponto em sua seqüência de nucleotídeos. Para isto, é preciso seqüenciar um grupo de indivíduos de uma população segregante para localizar os polimorfismos na seqüência do gene. Se a mutação identificada no gene causa variação fenotípica de

interesse, é possível a seleção direta não havendo necessidade de dados da família.

2.1.1.1. FABP como Gene Candidato para Qualidade da Carne

Tradicionalmente, conforme GERBENS et al. (1998), os programas de melhoramento têm focalizado seus objetivos na taxa de crescimento e no conteúdo de carne magra na carcaça, o que tem levado ao decréscimo no conteúdo de gordura intramuscular abaixo do nível desejável. O conteúdo de gordura intramuscular é um dos maiores determinantes para a qualidade da carne, sendo responsável pela sua suculência e textura, tendo grande influência na aceitação do produto pelos consumidores.

A melhoria no conteúdo de gordura intramuscular por meio de métodos tradicionais de seleção é complicada devido a impossibilidade de mensuração dessa característica no animal vivo. A seleção por marcadores ou por genes candidatos é, entretanto, uma estratégia promissora para seleção em qualidade (MEUWISSEN e GODDARD, 1996).

Devido a suas propriedades fisiológicas, sugeriu-se que as proteínas ligadoras de ácidos graxos estejam associadas ao conteúdo de gordura intramuscular (GERBENS et al., 1998). As proteínas de ligação de ácidos graxos (FABPs) são proteínas intracelulares envolvidas no transporte de ácidos graxos da membrana celular até os sítios de oxidação e síntese (VEERKAMP e MAATMAN, 1995). Além disso, elas podem estar envolvidas na regulação da concentração de ácidos graxos no interior das células (VEERKAMP et al., 1993). As FABPs são parte de uma família composta de oito proteínas intracelulares encontradas em diferentes tecidos.

Foi demonstrado que os genes *FABP3* e *FABP4* (que codifica, respectivamente, para a proteína de ligação de ácidos graxos no coração e nos adipócitos) afetam a gordura intramuscular, com impacto limitado sobre a espessura de toucinho. Isto permite a seleção para aumento da gordura intramuscular, que melhora o sabor e a maciez, sem aumentar a espessura de toucinho, visto que estas características apresentam

correlação genética positiva (DEKKERS et al. 2001). Em suínos, o gene *FABP3* encontra-se no cromossomo 6 e é expresso predominantemente em células do músculo cardíaco e esquelético. Nessa mesma espécie, o gene *FABP4* localiza-se no cromossomo 4 e se expressa quase que exclusivamente nos adipócitos.

2.1.2. Varredura Genômica

A varredura genômica é um método que tem demonstrado ser bastante efetivo na localização de regiões envolvidas na expressão de características de interesse. Esse procedimento baseia-se na genotipagem de todo o genoma com marcadores moleculares distribuídos ao longo dos cromossomos estabelecendo-se, assim, associações entre alelos específicos do marcador e variação para a característica fenotípica. As associações são detectadas por meio do acompanhamento da co-segregação dos marcadores com o fenótipo em populações estruturadas.

Apesar deste procedimento ser bastante eficiente na detecção de regiões envolvidas na expressão de características de interesse, ele apresenta algumas dificuldades. É um processo demorado e de custo bastante elevado devido a necessidade de genotipagem de centenas de indivíduos com marcadores cobrindo todo o genoma. Em suínos, as principais populações usadas nestes estudos foram de animais obtidos por cruzamento entre diferentes raças ou linhagens.

2.2. Marcadores Moleculares

Os primeiros marcadores considerados modernos foram as isoenzimas, seguidos, cronologicamente, pelos marcadores moleculares RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (BOTSTEIN et al., 1980), RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (WILLIAMS et al., 1990; WELSH e MACLELLAND, 1990), microssatélites (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989), e pelo AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism* (VOS et al., 1995). O desenvolvimento de marcadores moleculares possibilitou utilizar a variabilidade genética existente no DNA

para identificar genes de importância econômica. Os diferentes tipos de marcadores moleculares hoje disponíveis variam quanto a habilidade de detectar diferenças entre indivíduos, custo, facilidade de uso, consistência e reprodutibilidade da técnica.

Os marcadores de DNA podem ser divididos em dois grupos: (1) marcadores diretos ou do tipo I, associados a genes de funções conhecidas, e (2) marcadores indiretos ou do tipo II, associados com segmentos não codificantes ou genes anônimos (DODGSON et al., 1997). Marcadores do tipo I normalmente estão presentes em regiões codificantes e, conseqüentemente, exibem menos polimorfismos que possam ser mapeados ou utilizados em pesquisas de busca de QTL. São marcadores em que há a necessidade de se conhecer a seqüência do gene.

Os marcadores do tipo II são os mais abundantes e estão posicionados nos mapas de ligação. Esses marcadores apresentam maior polimorfismo e são obtidos, em sua maioria, de regiões não codificantes, compreendendo a maioria dos marcadores mapeados até o momento (GROENEN et al., 2000). A grande vantagem deste tipo de marcador é que não há necessidade de conhecimento prévio da seqüência da região polimórfica. Dentre os marcadores do tipo II estão os microsatélites, os quais têm sido amplamente utilizados nos projetos de mapeamento genético.

2.2.1. Marcadores Tipo Microsatélite

Os marcadores do tipo microsatélites, também denominados de SSR (*Simple Sequence Repeats*), são pequenas seqüências com um a seis nucleotídeos repetidos em *tandem* e distribuídos ao longo de todo o genoma. Os microsatélites são comuns a todos os organismos eucariotos podendo ser usados como marcadores para estabelecer grupos de ligação e mapear cromossomos. A maioria dos microsatélites é baseada em repetições de dinucleotídeos (TG)_n, (TC)_n e (TA)_n, sendo o dinucleotídeo (TG)_n a repetição mais abundante em mamíferos (ELLEGREN, 1993).

Os microssatélites são altamente polimórficos, diferindo entre si pelo número de repetições dos nucleotídeos. A hipervariabilidade observada nos microssatélites ainda não é totalmente compreendida, mas sugere-se que sua origem esteja associada à ocorrência de *crossing-over* desigual entre as cromátides irmãs ou a erros de replicação do DNA, em um processo conhecido como *slippage* ou deslizamento da DNA polimerase. De acordo com LEWIN (2000), os microssatélites são regiões de maior recombinação meiótica, conhecidas como *hotspots*. A taxa de permuta genética nestas regiões é cerca de 10^{-4} por kb de DNA, o que corresponde a cerca de dez vezes mais que a taxa de recombinação entre homólogos na meiose em seqüências de DNA aleatório. Além disso, a suposta ausência de pressão de seleção nestas seqüências não codificantes contribui para o alto polimorfismo do DNA repetitivo.

Outras vantagens dos marcadores microssatélites são o seu padrão de herança Mendeliana e sua característica codominante, ou seja, é possível distinguir os indivíduos heterozigotos dos homozigotos, possuindo assim, elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC – *Polymorphism Information Content*). Além disso, como são muitos pequenos e distribuídos ao acaso, permitem a mais completa cobertura do genoma eucarioto. Realmente, mapas detalhados de vários organismos eucarióticos mostram que os marcadores microssatélites são distribuídos aleatória e uniformemente por todo o genoma (CHIN et al., 1996).

Estes marcadores, além de serem altamente polimórficos, possuem outras características comumente requeridas em marcadores, tais como: confiabilidade e reprodutibilidade do método de análise. Todas essas características reunidas fazem com que marcadores baseados em microssatélites sejam ideais para mapeamento genético e físico de genomas, para a identificação e discriminação de genótipos, e estudos de genética de populações. Assim, toda e qualquer população segregante pode ser utilizada como população referência para estudos de ligação e mapeamento genético (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

A importância dos marcadores de microssatélites para a análise genômica apareceu somente após o desenvolvimento da técnica de

reação em cadeia da polimerase (PCR) com SAIKI et al. (1985) e MULLIS et al. (1987). Os microssatélites são flanqueados por seqüências supostamente únicas no genoma e conservados entre indivíduos da mesma espécie e até entre espécies relacionadas. Essas seqüências únicas servem como molde para a síntese de *primers* de microssatélites, os quais permitirão a amplificação do segmento de DNA que possui a região repetitiva, ou seja, a amplificação do loco único de microssatélite. Os *primers* usados são pequenas seqüências de bases de DNA, normalmente variando de 18 a 30, que servem como molde inicial para a extensão do fragmento de DNA pela enzima DNA *Polimerase* na reação de PCR. Apesar de serem pequenos em número absolutos, os *primers* são relativamente grandes para a reação de PCR, o que permite a realização de uma reação de amplificação altamente específica. O comprimento do fragmento de DNA amplificado normalmente estará dentro de 50 a 300 pares de bases (pb), chegando raramente a 500 pb, o que permite ter uma resolução dos produtos amplificados em um gel de poliacrilamida.

Hoje, os marcadores tipo microssatélites constituem uma das classes mais polimórficas entre os marcadores moleculares disponíveis, sendo uma das melhores opções para o mapeamento genético, pois fornecem mapas saturados de forma relativamente barata e não muito laboriosa (BECKMANN & SOLLER, 1990; CHIN et al., 1996).

2.3. Locos de Características Quantitativas – QTL

O termo QTL (*Quantitative Trait Loci*) foi proposto por GELDERMANN (1975) para designar os locos controladores de características quantitativas. Ao contrário dos caracteres qualitativos, que apresentam padrão simples de herança, a maioria das características quantitativas possui variação contínua e são determinadas por muitos genes, cada um deles com pequeno efeito aditivo e influenciado pelo ambiente. Entretanto, segundo LANDE (1981), alguns desses genes podem explicar uma proporção relativamente grande da variação de determinada característica fenotípica, sendo possível localizar a região do

genoma onde estes locos podem estar presentes e estimar a fração da variação fenotípica total devido a eles. Normalmente, não é possível determinar se o efeito detectado com o marcador é devido a um ou mais genes ligados que afetam o caráter. Por esta razão, o termo locos de caráter quantitativo (QTL) é usado para descrever o segmento cromossômico, que possui um ou mais genes, com associações estatísticas significativas entre os valores genotípicos e a variabilidade fenotípica na progênie segregante (WILLIAM, 1998).

Uma grande vantagem do mapeamento de QTL é a possibilidade de tratar características quantitativas, que são afetadas por muitos genes, como se fossem características de herança simples (TANKSLEY et al., 1993).

Com marcadores adequados e distribuídos por todo o genoma, é possível mapear e avaliar todas as regiões cromossômicas quanto aos seus efeitos na manifestação da característica. Com isso, o uso de marcadores moleculares para identificar QTL que controlam caracteres quantitativos tornou-se, há algum tempo, um procedimento padrão para o uso em programas de melhoramento.

2.4. Seleção Assistida por Marcadores – MAS

Uma vez que o fenótipo não é uma indicação precisa do genótipo, a seleção assistida por marcadores (MAS) tem como objetivo usar informações de regiões específicas do genoma para melhorar a resposta à seleção dentro das linhagens (VISSCHER et al., 2000). Desta forma, busca-se maior aproximação entre o genótipo e fenótipo.

De acordo com DAVIS e De NISE (1998), há três estágios no desenvolvimento da MAS. O primeiro é o estágio de detecção, em que os polimorfismos de DNA são usados como marcadores para verificar o efeito e estimar a posição de supostos QTL segregando na população. O segundo estágio visa a validação dos QTL encontrados, ou seja, os marcadores ligados são testados em populações-alvo para verificar sua segregação e sua fase de ligação. O terceiro estágio visa a implementação (ou uso comercial), em que os marcadores que se

mostram preditivos são usados no cruzamento entre famílias para produzir uma base de dados de genótipos. Estes dados são, então, combinados com informações fenotípicas e de *pedigree* e utilizados na avaliação genética para a predição do mérito genético dos indivíduos dentro da população.

A identificação individual de genes pode levar ao aumento da eficiência de seleção no melhoramento animal, especialmente em características de baixa herdabilidade, ou naquelas que podem ser medidas somente após a morte ou em apenas um dos sexos. Assim, segundo PLASTOW (2000), a identificação de genes influenciando características economicamente importantes seguida pela seleção assistida por marcadores, pode ser empregada em conjunto com métodos tradicionais de seleção para aumentar a acurácia da seleção e conseqüentemente, resultar em uma maior resposta à seleção. O tamanho desta resposta extra em esquemas de seleção assistida por marcadores tem sido considerado em muitos estudos teóricos. Em geral, depende dos valores dos efeitos aditivos dos QTL marcados, quanto maiores os efeitos aditivos, maior o progresso genético obtido pela seleção assistida. Segundo GIBSON (1994), há benefício na utilização da seleção assistida por marcadores, mas em alguns casos pode levar a severas conseqüências em longo prazo, como a diminuição ou nenhum ganho genético em função da fixação dos alelos.

Uma limitação ao uso da seleção assistida por marcadores é a existência de poucos genes importantes realmente isolados e para muitas funções biológicas os mesmos ainda não foram identificados. Em suínos, vários locos que têm influência sobre características de importância econômica para a indústria suinícola já foram identificados e já estão sendo utilizados em programas de seleção (Tabela 1). Segundo DEKKERS e HOSPITAL (2002), o mérito econômico da seleção assistida não é questionável em situações em que o custo molecular é compensado pelas economias na avaliação fenotípica, como na seleção para resistência a doenças e qualidade da carne e, também, no caso da seleção precoce, que compensa o custo extra da seleção assistida, especialmente em mercados competitivos.

Tabela 1 – Alguns marcadores genéticos usados em suínos.

Marcadores	Observação
HAL	Qualidade da carne
ESR	Qualidade da carne
PRLR	Tamanho de leitegada
KIT	Tamanho de leitegada
MC1R	Cor branca
MC4R	Cor vermelha/preta
FUT1	Crescimento e deposição de gordura
RN	Resistência a <i>E. coli</i> F18
AFABP, HFABP	Qualidade da carne
IGF2	Gordura intramuscular

Fonte: PLASTOW (2000)

2.5. Mapeamento de QTL

A ligação entre um marcador genético e um QTL foi primeiramente demonstrada por SAX (1923). No entanto, os fundamentos da teoria do mapeamento de QTL foram entendidos a partir do trabalho de THODAY (1961). Esse autor sugeriu que se um ou mais genes responsáveis por uma característica estiverem ligados a um marcador, os efeitos destes genes podem ser indiretamente estudados com base nos genótipos do marcador.

De forma geral, o mapeamento engloba procedimentos de procura, localização e estimativa dos efeitos de um QTL associado a uma característica de herança quantitativa. Para isso, há a necessidade em se determinar o fenótipo de interesse de um grande número de animais. O número de animais depende da magnitude do efeito, da herdabilidade da característica e do delineamento experimental escolhido. Esses requisitos não são completamente limitantes em suínos, devido ao grande número de animais gerados por fêmea e ao pequeno espaço requerido para a criação.

O princípio básico para a identificação de QTL é a existência de ligação entre os marcadores moleculares e os locos que controlam as características de interesse para que, na segregação, esses marcadores

sejam passados de uma geração para outra juntamente com o gene que afeta a característica em questão. Assim, o estabelecimento de mapas de ligação bem saturados é de fundamental importância. Como os marcadores do tipo microssatélites são amplamente distribuídos por todo o genoma, pode-se admitir que existam microssatélites próximos a regiões cromossômicas ainda não identificadas que influenciam a variação das características quantitativas, ou seja, os QTL. Partindo desta premissa, pode-se associar a presença de um QTL para uma característica econômica pela presença de um marcador tipo microssatélite conhecido que seja ligado a esta região genômica. Uma vez estabelecida as associações entre os alelos específicos do marcador e a variação da característica em estudo, a seleção é feita com base nos genótipos dos marcadores. A vantagem desse procedimento é que não exige conhecimento prévio dos genes envolvidos na expressão do fenótipo de interesse. As regiões de QTL são detectadas por meio da co-segregação dos marcadores com o fenótipo em populações estruturadas usando mapeamento por intervalos (HALEY et al., 1994).

Em animais domésticos, o mapeamento de QTL envolveria duas estratégias básicas: a primeira é o cruzamento entre duas populações que diferem em relação às suas frequências alélicas nos locos do marcador e do QTL. Ou seja, a escolha das linhagens parentais é feita pela divergência existente entre as frequências alélicas em relação à característica sob estudo. Assim, as associações presentes entre marcadores genéticos e a característica podem ser estudadas comparando-se o desempenho fenotípico de indivíduos F2 (BOVENHUIS et al., 1997; YONASH et al., 2001). Neste caso, parte-se do princípio que as linhagens são homocigotas para alelos alternativos nos QTL e polimórficos com relação aos marcadores. Segundo, o mapeamento de QTL poderia, também, ser feito em populações comerciais utilizando grandes pedigrees que possuam dados completos de acasalamentos. Como exemplo, é citado o delineamento de filhas e o de netas, que é utilizado em populações de gado de leite (WELLER et al., 1990).

De acordo com ANDERSSON et al. (1998), o cruzamento entre populações divergentes tem as seguintes vantagens: 1) alelos de grande

efeito podem estar segregando, sendo passíveis de detecção; 2) alta heteroziguidade, o que aumenta o número de marcadores e cruzamentos informativos; 3) maior poder nas análises estatísticas devido a alta heteroziguidade nos QTL, sendo 100% na F1, caso exista alelos alternativamente fixados entre os pais; e 4) a fase de ligação entre marcadores e dentro de QTL são consistentes entre toda F1, diferentemente da situação das populações comerciais, em que as fases de ligação podem ser diferentes entre as famílias. Como principal desvantagem, os autores citaram que um QTL detectado por meio deste delineamento pode ou não estar controlando a variação genética dentro de populações comerciais, devendo ser testado antes de qualquer introgressão.

FALCONER e MACKAY (1996) afirmaram que o número de QTL encontrados é sempre subestimado, devido ao fato de que dois QTL muito próximos podem aparecer como apenas um, se eles estiverem em associação (ligação entre alelos favoráveis à característica nos dois locos), ou ainda não serem detectados se os QTL estiverem ligados em repulsão (ligação entre alelo favorável em um loco e um desfavorável no outro loco).

Essas regiões influenciando características quantitativas (QTL) são detectáveis quando estão em desequilíbrio de ligação com um marcador genético. Desequilíbrio de ligação é qualquer desvio das frequências alélicas em relação às frequências esperadas sob independência, indicando a existência de ligação entre o marcador e o QTL. MACKAY (2001) afirmou que, se um QTL está ligado a um loco marcador, haverá uma diferença nos valores médios das características quantitativas entre indivíduos com diferentes genótipos no loco marcador.

Para que a identificação de QTL em populações experimentais seja bem sucedida, devem ser atendidas inicialmente duas premissas: (1) a existência de marcadores informativos e (2) escolha de uma estrutura populacional adequada em que haja variação genética suficiente para detectar ligação entre um QTL segregando e um marcador genético (DEEB & LAMONT, 2002). De acordo com HILLEL (1997), quando uma característica tem padrão de herança poligênico como é o caso da maioria

daquelas controladas por QTL, é preciso garantir suficiente variação genética na população experimental.

Segundo FALCONER e MACKAY (1996), os cruzamentos controlados visam maximizar o desequilíbrio de ligação permitindo acompanhar um dado alelo de interesse por meio de marcadores. Se houver diferença significativa no contraste da média do fenótipo entre as classes genotípicas do marcador, pode-se inferir que existe um QTL ligado àqueles marcadores, ou seja, as classes genotípicas dos marcadores segregam em conjunto com os alelos de um QTL de interesse.

Em populações originadas de cruzamentos entre linhagens endogâmicas, os marcadores selecionados são todos heterozigotos na geração F1. Isto implica em muito a análise para marcadores codominantes, pois somente com marcadores flanqueando o intervalo é possível obter informação sobre o QTL. Como na maioria das espécies de produção não é possível obter linhagens endogâmicas, HALEY et al. (1994) desenvolveram uma metodologia para análise de cruzamentos de linhagens não endogâmicas, utilizando três gerações e múltiplos marcadores ligados para análise de QTL. O método de análise de F2 (*Line Cross*) assume que as linhagens utilizadas (cruzamento entre linhagens selecionadas divergentemente ou raças com diferentes histórias de seleção) podem estar segregando para os locos dos marcadores, mas assumindo que as linhagens estão fixadas para alelos alternativos do QTL. Quando as linhagens cruzadas não tiverem alelos alternativos do QTL fixados, o poder de detecção de QTL será muito reduzido e seus efeitos serão subestimados. O delineamento experimental F2 é aquele que promove maior desequilíbrio de ligação, necessário para a identificação de QTL, além de ser possível a separação dos efeitos aditivos e de dominância dos QTL encontrados.

2.6. Procedimentos Estatísticos para o Mapeamento de QTL

Com o advento dos marcadores moleculares, os geneticistas têm desenvolvido novos meios de análise para identificar QTL para as

características quantitativas. Estes métodos têm buscado responder a questões como o número, a localização e a magnitude do efeito do QTL, facilitando assim a sua utilização nos programas de melhoramento. Grande número de delineamentos experimentais e metodologias estatísticas tem sido propostos para detectar regiões que afetam características quantitativas com o auxílio de marcadores moleculares.

A metodologia mais simples para detectar QTL é a análise dos dados usando um marcador de cada vez. A análise de marcas simples não exige métodos computacionais complexos e não requer o conhecimento da posição dos marcadores no genoma (LYNCH e WALSH, 1998). Esta análise consiste na comparação entre médias das classes genotípicas dos marcadores, podendo ser realizada pelo teste de t, teste de F, ou ainda regressão linear. A mesma análise é repetida para cada marcador. Como vantagem deste procedimento cita-se a economia de tempo e de recursos. Como desvantagens citam-se a necessidade de grande número de indivíduos, baixa eficiência na determinação dos efeitos do QTL e o fato de que quanto maior a distância entre o QTL e o marcador, menor a probabilidade estatística de se detectá-lo, devido a possibilidade de recombinação entre marcador e QTL. Além disso, a magnitude do efeito do QTL normalmente é subestimada (TANKSLEY, 1993). Outra desvantagem desta metodologia de análise é a não distinção entre um QTL de pequeno efeito, situado muito próximo ao marcador e um QTL de grande efeito, situado mais distante (LIU, 1998).

A metodologia do mapeamento por intervalo estima a localização de um eventual QTL entre pares de marcas adjacentes em um grupo de ligação, ou seja, entre marcadores flanqueando um intervalo (LANDER & BOTSTEIN, 1989). Essa estratégia pode usar procedimentos de máxima verossimilhança e requerem a utilização de programas específicos de computador. Assim, aumenta-se o poder de detecção de QTL ao longo do genoma e torna-se possível obter uma estimativa mais precisa de seus efeitos no caráter e posicionamento em relação aos marcadores. Para a realização do mapeamento por intervalo é necessário conhecer as distâncias entre os marcadores em termos de frequências de recombinação. O método testa a possibilidade de ocorrência do loco

controlador da característica (QTL) em uma série de posições dentro de um intervalo flanqueado por dois marcadores. O mapeamento por intervalo apresenta alguns problemas, particularmente na distinção de efeitos de múltiplos QTL ligados. Segundo HALEY e KNOTT (1992), quando dois ou mais QTL estão localizados em um cromossomo, o mapeamento por intervalo pode produzir estimativas viesadas, localizando erroneamente o QTL. Uma metodologia eficaz, desenvolvida para obtenção de níveis de significância geral, utiliza testes de permutação não paramétricos, baseados na reamostragem dos dados originais (DOERGE e CHURCHILL, 1996). Os dados fenotípicos são aleatoriamente reamostrados, gerando uma amostra contendo os dados moleculares originais, mas com dados fenotípicos aleatoriamente correlacionados. O teste estatístico é, então, computado nesta amostra, e o procedimento é repetido por inúmeras vezes.

O procedimento mais utilizado atualmente para mapear QTL é o denominado mapeamento por intervalo composto (ZENG, 1993; JANSEN, 1993). Esta metodologia combina o mapeamento por intervalo com regressão linear múltipla, no intuito de eliminar a interferência de QTL adjacentes na análise do intervalo que está sendo mapeado. Para isto, o modelo utiliza informações de vários marcadores como co-fatores durante a análise e a detecção de QTL. Além de proporcionar uma maior resolução no mapeamento de QTL, este tipo de análise permite a utilização de dados obtidos em vários ambientes, de modo que a interação de QTL com o ambiente possa ser avaliada (COELHO, 2000). De acordo com ZENG (1994), o uso direto da regressão linear múltipla, no mapeamento de QTL, não é apropriado, porque o coeficiente de regressão parcial é geralmente uma estimativa viesada do efeito do QTL. Todavia, este autor mostrou que algumas características da regressão múltipla podem ser usadas para efetuar uma análise com maior acurácia e eficiência.

2.7. Resultados obtidos com Suínos

A maioria dos estudos de mapeamento em suínos tem sido feita envolvendo o cruzamento de raças exóticas com raças comerciais. A detecção de QTL em tais cruzamentos não são imediatamente aplicáveis na indústria por causa do baixo desempenho das raças exóticas para várias características econômicas. O objetivo destes estudos, entretanto, é identificar regiões cromossômicas responsáveis por diferenças pertencentes a características de crescimento, de carcaça e qualidade da carne.

O primeiro estudo bem-sucedido de identificação de QTL relacionados às características de performance foi realizado por ANDERSSON et al. (1994), em uma população F_2 originada do cruzamento entre porco selvagem europeu (javali) x Large White. Os resultados encontrados por estes autores revelaram indícios de associações entre uma região do cromossomo 4 e a taxa de crescimento do nascimento aos 70 kg, assim como para espessura de toucinho.

Evidências de QTL para algumas características de crescimento e de carcaça também foram encontradas por WANG et al. (1998) nos cromossomos 4 e 7. MARKLUND et al. (1996) relataram a presença de um QTL no cromossomo 13 relacionado ao crescimento, enquanto ROHRER (2000) encontrou influência significativa de um QTL no cromossomo 1 sobre o crescimento até as 18 semanas de idade, confirmando os resultados antes encontrados por PASZKE et al. (1999).

ROHRER (2000) relatou a presença de um QTL no cromossomo 1 influenciando a conversão alimentar. Aparentemente, este foi um dos únicos trabalhos relacionando um QTL à esta característica, dada a dificuldade de se alimentar individualmente os animais em experimentos desta natureza. Esta mesma particularidade permitiu ao autor inferir sobre a presença de um suposto QTL no cromossomo 8, relacionado ao ganho de peso diário e próximo ao loco do Receptor Tipo A da Colecistoquinina (*CCKAR*) (CLUTTER et al., 1999), que está envolvido no controle do apetite. Em seu estudo, ROHRER (2000) evidenciou também QTL relacionados aos pesos ao desmame e às oito semanas de idade.

BIDANEL et al. (2001) ao estudarem características de crescimento e de carcaça em uma população F2 obtida do cruzamento entre suínos da raça chinesa Meishan e Large White encontrou QTL para estas características, nas diversas idades, nos cromossomos 1, 4 e 7. Para isso os autores utilizaram 137 marcadores espalhados por todo o genoma.

MALEK et al. (2001) ao usarem marcadores cobrindo todo o genoma em uma população F2 de 525 animais oriundos do cruzamento entre machos Berkshire e fêmeas Yorkshire encontraram 16 QTL significativos para características de crescimento nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 13, 14, e X. Para as características de carcaça foram encontrados 20 QTL nos cromossomos 1, 4, 5, 6, 7, 12, 13, 14, e 18.

GELDERMANN et al. (2003) encontraram vários QTL para características de crescimento em três populações obtidas do cruzamento entre a raça chinesa Meishan, porco selvagem europeu (javali) e Piétrain.

Em um trabalho utilizando linhas comerciais, EVANS et al. (2003) encontraram um QTL no cromossomo 7 associado a característica de crescimento, em uma população de suínos Hampshire, e um QTL no cromossomo 2 para comprimento da carcaça, em uma segunda população de animais da mesma raça. Apesar da grande pressão de seleção que certas linhas vêm sofrendo, este estudo serviu para mostrar que QTL encontrados em populações obtidas por cruzamentos divergentes também estão segregando em populações comerciais.

Em relação as características de composição de carcaça, ROHRER e KEELE (1998a) relataram QTL com efeitos significativos nos cromossomos 1, 7 e X. PÉREZ-ENCISO et al. (2000) relataram, entretanto, a presença de QTL relacionados à espessura de toucinho no cromossomo 4. De KONING et al. (1999) ao estudarem uma população F2 oriunda de cruzamento entre a raça chinesa Meishan e linhas holandesas de Large White e Landrace, identificaram um QTL para espessura de toucinho de alta significância no cromossomo 7 e um sugestivo no cromossomo 2. Os autores também identificaram QTL sugestivos afetando gordura intramuscular nos cromossomos 2, 4 e 6. Com a mesma população acima, De KONING et al., (2001) ao usarem

marcadores cobrindo todo o genoma encontrou 23 QTL sugestivos para qualidade da carne.

Outros trabalhos evidenciando QTL relacionados à qualidade da carne foram relatados por ROTHSCILD et al. (1995) e WANG et al. (1998), que encontraram algumas regiões nos cromossomos 4 e 7 relacionados à cor e firmeza, enquanto MOSER et al. (1998) relataram a presença de QTL somente no cromossomo 7. ANDERSSON-EKLUND et al. (1998), em um dos trabalhos mais completos de scans de QTL, utilizaram 234 marcadores e encontraram QTL para pH, retenção de água e cor, nos cromossomos 2 e 12. De KONING et al. (2001), ao utilizarem 132 marcadores espalhados por todo o genoma em uma população F2 de 785 animais obtidos do cruzamento entre suínos da raça chinesa Meishan e Landrace, encontraram vários QTL para diversas características de qualidade da carne, sendo três significativos para a característica de cor da carne. GRINDFLEK et al. (2001), ao estudarem os cromossomos 4, 6 e 7 em uma população comercial da Noruega, encontraram um QTL significativo afetando gordura intramuscular no cromossomo 6 e um QTL sugestivo para espessura de toucinho no cromossomo 4.

Embora existam trabalhos que relatem algum sucesso na identificação de QTL ligados a diversas características de crescimento, de carcaça e de qualidade da carne, seu uso em programas comerciais de melhoramento ainda não é corriqueiro em virtude da possibilidade de se perder o marcador ou mesmo o QTL. De VRIES et al. (2000) afirmaram que muitos pesquisadores nesta área concluíram que a localização do gene (ou genes) responsável pela expressão da característica é de maior interesse, a despeito desta ser uma tarefa mais difícil em função do tamanho da região e do número de genes que possa estar contido no seu interior. Uma das formas de se identificar os genes, segundo esses autores, é usar o mapeamento comparativo, tomando-se os mapas de espécies mais estudadas como camundongos e humanos. Em curto prazo, alguns projetos demonstrariam como os supostos QTL encontrados poderiam ser usados em rebanhos comerciais.

2.8. Mapas Físicos do Cromossomo 4 – SSC4

As Figuras 1 e 2 mostram os mapas físicos contendo, respectivamente, alguns marcadores do tipo microssatélites e genes já encontrados no cromossomo 4.

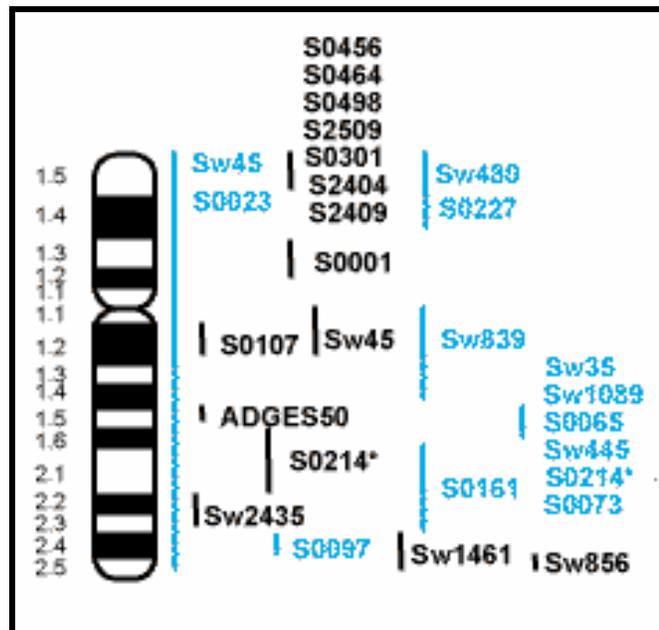


Figura 1 – Mapa físico do cromossomo 4 contendo marcadores tipo microssatélites (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/cyto/genmar/hm/4gm.htm>).

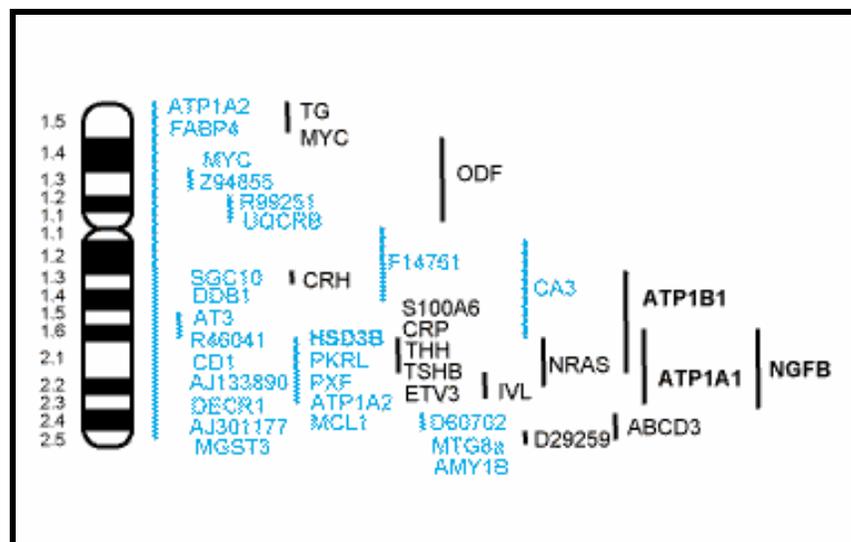


Figura 2 – Mapa físico do cromossomo 4 com o posicionamento de alguns genes já encontrados (<http://www.toulouse.inra.fr/lgc/pig/cyto/genmar/hm/4gm.htm>).

3. OBJETIVO GERAIS

Os objetivos, ao realizar este trabalho, foram:

1. Seqüenciar os éxons do gene *FABP4*, responsável em codificar a proteína de ligação de ácidos graxos dos adipócitos (A-FABP), no cromossomo 4 em 12 fêmeas da linha comercial (Landrace x Large White x Piétrain) e 2 machos da raça naturalizada Brasileira Piau. Comparar as seqüências entre os animais, bem como entre estes e a depositada no GeneBank e associar os possíveis polimorfismos ao conteúdo de gordura intramuscular.

2. Mapear QTL no cromossomo 4 de suínos (SSC4) e relacioná-los às diversas características de crescimento, de carcaça e de qualidade da carne em uma população de animais F2, produzida por cruzamentos entre raças geneticamente divergentes.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L., ANDERSSON,-EKLUND, L., et al.: Mapping of QTLs for growth and fatness in pig. In: molecular Dissection of Complex Traits. 1ª Ed. CRC. 241-254. 1998.
- ANDERSSON, L., HALEY, C.S., ELLEGREN, H., KONTT, S.A. JOHANSSON, M. K. ANDERSSON, K., ANDERSSON-EKLUND, L., EDFORS-LILJA, I., FREDHOLM, M., HANSSON, I., HAKANSSON, J., LUNDSTRÖM, K.: Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, v.263, p.1771-1774, 1994.
- ANDERSSON, L.: Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. *Nat. Rev. Genet.* 2: 130-138, 2001.
- ANDERSSON-EKLUND, L., MARKLUND, L., LUNDSTRÖM, K., et al.: Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality in a Wild Boar x Large White intercross. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 694-700, 1998.
- BECKMANN, J. S., SOLLER, M.: Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. In: MIFLIN bj, (Ed.) *Oxford surveys of plant molecular & cell biology*. Oxford: Oxford University Press, v.3, p.196-250, 1990.
- BIDANEL, J.P., MILAN, D., IANNUCELLI, N., AMIGUES, Y., BOSCHER, M.Y., BOURGEOIS, F., CARITEZ, J.C., GRUAND, J., LE ROY, P., LAGANT, H., QUINTANILLA, R., RENARD C., GELLIN, J., OLLIVIER, L., CHEVALET, C. 2001. Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetic Selection Evolution*, v.33, p.289–309.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W.: Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J. Hum. Genet.*, v.32, n.1, p. 314-331, 1980.

- BOVENHUIS, H., VAN ARENDONK, J. A. M., DAVIS, G., ELSEN J. M., HALEY, C. S., HILL, W. G., BARET, P. V., HETZEL, D. J. S., NICHOLAS, F. W.: Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. *Livestock production Science*, v.52, p.135-144, 1997.
- CHIN, E. C. L., SENIOR, M. L., SHU, H., SMITH, J. C. S.: Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. *Genome*, v.39, p. 866-873, 1996.
- CLUTTER, A. C. 1999. Developing tools for marker-assisted selection in pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 1, 1999, Viçosa. Anais... Viçosa: UFV, 1999, p. 269-284.
- COELHO, A. S. G.: Considerações gerais sobre a análise de QTL. FUNAPE, Goiânia, p.1-20, 2000.
- DAVIS, G.P., De NISE, S.K. 1998. The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 2331-2339.
- De KONING, D. J., JONSS, L. L. G., RATTINK, A. P., VAN GERS, P. A. M., De VRIES, B. J., GORENEN, M. A. N., VAN DER POEL J. J., DE GROOT, P. N., BRASCAMP, E. W., VAN ARENDONK J. A, M.: Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (SUS SCROFA). *Genetics*, v.12, p.1679-1690, 1999.
- De KONING, D. J., RATTINK, A. P., HARLIZIUS, B., VAN ARENDONK J. A, M., BRASCAMP, E. W., GORENEN, M. A. N.: Detection and characterization of quantitative trait loci for meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, V.79, p.2812-2819, 2001.
- De VRIES, FAUCITANO, L., SOSNICKI, A.A., et al.: The use of gene technology for optimal development of pork meat quality. *Food Chemistry*, v. 69, p. 397-405, 2000.

- DEEB, N., LAMONT S. J.: Genetic architecture of growth and body composition in unique chicken populations. *Journal of Heredity*, 93, 107–118, 2002.
- DEKKERS, J. C. M., HOSPITAL, F.: The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. *Nat. Rev. Genet.* v.3, p.22–32, 2002.
- DEKKERS, J.C.M., ROTHSCHILD, M.F., MALEK, M.M.: Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. USA, *II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, 2001*. Via Internet.
- DODGSON, J. B., CHENG, H. H., OKIMOTO, R.: DNA marker technology: a revolution in animal genetics. *Poultry Science*, v.76, p.1108-1114, 1997.
- DOERGE, R. W., CHURCHILL, G. A.: Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics*, v.142, n.1, p.285-294, 1996.
- ELLEGREN, H.: Genome Analysis with microsatellites markers. Department of Animal Breeding and Genetics. Swedish University of Agricultural Science, 1993.
- EVANS, G. J., GIUFFRA, E., SANCHEZ, A., KERJE, S., DAVALO, G., VIDAL, O., ILLAN, S., NOGUERA, J. L., VARONA, L., VELANDER, I., SOUTHWOOD, O. I., DE KONING, D. J., HALEY, C. S., PLASTOW, G. S., ANDERSSON, L.: Identification of Quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics*, v. 164, p. 621-627, 2003.
- FALCONER, D. S., MACKAY, T. F. C.: Introduction to quantitative genetics. Essex, UK: Longman Group Limited, 6th edition, 1996, 464p.

- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D.: Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA, 1996. 220p.
- GELDERMANN, H., MULLER, E., MOSER, G., REINER, G., ARTENSCHLAGER, S., CEPICA, S., STRATIL, A., KURLY, J., MORAN, C., DAVOLI, R., BRUNSCH, C.: Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Piétrain, Meishan and Wild Boar crosses. *J. Anim. Breed. Genet*, v.120, p.363-393, 2003.
- GELDERMANN, H.: Investigations on inheritance on quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theoretical and Applied Genetics*, v.46, p.319-330, 1975.
- GERBENS, F., JANSEN, A., VAN ERP, A.J., HARDERS, F., MEUWISSEN, T.H., RETTENBERGER, G., VEERKAMP, J.H., TE PAS, M.F.: The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm Genome*, 1998, 9:1022-6.
- GIBSON, J. P.: Short-term gain at the expense of long-term gain response with selection of identified loci. *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, v.21, p.201-204, 1994.
- GRINDFLEK, E., SZYDA, J., LIU, Z., LIEN, S.: Detection of quantitative trait loci for meat quality in a comercial slaughter pig cross. *Mammalian Genome*. 12. 299-304. 2001.
- GROENEN, M. A. M., CHENG, H. H., BUMSTEAD, N., BENKEL, B. F., BRILES, W. E., BURKE, T., BURT, D. W., CRITTENDEN, L. B., DODGSON, J., HILLEL, J., LAMONT, S., PONCE DE LEON, A., SOLLER, M., TAKAHASHI, H., VIGNAL, A.: A consensus linkage map of the chicken genome. *Genome research*, v.10, p.137-147, 2000.

- GUIMARÃES, S. E. F., LOPES, P. S., WENCESLAU, A. A., PIRES, A. V., MENK SOARES, M. A., CARMO, F. M. S.: O Genoma dos Suínos. In: Anais da 38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Piracicaba. SP. 612-619. 2001.
- HALEY, C. S., KNOTT, S. A., ELSEN, J. M.: Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics*, v.36, p.1195-1207, 1994.
- HALEY, C. S., KNOTT, S. A.: A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity*, v.69, p.315-324, 1992.
- JANSEN, R. C.: Maximum likelihood in a generalized linear finite mixture model by using the EM algorithm. *Biometrics*, v.49, p.227-231, 1993.
- LANDE, R.: The minimum number of genes contributing to quantitative variation between and within populations. *Genetics*, 121:185-199, 1981.
- LANDER, E. S., BOTSTEIN, D.: Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*, v.121, p.185-199, 1989.
- LEWIN, B. *Genes VII*. Oxford University Press, 2000. 952p.
- LITT, M., LUTTY, J. A.: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, v.44, p.398-401, 1989.
- LIU, B.H. *Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis*. 611p., 1998.
- LYNCH, M. WALSH, B.: *Genetics and Analysis of quantitative traits*. Sunderland: Sinauer Associates, 980p, 1998.
- MACKAY, t. F. C.: Quantitative trait in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics*, v.2, p. 11-20, 2001.

- MALEK, M., DEKKERS, J. C. M., LEE, H. K., BASS, T. J., ROTSCCHILD, M. F.: A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian genome*, v.12, p. 630-636, 2001.
- MARKLUND, L., JOHANSSON MOLLER, M., HOYHEIM, B., et al.: A comprehensive linkage map of the pig based on a Wild pig-Large White intercross. *Animal Genetics*, v. 27, p. 255-269, 1996.
- MEUWISSEN, T. H. E., GODDARD, M. E.: The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genetic Selection Evolution*, v.28, p.161, 1996.
- MOSER, G., MULLER, E., BEECKMANN, P. et al.: Mapping QTL in F₂ generations of Wild Boar, Pietraín and Meishan pigs. In: Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, v. 26, p. 478-481, 1998. [CD-ROM].
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. Specific synthesis of DNA in-vitro via a polimerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350, 1987.
- PASZEK, A., WILKIE, P., FLICKLINGER, G., ROHRER, G., ALEXANDER, L., BEATTIE, C.W., SCHOOK, L.B.: Interval Mapping of growth in divergent swine cross. *Mammalian Genome*, v.10, p.117-122, 1999.
- PEREIRA, A. F.: Melhoramento genético de suínos. IN: Reunião Anual da SBZ, 37, Anais dos Simpósios, Viçosa, SBZ, 2000, p.9-15, 2000.
- PÉREZ-ENCISO, M., CLOP, A., NOGUERA, J.L., et al.: A QTL on pig chromosome 4 affects fatty acid metabolism: Evidence from a Iberian by Landrace intercross. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 2525-2531, 2000.

- PLASTOW, G. S.: Molecular genetics in the swine industry. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Anais... Belo Horizonte, MG: SBMA, 2000, p.21-30, 2000.
- ROHRER, G. A., KEELE, J. W.: Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: I. Fat deposition traits. Journal of Animal Science, v. 76, p. 2247-2254, 1998.
- ROHRER, G.A.: Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of backfat and weight in a Meishan-White composite resource population. Journal of Animal Science, v. 78, p. 2547-2553, 2000.
- ROTHSCHILD, M. F., SOLLER, M.: Candidate gene analysis to detect genes controlling traits economic importance in domestic livestock. In: Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 1999, Viçosa, Anais... Viçosa:p.219-242, 1999.
- ROTHSCHILD, M.F., LIU, H.C., TUGGLE, C.K., et al.: Analysis of pig chromosome 7 genetic markers for growth and carcass performance traits. Journal of Animal Breeding and Genetics, v.112, p. 341-348, 1995.
- ROTHSCHILD, M.F., PLASTOW, G.S.: Advances in pig genomics and industry applications. AgBiotechNet, v.1, p.1-7 1999.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G.T., ERLICH, H. A., ARNHEIN, N.: Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, v.20, p.1350-1354, 1985.
- SAX, K.: The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in Phaseolus Vulgaris. Genetics, v.8, p.522-560, 1923.
- TANKSLEY, S. D. Mapping Polygenes. Annual Review of Genetics. v27. 205-233. 1993.

- THODAY, J. M: Location of polygenes. *Nature*, v.191, p.368-370, 1961.
- VEERKAMP, J. H., MAATAMAN, R. G. H. J. (1995): Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes. *Progr. Lipid. Res.* 34, 17-52.
- VEERKAMP, J. H., VAN KUPPERVELT, T. H. M. S. M., MAATMAN, R. G. H. J., PRINSSEN, C. F. M. (1993): Structural and functional aspects of cytosolic fatty acid binding proteins. *Prostaglandins leukot Essent Satty Acids* 49, 887-906.
- VISSCHER, P., PONG-WONG, R., WHITTEMORE, C., et al. 2000. Impact of biotechnology on (cross)breeding programmes in pigs. *Livestock Production Science*, v. 65 (1-2), p. 57-70.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M.: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids res.*, v.23, n.5, p.4407-4414, 1995.
- WANG, L., YU, T.P., TUGGLE, C.K., et al.: A direct search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 2560-2567, 1998.
- WEBER, J. L. MAY, P. E.: Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Human Genetics*, v. 44, p. 388-396, 1989.
- WELLER, J. I., KASHI, Y., SOLLER, M.: Power of daughter and granddaughter designs for genetic mapping of quantitative traits in dairy cattle using genetics markers. *Journal of dairy Science*, v.73, p.2525-2537, 1990.
- WELSH, J., McCLELLAND, M.: Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.*, v.18, n.7, p.7213-7218, 1990.

- WILLIAM, D.B.: QTL analysis: power, precision and accuracy. In: PATERSON, A.H. Molecular dissection of complex traits. CRC Press, New York, 1998, p. 145-162.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELICK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V.: DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., v.18, n.6, p. 6531-6535, 1990.
- YONASH, N., CHENG, H. H., HILLEL, J., HELLER D. E., CAHANER A.: DNA microsatellites linked to quantitative trait loci affecting antibody response and survival rate in meat-type chickens. Poultry Science 80, 22-8, 2001.
- ZENG, Z. B.: Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics, v.136, p.1457-1466, 1994.
- ZENG, Z. B.: Theoretical basis for separation of multiple linked gene affects in mapping quantitative trait loci. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.90, p.10972-10976, 1993.

CAPÍTULO 1

Sequenciamento do gene da Proteína de Ligação de Ácidos Graxos - Adipócitos (A-FABP) em suínos

RESUMO. As FABPs (proteínas de ligação de ácidos graxos) são parte de uma família composta de oito proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos da membrana celular até sítios de oxidação e síntese. Devido a suas propriedades fisiológicas, tais foram sugeridas estar associadas ao aumento no conteúdo de gordura intramuscular, melhorando a qualidade de carne suína. O objetivo ao realizar este trabalho foi seqüenciar as regiões codificadoras do gene da A-FABP (proteína de ligação de ácidos graxos - adipócitos), e comparar tais seqüências na busca de polimorfismos entre a raça naturalizada brasileira Piau e linhas comerciais (constituente da geração parental de um cruzamento F2) e comparar com as seqüências depositadas no GenBank. O DNA dos animais foi extraído de sangue pela técnica de fenol:clorofórmio e os primers foram desenhados segundo referências encontradas no GenBank para o gene e para a espécie. Após a amplificação dos fragmentos, o conteúdo da reação foi purificado por meio do kit de purificação de DNA e seqüenciado pela técnica de terminação em cadeia por ddNTP (dideoxynucleotídeos) utilizando-se o seqüenciador ABI PRISM 310. A comparação das seqüências de nucleotídeos entre as raças de suínos e a referência foi realizada pelo programa CLUSTALX (1.83) e verificou-se que não existe polimorfismo de nucleotídeos nos fragmentos seqüenciados nestes animais.

CHAPTER 1

Sequencing of pig Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein (A-FABP) gene

ABSTRACT. FABPs (Fatty Acid Binding-Proteins) are part of a family composed by eight intracellular proteins that transport fatty acid from cell membrane sites to fatty acid oxidation and synthesis. Due to their physiologic properties, the fatty acid-binding proteins were suggested to be associated with the increase in the intramuscular fat content, what could improve the pork quality. The objective of this study was sequencing DNA fragments of the A-FABP gene and compare these sequences to find polymorphisms between the Brazilian naturalized Piau swine and commercial lines (parental generation of the F2 crossbred) and to compare with the one in GenBank. The DNA of the animals was extracted from blood by phenol:chloroform technique. The primers were made according to the references found in the GenBank for this gene and this specie. After the fragment amplification, the reaction mixture was purified by a DNA purification kit. The purification products were sequenced with the ddNTP (dideoxynucleotidies) terminal chain technique, using the ABI PRISM 310 sequencer. The sequences comparisons between the swine breeds and the GenBank reference were made by the CLUSTALX (1.83) program, which showed no nucleotide polymorphism in the analyzed fragments.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético dos suínos durante os últimos 50 anos esteve centrado na redução da idade de abate, no aumento do rendimento de carne magra na carcaça, e na melhoria da conversão alimentar. Isso foi possível devido à intensa seleção de animais usando-se o aumento da taxa de crescimento e redução da espessura de toucinho como critérios de seleção (SATHER e FREDEEN, 1978). Devido à variação genética aditiva disponível, e às correlações genéticas favoráveis entre as características selecionadas e os objetivos da seleção, obteve-se ganhos genéticos significativos que resultaram na redução da idade de abate para um determinado peso, no aumento do rendimento de carne e na redução da quantidade de ração consumida por quilo de ganho em peso. Como resultado, passou-se a produzir animais mais jovens e com menos gordura na carcaça.

Enquanto que a seleção em suínos foi dedicada ao aumento da quantidade de carne nas carcaças, pouca atenção foi dada à melhoria da sua qualidade. A ocorrência de correlações genéticas negativas entre conteúdo e qualidade da carne causou mudanças significativas em algumas características. Entre elas pode se citar a grande redução da porcentagem de gordura intramuscular. GOODWIN (1997), com base em informações da literatura, relatou que ocorreu redução no conteúdo de gordura intramuscular do lombo de suínos Duroc e Large White / Yorkshire que variou, respectivamente, de 7,44 % e 4,32 % em 1965, para 6,30 % e 2,90 % em 1987, e para 2,89 % e 1,62 % em 1993. Essa redução da porcentagem de gordura beneficiou certos produtos tais como presunto cozido, que requer baixo conteúdo de gordura intramuscular (De VRIES et al., 1998), mas piorou a qualidade da carne de suínos para consumo "*in natura*" e para produção de presunto defumado, que requerem maiores conteúdos de gordura bem distribuída na carne.

A melhoria genética para a qualidade da carne de suínos por meio de características, tais como conteúdo de gordura intramuscular, não é simples. Em primeiro lugar, porque as medidas não podem ser feitas no próprio animal e sim na carcaça de animais aparentados e, em segundo

lugar, porque os níveis adequados para a característica podem variar de acordo com o peso de abate, com o tipo de corte, destino final do produto e mercado onde será distribuído.

Uma outra opção para o melhoramento da qualidade seria a utilização de animais com base em genes com efeitos conhecidos sobre a qualidade da carne. Segundo PLASTOW (2000), o uso de marcadores de DNA para auxiliar na seleção para melhorar a qualidade da carne é uma das melhores oportunidades para a indústria, uma vez que a informação molecular pode aumentar a acurácia da seleção e, portanto, a resposta à seleção. Assim, a identificação de genes seguida pela seleção assistida por marcadores (MAS) pode ser empregada em conjunto com métodos tradicionais de seleção para acelerar o ganho genético nestas características.

Segundo GIBSON (1994), há pequeno benefício na utilização da MAS, mas em alguns casos pode levar a severas conseqüências a longo prazo, como a diminuição ou ausência de ganho genético em função da fixação dos alelos. Já MEUWISSEN e GODDARD (1996) estudaram o impacto da MAS em características de carcaça e mostraram que, para caracterização de qualidade de carne medidas após o abate, pode-se obter uma resposta adicional acima de 64% usando a MAS em comparação aos métodos tradicionais de seleção.

Conforme MEUWISSEN e GODDARD (1996), a identificação de marcadores genéticos e genes candidatos para características de qualidade de carne em combinação com programas de Seleção Assistida por Marcadores (MAS) irá promover o melhoramento genético para qualidade de carne sem comprometer a percentagem de tecido magro. A suinocultura já está usando ativamente estratégias de MAS para melhorar a produção de suínos (SHORT et al., 1997; ROTHSCHILD e PLASTOW, 1999). Estima-se que o desenvolvimento de tecnologias genômicas aumentem o número de marcadores que possam ser usados na MAS, de forma que a seleção para qualidade de carne possa ser realizada em animais vivos.

Entre os marcadores estudados para aumento do conteúdo de gordura intramuscular estão as proteínas ligadoras de ácidos graxos. Elas

fazem parte de uma família de oito proteínas e devido a suas propriedades fisiológicas, sugeriu-se que elas estejam associadas a esta característica (GERBENS et al., 1998). O gene *FABP4*, responsável pela expressão da proteína de ligação dos ácidos graxos nos adipócitos (A-FABP), se localiza no cromossomo 4 e se expressa quase que exclusivamente nos adipócitos.

O objetivo ao realizar este trabalho foi seqüenciar os éxons do gene *FABP4* no cromossomo 4 em 12 fêmeas da linha comercial (Landrace x Large White x Piétrain) e 2 machos da raça naturalizada Brasileira Piau. Ao mesmo tempo, este trabalho teve como objetivo comparar as seqüências entre os animais, bem como entre estes e a depositada no GeneBank e associar os possíveis polimorfismos ao conteúdo de gordura intramuscular.

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta de Material para Análise

O material de análise foi originado de dois machos varrões da raça naturalizada Brasileira Piau e 12 fêmeas da linhagem comercial desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa pelo acasalamento de animais das raças comerciais Landrace x Large White x Piétrain e selecionadas para características de desempenho. Os machos foram identificados como C e J e as fêmeas foram identificadas obedecendo a numeração da granja. Esses animais pertenciam a Granja de Melhoramento Genético de Suínos da Universidade federal de Viçosa e são membros da geração parental de um cruzamento divergente F2 no qual se objetiva o estudo de genes candidatos e o mapeamento de QTL para as diversas características de desempenho, carcaça e qualidade de carne.

2.2. Extração, Quantificação e Diluição do DNA

O sangue de cada animal foi coletado por meio de punção venosa do *Sinus orbitalis* em tubos estéreis contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na concentração de 0,5 M e pH 8,0, como também durante a punção cardíaca no momento do abate. As amostras foram centrifugadas a 2.500 g durante 20 minutos. A camada de células brancas, localizada entre as células vermelhas (camada inferior) e o plasma sanguíneo (camada superior), foi isolada.

A extração do DNA genômico, a partir das células brancas, foi realizada por purificação com fenol - clorofórmio, após tratamento com proteinase K, como descrito por SAMBROOK et al. (1989). O DNA foi armazenado em Tris-EDTA, em freezer a -20 C.

2.3. Construção dos *PRIMERS*

Os *primers* foram construídos usando o programa encontrado no site <http://alces.med.umn.edu/websub.html>, utilizando-se as seqüências depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>), sob o código de acesso Y16039. Eles cobriram a região onde se encontram os *exóns* I, II, III e IV do gene em estudo (*FABP4*).

Os conjuntos de *primers* foram construídos para gerarem fragmentos menores que 600 pb (pares de bases) para viabilizarem os trabalhos de seqüenciamento automático, que se tornam menos precisos ou até mesmo inviáveis em fragmentos de DNA muito extensos. Foram necessários quatro conjuntos de *primers* para cobrir todo o fragmento desejado. A Tabela 1 mostra os *primers* que foram usados.

Tabela 1 – Conjunto de *primers* usados para cada região do gene *FABP4*.

Região	Primer	Seqüência (5' – 3')	T(°C)	ΔG
Éxon I	AFABP1-F	ACTCTAAGTCCAATGACCCGTTG	68	-5,10
	AFABP1-R	CAGTTCACCTTTAAGAAGCATTAGT	68	-3,90
Éxon II	AFABP2-F	TGGTGACAACACCAGATTCTTAACC	72	-6,30
	AFABP2-R	GCAACATGGTTCAGATCTAGAAGTC	72	-4,50
Éxon III	AFABP3-F	TCATGCGTAATTGTGTATGCTGTTG	70	-5,10
	AFABP3-R	GTGGTGCTTCTGGGGGATAGTAT	70	-3,80
Éxon IV	AFABP4-F	GTGGCTTGGTCCTAAGGATTTACC	72	-5,40
	AFABP4-R	CATATGCTGCCAGGACAGCCATAA	72	-4,40

2.4. Amplificação dos fragmentos

As amplificações foram realizadas no Laboratório Biotecnologia Animal (Labtec) do DZO-UFV, a partir do DNA extraído do sangue dos animais parentais, como já descrito.

As amplificações foram feitas em termocicladores MJ Research PTC 100-96®, sendo os sistemas constituídos de 1U de Taq polimerase; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 μM de cada *primers* (*forward e reverse*); 20 mM de

Tris-HCl pH 8,3; 50 mM de KCl; 2 a 4 mM de MgCl₂ e 25 ng de DNA genômico por reação, obtendo-se 100 µL de volume final para análise de sequenciamento.

Os programas de amplificação basicamente possuíam os seguintes passos: desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos *primers* a 60 °C por 1 minuto e a extensão a 72 °C durante 1 minuto. Repetição por 30 a 35 vezes, de acordo com cada par de *primer*. Ao final das amplificações, os produtos permaneceram guardados a 4°C até o momento da eletroforese, que foi feita em géis de poliacrilamida a 8% com a aplicação de 5 µL da reação de amplificação. A revelação dos géis de poliacrilamida foi feita com nitrato de prata, conforme protocolo abaixo:

1. Agitação por 10 minutos em solução fixadora contendo 10% de álcool etanol, 2% de ácido acético glacial e água destilada com volume final de 500mL.
2. Agitação por 10 minutos em solução contendo 0,2% de nitrato de prata (AgNO₃) e volume final de 500mL de água destilada.
3. Agitação por 10 minutos em solução reveladora contendo 3% de hidróxido de sódio (NaOH), 1% de formol e volume final de 500mL de água destilada.

2.5. Purificação e Quantificação dos Fragmentos Amplificados

Para purificação e quantificação dos fragmentos amplificados, o protocolo fornecido pelo kit GFX (Amersham Pharmacia Biotech) foi seguido:

1. Adicionar 500µL de *Capture Buffer* e 100µL do produto de PCR à coluna GFX sobre o tubo coletor;
2. Homogeneizar cuidadosamente com uma pipeta sem encostá-la na coluna;
3. Centrifugar a coluna com o tubo coletor a 13.000 rpm durante 30 segundos;
4. Descartar do tubo coletor o efluente centrifugado e encaixar o tubo novamente na coluna;

5. Adicionar à coluna 500µL de *Wash Buffer* (10mM Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA);
6. Centrifugar a coluna com o tubo coletor a 13.000 rpm por 30 segundos;
7. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo *ependorf* identificado;
8. Adicionar no topo da matriz da coluna 15µL de água *Mili-Q* autoclavada;
9. Incubar as amostras à temperatura ambiente durante 5 minutos;
10. Centrifugar as amostras a 13.000 rpm durante 3 minutos;
11. Quantificar em espectrofotômetro;
12. Diluir de acordo com o volume da reação de seqüenciamento segundo tabela existente na bula do *Kit Big Dye*).

2.6. Seqüenciamento dos Fragmentos Amplificados

Esta etapa permite que se detecte polimorfismos, permitindo também que a herança destas mutações, que constituirão os haplótipos intragênicos, possam ser seguidas pelas gerações do pedigree, possibilitando que na F2 seus efeitos sejam associados com variações fenotípicas das características mensuradas.

As reações de seqüenciamento foram baseadas na técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídios (ddNTPs). O DNA foi seqüenciado utilizando-se o “ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit” (PE Applied Biosystems). Para isso, de 200 a 500 ng do DNA a ser seqüenciado foram empregados em uma reação contendo 4 µL de *mix*, fornecido no kit de seqüenciamento, 5,0 pmoles do *primer forward* e 6 µL de tampão (200 mmoles Tris-HCl pH9,0; 5 mmoles MgCl₂) em um volume total de reação de 20 µL. Preparou-se um mix semelhante para o *primer reverse*.

Para cada macho foi feito um *mix* para seqüenciamento. As fêmeas, entretanto, foram agrupadas em três *mix* diferentes contendo DNA de quatro fêmeas em cada um, como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Identificação das matrizes e varrões (Geração Parental)

MIX	Grupo Genético	Categoria	Identificação
1	Piau	varrão	J
2	Piau	varrão	C
3	Comercial 1	matriz	22, 25, 90 e 80
4	Comercial 2	matriz	69, 127, 130 e 133
5	Comercial 3	matriz	147, 159, 160 e 175

As leituras das seqüências foram feitas no Seqüenciador Automático ABI PRISM 310, disponível no Labtec.

2.7. Edição e análises das Seqüências

A edição das seqüências, tanto *forward* como *reverse*, obtidas por seqüenciador automático foram alinhadas e editadas por meio do programa CLUSTALX (1.83).

As análises para estabelecer a comparação entre as seqüências geradas e a existente no GenBank foram feitas utilizando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/gorf/wblast2.cgi>).

As amostras foram, então, submetidas à análise de fragmentos, para a detecção de polimorfismo entre elas e montagem do mapa de restrição.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os fragmentos do gene *FABP4* foram amplificados com especificidade e com bom rendimento nas condições de PCR utilizadas neste estudo. Os tamanhos dos fragmentos amplificados corresponderam aos esperados quando os pesos das bandas foram comparados em gel de poliacrilamida a 8%.

O seqüenciamento automático dos fragmentos de DNA gerou fenogramas, de onde se extraiu as seqüências que foram editadas individualmente e montadas em contíguos de modo a evidenciar a presença de polimorfismos nas seqüências expressas.

Na Figura 1 é apresentada parte do terceiro fragmento seqüenciado a partir do gene *FABP4* dos animais analisados. Como pode ser observado pelo alinhamento das seqüências, não foi encontrada divergência nas bases nitrogenadas entre os animais analisados, bem como entre estes e a seqüência de referência depositada no GenBank. Isso ocorreu não somente para o fragmento exemplificado, incluído no éxon 3, mas para todos os fragmentos seqüenciados.

GENBANK	AAC	ITG	TAA	ATC	CAG	CTA	TCC	CAT	AAT	GTA	TTT	CCT	TAC	CCA
CAIO
JUVENAL
MIX1
MIX2
MIX3
GENBANK	CTT	CTT	TCA	TGT	CAA	GTT	TCC	AGG	TAC	CTA	CAA	ATG	CAT	CAC
CAIO
JUVENAL
MIX1
MIX2
MIX3
GENBANK	ACA	ITT	TGT	GA										
CAIO										
JUVENAL										
MIX1										
MIX2										
MIX3										

Figura 1 – Homologia entre os animais para o éxon 3 do gene *FABP4*.

GERBENS et al. (1998) ao estudarem o papel da proteína de ligação de ácidos graxos dos adipócitos (A-FABP) no acréscimo de gordura intramuscular em suínos Duroc também não observaram nenhuma variação genética nas seqüências de nucleotídeos do gene *FABP4*. O mesmo autor relatou que a seqüência codificadora desse gene é altamente conservada em suínos, humanos, camundongos e ratos. Apesar de não ter sido encontrada nenhuma diferença na seqüência codificadora na população em estudo, o autor observou a presença de polimorfismo em um marcador do tipo microsatélite no íntron I e que estava relacionado com o conteúdo de gordura intramuscular.

GERBENS et al. (2000) também não encontraram efeito do gene *FABP4* para conteúdo de gordura intramuscular e espessura de toucinho em uma população F2 oriunda do cruzamento de suínos da raça chinesa Meishan e suínos de raças comerciais (Landrace e Large White). Os autores comentam que a falta de associação deste gene para com gordura intramuscular seja devido a ausência de variação e a interações epistáticas entre genes na população utilizada no estudo.

NECHTELBERGER et al. (2001) também não encontraram influência significativa do gene *FABP4* para gordura intramuscular em suínos Large White, Piétrain e Landrace de uma população austríaca e sugere que esse marcador genético não seja utilizado para seleção assistida naquelas populações. Os mesmos autores comentam que a ausência de associação do gene *FABP4* e o conteúdo de gordura intramuscular seja devido a ausência de desequilíbrio de ligação entre o gene estudado e um ou mais locos influenciando o conteúdo de gordura intramuscular.

Possivelmente, o efeito para conteúdo de gordura intramuscular não seja devido ao gene *FABP4*, uma vez que não houve variação na sua seqüência codificadora.

4. CONCLUSÕES

Nenhum polimorfismo foi encontrado nas seqüências de nucleotídeos do gene *FABP4* nos animais da população estudada. O efeito no conteúdo de gordura intramuscular não foi devido ao gene *FABP4*, portanto o mesmo não deve ser usado como marcador genético para aumento do conteúdo de gordura intramuscular nesta população.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE VRIES, A.G.; SOSNICKI, A.; GARNIER, J.P. and PLASTOW, G.S.
The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. *Meat Science*, v. 49. N. 1, s245-s255, 1998.
- GERBENS, F., DE KONING, D.J., HARDERS, F.L., MEUWISSEN, T.H., JANSSEN, L.L., GROENEN, M.A., VEERKAMP, J.H., VAN ARENDONK, J.A., TE PAS, M.F.: The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and backfat content in Meishan crossbred pigs. *J Anim Sci*, 2000, 78(3):552-9.
- GERBENS, F., JANSEN, A., VAN ERP, A.J., HARDERS, F., MEUWISSEN, T.H., RETTENBERGER, G., VEERKAMP, J.H., TE PAS, M.F.: The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm Genome*, 1998, 9:1022-6.
- GIBSON, J.P.: Short-term gain at the expense of long-term gain response with selection of identified loci. *Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*. 21. 201-204. 1994.
- GOODWIN, R.: Genetic effects on pork quality. In: *Quality Summit, Des Moines, Iowa, July 8-9, 1997*. p. 25-34, 1997.
- MEUWISSEN, T. H. E., GODDARD, M. E.: The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. *Genetic Selection Evolution*, v.28, p.161, 1996.
- NECHTELBERGER, D., PIRES, V., SOLKNER, J., BREM, G., MUELLER, M., MUELLER, M.: Intramuscular fat content and genetic variants at fatty acid-binding protein loci in Austrian pigs. *J. Anim. Sci.*, 2001, 79: 2798-2804.

- PLASTOW, G.S.: Molecular genetics in the swine industry. Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Anais... Belo Horizonte, MG: SBMA, 2000, p.21-30.
- ROTHSCHILD, M.F., PLASTOW, G.S. 1999. Advances in pig genomics and industry applications. AgBiotechNet, v.1, p.1-7.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATS, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 564p.
- SATHER, A.P. and FREDEEN, H.T. Effect of selection for lean growth rate upon feed utilization by the market hog. Can. J. Anim. Sci. v. 58, p. 285-289, 1978.
- SHORT, T.H., SOUTHWOOD, O.I., DE VRIES, A., et al.: Evidence of a new genetic marker for litter size in pigs. Journal of Animal Science, v. 75 (Suppl. 1), p. 29. 1997.

CAPÍTULO 2

Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 (SSC4) em uma população F2 de suínos: I - características de desempenho.

RESUMO. O objetivo ao realizar este trabalho foi o mapeamento de QTL no cromossomo 4 de suínos (SSC4) e a associação destes a diversas características de desempenho. Para isto, foi desenvolvida uma população F2 com 800 animais a partir do inter cruzamento da geração F1, obtida do acasalamento divergente entre machos da raça naturalizada brasileira Piau e 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White X Piétrain) e genotipada para 13 marcadores tipo microssatélites. As características de desempenho avaliadas na população F2 foram: número de tetas, peso ao nascimento, peso aos 21, 42, 63, 77 e 105 dias de idade, peso ao abate, consumo de ração, conversão alimentar e ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias de idade e idade ao abate. Foi utilizado o método de regressão por intervalo de mapeamento, e as análises foram realizadas por meio do programa QTL EXPRESS. Para as características de desempenho foi verificado a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para número de tetas na posição 73 cM e dois QTL significativos ($P < 0,05$) para peso aos 21 dias, sendo um na posição 45 e outro a 96 cM.

CHAPTER 2

Mapping Quantitative Trait Loci on chromosome 4 (SSC4) in a F2 pig population: I – performance traits

ABSTRACT. The objective of this work was mapping QTL on porcine chromosome 4 (SSC4) and associate them to performance traits. For this, a F2 pig population with 800 animals was established from a cross of the F1 generation, produced by crossing using two naturalized Brazilian Piau sires and 18 commercial dams (Landrace x Large White X Piétrain). The population was genotyped for 13 microsatellite markers. The performance traits evaluated in the F2 population were: teat number, birth weight, weight at 21, 42, 63, 77 and 105 days of age, slaughter age, feed intake, feed gain ratio, average daily gain to 77 at 105 days of age, and slaughter age. Data were analyzed by multiple regressions developed for analysis of outbred lines crosses, using QTL EXPRESS software. The presence of a suggestive QTL ($P < 0,10$) was verified for teat number located about 73 cM and two significant QTL ($P < 0,05$) for weight at 21 days of age, one located about 45 and another at 96 cM.

1. INTRODUÇÃO

O uso de marcadores moleculares para a detecção de regiões do genoma associados com características quantitativas cresceu enormemente a partir da década de 90. Com o avanço da biotecnologia, estão sendo disponibilizadas metodologias para elucidar o controle genético de características quantitativas, como é o caso das características de desempenho.

As características de desempenho são, em sua maioria, economicamente importantes na produção animal, estando diretamente relacionadas com a competitividade e lucratividade da suinocultura. Essas características são governadas pela ação e interação de inúmeros genes de pequeno efeito aditivo.

Após a publicação do trabalho pioneiro de ANDERSSON et al. (1994), muitos trabalhos têm mostrado associações entre regiões cromossômicas e algumas características de crescimento em suínos, sendo que a maioria deles tem encontrado QTL com efeitos significativos ou sugestivos.

A genética molecular pode ser utilizada em conjunto aos métodos tradicionalmente empregados, por meio da seleção assistida por marcadores (MAS), para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento. Algumas limitações da seleção baseada no fenótipo poderão ser parcialmente eliminadas com o uso da informação molecular, possibilitando a seleção diretamente pelo genótipo (DNA), resultando em uma seleção mais acurada ou precoce ou ainda de mais baixo custo (DEKKERS e HOSPITAL, 2002), dependendo da característica em questão.

O objetivo ao realizar este trabalho foi mapear QTL associados às características de peso corporal em várias idades, consumo de ração, ganho de peso médio diário, conversão alimentar e idade ao abate, no cromossomo 4 de suínos, a partir de uma população F2 obtida de um cruzamento divergente.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção dos dados e delineamento utilizado

A fase de campo deste experimento foi conduzida na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001.

Foi utilizado o delineamento de F2 para se obter desequilíbrio de fase de ligação entre os marcadores e os QTL. Para tanto, foram construídas inicialmente duas famílias provenientes do cruzamento de dois varrões (C e J) da raça naturalizada Piau com 18 fêmeas originadas de linhagem desenvolvida na UFV pelo acasalamento de animais de raça comercial (Landrace x Large White x Piétrain) selecionados para desempenho. A geração F1 nasceu entre os meses de março e maio de 1999. Dentre os machos F1 foram selecionados ao acaso 11 varrões, provenientes de diferentes leitegadas, que foram cruzados (monta natural) com 54 fêmeas. Estes animais foram acasalados entre os meses de fevereiro e outubro de 2000, para a produção da geração F2, a qual nasceu entre junho de 2000 e fevereiro de 2001. Assim, foram obtidos 800 animais F2, divididos em cinco lotes:

- lote 1 = animais nascidos entre 20/06/00 a 03/07/00;
- lote 2 = animais nascidos entre 03/08/00 a 23/08/00;
- lote 3 = animais nascidos entre 16/09/00 a 01/11/00;
- lote 4 = animais nascidos entre 30/11/00 a 25/12/00;
- lote 5 = animais nascidos entre 19/01/01 a 12/02/01.

Os três primeiros lotes foram constituídos de animais nascidos de matrizes de primeira parição e os demais, de segunda parição. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade, sendo que os machos foram castrados aos 10 dias de idade. Dos 77 aos 105 dias de idade, os animais foram submetidos ao teste de conversão alimentar individual.

2.2. Características avaliadas

As seguintes características fenotípicas foram mensuradas na geração F2: número de tetas (NT); peso ao nascer (PN); peso aos 21 dias (P21); peso aos 42 dias (P42); peso aos 63 dias (P63); peso aos 77 dias (P77); peso aos 105 dias (P105); peso ao abate (PA); ganho de peso médio diário (GPD); consumo de ração (CR) dos 77 aos 105 dias; conversão alimentar (CA) dos 77 aos 105 dias; e idade ao abate (IDA) aos 65 kg de peso médio do lote. O número de observações, as médias, os desvios padrão e os valores máximos e mínimos destas características foram obtidos por meio do PROC MEANS do SAS (2000) (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de observações, média, desvio padrão e valores mínimos e máximos para as características estudadas.

Característica	Unidade	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
NT	n ^o	800	13,167	1,280	9,000	17,000
PN	kg	800	1,200	0,282	0,430	2,130
P21	kg	665	4,874	1,180	1,150	8,690
P42	kg	665	8,245	1,988	1,950	17,860
P63	kg	656	16,210	3,432	3,720	26,530
P77	kg	602	21,423	4,381	6,050	34,500
P105	kg	595	36,262	6,742	11,250	55,000
CR	kg	598	39,806	8,355	13,540	59,070
GPD	kg	591	0,530	0,139	0,010	0,970
CA	kg/kg	591	2,799	0,650	1,995	4,882
PA	kg	510	64,749	5,629	39,090	79,500
IDA	dias	521	147,942	10,616	116,000	192,000

NT - número de tetas; PN - peso ao nascer; P21, P42, P63, P77 e P105 - peso aos 21, 42, 63, 77 e 105 dias de idade, respectivamente; PA - peso ao abate; GPD - ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias; CR - consumo de ração dos 77 aos 105 dias; CA - conversão alimentar dos 77 aos 105 dias e IDA - idade ao abate aos 65 kg de peso médio do lote.

2.3. Extração de DNA

A análise genotípica foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV.

O DNA dos animais parentais, F1 e F2 foi extraído do sangue coletado imediatamente após o abate. As amostras foram mantidas a

60°C por uma hora em CTAB, sendo posteriormente centrifugadas e desproteinizadas em um banho de clorofórmio seguido de centrifugação, sendo o DNA então precipitado em etanol absoluto, e guardado a -20°C para uso posterior. As soluções de DNA para uso (na concentração aproximada de 25 ηg/μL) foram mantidas em geladeira a 4°C. Para as ampliações, este DNA foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.4. Obtenção dos genótipos marcadores

Foram utilizados *primers* de microssatélites para cobrir o cromossomo quatro dos suínos a um intervalo médio de 10,7 cM. A Tabela 2 apresenta os *primers* com algumas características específicas a cada um deles, como localização, fluorescência, faixa da variação de tamanho, em pares de base (pb), e número de alelos.

Tabela 2 – *Primers* utilizados na varredura do cromossomo 4.

Marcador	Posição (cM) ¹	Fluorescência	Temp. anel. ²	Mínimo alelo (pb)	Máximo alelo (pb)	Número de alelos
SW2404	0,0	Tet	62	150	166	5
S0227	4,1	Hex	60	227	251	3
SW489	8,0	Hex	55	159	171	3
S0301	27,1	Fam	58	253	259	3
S0001	41,8	Hex	50	183	189	3
SW35	55,9	Hex	58	135	143	4
S0217	69,6	Fam	62	141	151	3
S0073	74,4	Hex	55	103	119	6
SO214	79,3	Hex	58	128	142	5
SW524	99,3	Tet	62	176	196	2
SW445	105,8	Fam	58	187	207	10
SW58	107,9	Tet	58	210	220	4
SWR153	125,6	Fam	58	217	233	4

¹ segundo ROTHSCHILD (2003); ² temperatura de anelamento em °C.

Para as ampliações, foram utilizados aparelhos termocicladores *MJ Research, Inc.* modelo *PTC-100 (Watertown, USA)* sendo os sistemas constituídos de Taq polimerase 1 U, dNTPs 0,2 mM, *primers forward* e *reverse* 0,2 μM cada, Tris-HCl pH 8,3 20mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 a 4

mM, de acordo com cada *primer*, e DNA genômico 25 ng por reação. O volume final da reação foi de 20 μ L. Os programas de amplificação variaram para cada par de *primer* constituindo-se basicamente dos seguintes passos:

- 1- Desnaturação inicial = 94°C/3 min.;
- 2- Desnaturação = 94°C/1min.;
- 3- Anelamento do primer = temperatura de anelamento, que variou para cada par de *primer*;
- 4- Polimerização = 72°C/1 min. (repetindo-se os passos 2, 3, e 4 por 25 a 35 vezes, de acordo com o *primer*);
- 5- Polimerização final = 72°C/20 min.

As amplificações dos fragmentos dos marcadores foram observadas em gel de poliacrilamida a 5%, onde foram aplicados 5 μ L de cada reação. Após a corrida em cuba de eletroforese foi realizada a coloração com nitrato de prata. Confirmadas as amplificações os produtos foram congelados a -20°C.

As amostras foram submetidas à análise de fragmentos, para o escoreamento das bandas e detecção de polimorfismo entre elas. Estas análises foram feitas por meio de sequenciador automático ABI PRISM 310, do Laboratório de Biotecnologia Animal, no Departamento de Zootecnia da UFV. O escoreamento dos fragmentos amplificados foi feito utilizando o “software” GenScan.

2.5. Análises Estatísticas

Para a análise estatística, os animais, incluindo parentais, F1 e F2, foram genotipados. Porém, serem submetidos às análises para avaliar a existência de QTL, os valores para as características fenotípicas de crescimento foram testados previamente no SAS (2000), para verificar a normalidade na distribuição dos dados. As características que não tinham distribuição normal foram normalizadas por procedimentos estatísticos, sendo que, foi utilizado o BoxCox (BOX e COX, 1964) (Tabela 3).

Tabela 3 – Procedimentos estatísticos de normalização para os valores de crescimento.

Característica	Distribuição
NT	Normalizada por BoxCox
PN	Normal
P21	Normal
P42	Normal
P63	Normal
P77	Normal
P105	Normalizada por BoxCox
CR	Normalizada por BoxCox
GPD	Normal
CA	Normalizada por BoxCox
PA	Normalizada por BoxCox
IDA	Normal

NT - número de tetas; PN - peso ao nascer; P21, P42, P63, P77 e P105 - peso aos 21, 42, 63, 77 e 105 dias de idade, respectivamente; PA - peso ao abate; GPD - ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias; CR - consumo de ração dos 77 aos 105 dias; CA - conversão alimentar dos 77 aos 105 dias e IDA - idade ao abate aos 65 kg de peso médio do lote.

Foram utilizadas as distâncias de consenso do mapa de ligação suíno (ROTHSCHILD, 2003). O mapa de ligação contendo as distâncias entre os marcadores, os genótipos para os diversos marcadores nos animais analisados e os dados fenotípicos foram submetidos ao programa QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002) (<http://www.qtl.cap.ed.ac.uk>).

O programa QTL EXPRESS mapeia os QTL existentes por meio de regressão linear (HALEY et al., 1994), com dois procedimentos sucessivos: primeiramente são obtidas as probabilidades de identidade por descendência (IBD) para locos cromossômicos específicos, utilizando dados dos vários marcadores. Em um segundo passo é empregado um modelo estatístico para as observações e os coeficientes de IBD.

De acordo com SEATON et al. (2002), o programa QTL EXPRESS é adequado para processar dados gerados em populações F2 obtidas a partir de linhagens não endogâmicas, pois aplica um modelo linear aos dados fenotípicos, com efeitos fixos adicionais e covariáveis que expliquem variações para a característica avaliada. Os QTL podem ser especificados em termos de efeitos aditivos e de dominância. O programa permite ainda que um ou mais QTL mapeados em um cromossomo sejam

utilizados como co-fatores no modelo, possibilitando que um QTL de pequeno efeito seja detectado.

No modelo estatístico assume-se que o QTL é dialélico, com alelos alternativos fixados em cada raça parental (HALEY et al., 1994). Considerou-se o genótipo QQ para o genótipo Comercial, com efeito a , qq para o genótipo Nativo, com efeito $-a$, e Qq para o F1, com efeito d . A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada conforme os marcadores, a intervalos de 1 cM ao longo do cromossomo. Estas probabilidades são usadas para se fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL em estudo, para cada animal.

Os valores da razão de verossimilhança (F) foram plotados e os pontos com os maiores valores mostram a posição do provável QTL. Os níveis de significância ($\alpha=0,10, 0,05$ ou $0,01$) “cromossome-wide” foram obtidos pelo teste de permutação (CHURCHILL e DOERGE, 1994), para um total de 10000 permutações, para cada característica. Os dados foram obtidos para o teste de permutação pelo “software” QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002).

Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijk} = S_i + L_j + (C_{ijk} - \bar{C})b + c_a a + c_d d + e_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} = é o fenótipo;

S_i = é o efeito fixo do sexo i , $i = 1, 2$;

L_j = é o efeito fixo do lote j , $j = 1, 2, 3, 4, 5$;

$(C_{ijk} - \bar{C})b$ = ajustamento para as covariáveis (tamanho de leitegada ao nascimento para PN; tamanho de leitegada ao desmame para P21, P42, P63, P77, P105 e PA; peso aos 77 dias para CR, GPD e CA);

Os valores c_a e c_d são funções das probabilidades condicionais do QTL dado o genótipo dos marcadores e são calculados da seguinte maneira:

$$c_a = P(QQ / Mi) - P(qq / Mi)$$

$$c_d = P(Qq / Mi)$$

em que:

$P(QQ)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem homozigotos com origem da raça Comercial;

$P(qq)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem homozigotos com origem da raça Naturalizada;

$P(Qq)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem heterozigotos.

O modelo anterior foi utilizado para estimar a regressão do fenótipo nos coeficientes c_a e c_d , variando a posição do QTL a cada cM. Para cada posição, era calculada uma razão de verossimilhança (F), comparando o modelo que considera a presença do QTL (modelo completo) ao modelo sem o QTL (modelo reduzido).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 é apresentado um resumo dos valores de F máximos e as posições (cM) para os prováveis QTL e as respectivas estimativas dos efeitos aditivos e de dominância. Os altos valores apresentados para as estimativas dos efeitos aditivos e de dominância para algumas características são devido ao processo de normalização dos dados.

Os valores de F para todas as características foram plotados nas Figuras 1, 2 e 3, respectivamente, para as características: NT, PN, P21 e P42, para P63, P77, P105 e PA, e para CR, CA, GPD e IDA, sendo que os picos correspondem às prováveis posições dos QTL encontrados.

Tabela 4 – Resumo dos valores de verossimilhança (F) máximas e suas posições (cM) para os QTL e as respectivas estimativas dos efeitos aditivos e de dominância.

Característica	Posição (cM)	F _{máx}	Aditivo (\pm EP) [†]	Dominância (\pm EP) [†]
NT	73	5,21*	-0,980 \pm 0,468	2,074 \pm 0,759
PN	46	2,15	0,000 \pm 0,019	0,068 \pm 0,033
P21	45 e 99	7,09[†] e 6,29[†]	0,412 \pm 0,138	0,434 \pm 0,241
P42	125	2,69	-0,456 \pm 0,208	-0,377 \pm 0,377
P63	125	2,26	-0,728 \pm 0,356	-0,514 \pm 0,646
P77	70	3,74	-0,745 \pm 0,311	0,892 \pm 0,517
P105	90	4,52	-25,269 \pm 8,651	22,907 \pm 16,347
CR	106	1,09	2,892 \pm 11,967	-24,842 \pm 17,458
GPD	87	3,16	-0,022 \pm 0,024	0,118 \pm 0,047
CA	10	4,38	-0,058 \pm 0,019	0,003 \pm 0,033
PA	125	2,64	3,863 \pm 1,691	0,224 \pm 3,128
IDA	0	4,78	-2,115 \pm 0,655	0,364 \pm 1,096

[†] significativo a 5%; * sugestivo a 10%; ¹ desvio-padrão .

NT - número de tetas; PN - peso ao nascer; P21, P42, P63, P77 e P105 - peso aos 21, 42, 63, 77 e 105 dias de idade, respectivamente; PA - peso ao abate; GPD - ganho de peso médio diário dos 77 aos 105 dias; CR - consumo de ração dos 77 aos 105 dias; CA - conversão alimentar dos 77 aos 105 dias e IDA - idade ao abate aos 65 kg de peso médio do lote.

Observa-se, na Tabela 4 e na Figura 1, que a característica número de tetas (NT) apresentou valores elevados de F (F_{máx} = 5,21), indicando haver um QTL sugestivo na região de 73 cM (P<0,05) influenciando esta característica. PUMFREY et al. (1980) encontraram correlação genética e fenotípica negativa do número de tetas com características reprodutivas. Isto indica que se algum QTL estivesse

afetando número de tetas, este estará tendo efeito antagonista em outras características reprodutivas. De acordo com os mesmos autores, o número de tetas é uma característica que merece atenção no que diz respeito a habilidade materna das fêmeas e, tradicionalmente, tem havido seleção para esta característica. As informações sobre a herança para número de tetas têm sido, porém, limitadas. Esta característica tem papel importante, principalmente, quando o número é menor do que o tamanho de leitegada. Os poucos trabalhos realizados estudando esta característica foram feitos tendo como base o cruzamento entre animais da raça chinesa Meishan e linhas comerciais. Aquela raça é altamente prolífica e chega a produzir, em média, mais de 16 leitões por leitegada, havendo, assim, a necessidade de um grande número de tetas. HIROOKA et al. (2001) ao utilizarem 132 marcadores microssatélites espalhados por todo o genoma suíno em busca de QTL afetando o número de tetas em animais obtidos do cruzamento entre a raça Chinesa Meishan e cinco linhas de suínos da Alemanha não encontraram QTL no cromossomo 4 afetando esta característica. Encontraram, porém, nos cromossomos 2, 10 e 12. CASSANDY et al. (2003) ao estudarem várias características reprodutivas, entre elas o número de tetas, também não encontraram QTL no cromossomo 4.

O peso ao nascer é um dos fatores que mais influencia na sobrevivência do leitão, e está relacionado com o tamanho de leitegada, portanto, um equilíbrio entre essas características é sempre desejável. Uma vez que há correlação negativa entre essas duas características, as regiões do genoma que estejam afetando positivamente o peso ao nascer podem estar afetando negativamente o tamanho da leitegada. Observando os valores de F para a característica peso ao nascimento (PN) na Tabela 4 e na Figura 1, verifica-se que esta não apresentou valores elevados ($F_{\text{máx}} = 2,15$), não evidenciando, portanto, a presença de QTL. O mesmo resultado foi obtido por BIDANEL et al. (2001) e QUINTANILLA et al. (2002), que utilizaram 137 marcadores cobrindo o genoma suíno, os quais não encontraram QTL afetando esta característica. WANG et al. (1998), que trabalharam com os cromossomos 4 e 7, também não encontraram evidências de QTL para PN. WALLING et

al. (2000) encontraram, entretanto, um QTL significativo ($P < 0,01$) no cromossomo 4 em uma população F2 de suínos da França obtida do cruzamento entre as raças Large White e Meishan.

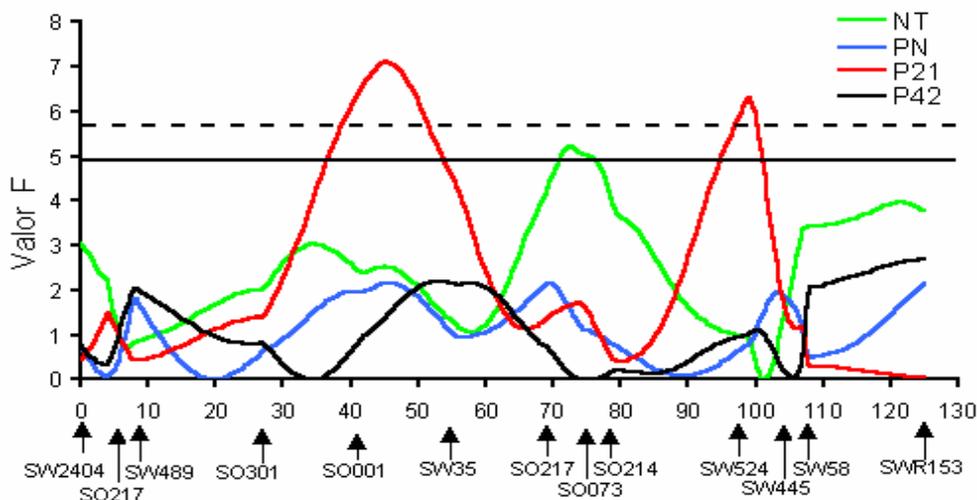


Figura 1 – Estimativas dos valores de F para as características número de tetas (NT), peso ao nascimento (PN), peso aos 21 (P21) e aos 42 (P42) dias de idade. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Os valores máximos de F obtidos para peso aos 21 dias de idade (P21) foram de 7,09 na posição de 45 cM e 6,29 na posição 99 cM, indicando haver dois QTL significativos ($P < 0,05$) para esta característica no cromossomo 4 (Tabela 4 e Figura 1). A posição para o primeiro QTL está próxima do marcador SO001, indicando a proximidade deste marcador a um gene que está controlando esta característica. Conforme GERBENS et al. (1998), o marcador SO001 está dentro do íntron 2 do gene da *A-FABP* (Proteína de Ligação dos Ácidos Graxos nos Adipócitos), sendo que o mesmo é responsável pela expressão de uma proteína cuja função é o transporte de ácidos graxos da membrana celular até sítios de oxidação e síntese (VEERKAMP e MAATMAN, 1995). No entanto, o gene já foi seqüenciado nesta população e não foi encontrada diferença na seqüência dos nucleotídeos da região codificadora nos animais fundadores, indicando que o gene de *A-FABP* não está controlando esta característica e sim outro gene fortemente ligado a ele.

Nesta mesma região, WALLING et al. (1998) encontraram um QTL com efeito significativo no cromossomo 4 do desmame aos 80 kg em uma população F2 obtida do cruzamento entre suínos Large White e a Chinesa Meishan.

Já o QTL encontrado na posição 99 cM está próximo a vários genes já estudados (BLASKOVA et al., 2000; STRATIL, et al., 2000) como o *EAL* (antígeno do eritrócito L), *AMPD1* (Adenosina Monofosfato Deaminase 1), *NGFβ* (Fator β de crescimento de tecido nervoso) e *TSHβ* (Hormônio β estimulador da tireóide). Provavelmente, algum destes genes possa também estar influenciando P21 na população utilizada no presente estudo. ANDERSSON et al. (1994), em seu trabalho pioneiro de mapeamento de QTL, encontraram um QTL para taxa de crescimento, porém do período de nascimento aos 70 kg, próximo a posição 90 cM. Resultados semelhantes foram obtidos WALLING et al. (1998), que também encontraram um QTL significativo ($P < 0,05$) para taxa de crescimento, no período do desmame ao abate, no cromossomo 4 na posição 108 cM.

Para o QTL encontrado para P21, o intervalo de confiança, porém, foi grande, entre 38 e 101 cM. A determinação do intervalo de confiança (intervalo onde há maior probabilidade do QTL estar posicionado) pode ser obtida pelo método de reamostragem “bootstrap” (VISSCHER et al., 1996), facilmente utilizado em conjunto com mapeamento por intervalo baseado em regressão. Os autores afirmaram que quanto maior a evidência de um QTL estar presente em uma determinada região, menor é o intervalo de confiança. O grande intervalo de confiança para o QTL encontrado pode ser devido a presença de dois QTL e não apenas um, o que pode ser observado pela presença de dois picos bens distintos associados a esta característica.

A característica peso aos 42 dias de idade (P42) apresentou um valor máximo de F igual a 2,69, indicando não haver QTL para esta característica neste cromossomo (Tabela 4 e figura 1). Nota-se que o QTL encontrado para P21 não está influenciando P42, indicando que diferentes genes podem estar sendo expressos em diferentes idades, ou seja, há dependência do estado fisiológico do animal.

Observa-se, na Tabela 4 e na Figura 2, que as características peso aos 63 (P63) e 77 (P77) dias de idade apresentam picos baixos, com os valores máximos de F iguais a 2,26 e 3,74 posicionados a 125 e 70 cM, respectivamente, não indicando, desta forma, a presença de QTL significativos ou sugestivos para estas características. Para peso aos 105 dias (P105), o valor de F foi igual a 4,52 na posição 90 cM, portanto abaixo do nível para sugestivo. Este pico está em uma região cromossômica pouco saturada por marcadores, porém próximo a região em que foi encontrado um dos QTL para P21. Provavelmente, esta região contém genes que atuam no crescimento dos suínos em diferentes idades. Contudo, uma maior saturação da região com outros marcadores faz-se necessária para se confirmar a presença de QTL.

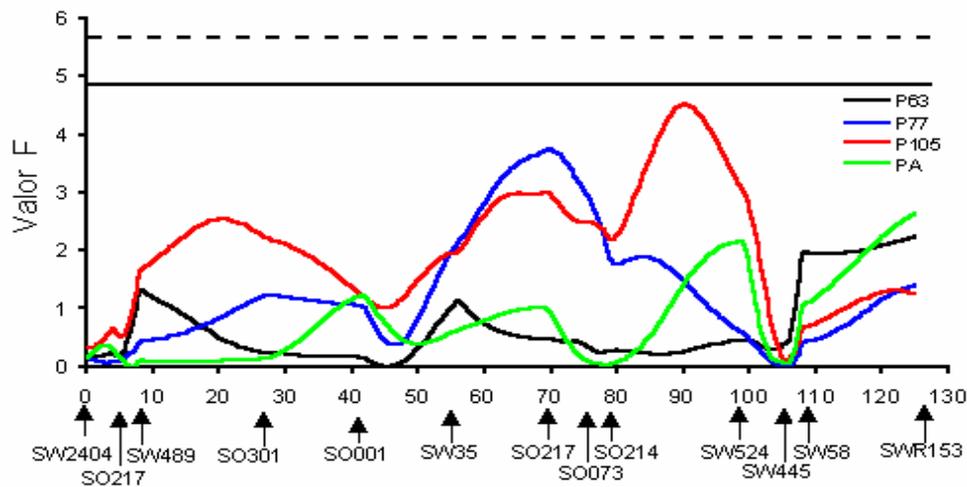


Figura 2 – Estimativas dos valores de F para as características peso aos 63, 77 e 105 dias de idade (P63, P77 e P105) e peso ao abate (PA). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha contínua) e QTL sugestivo (10% = linha tracejada).

Para peso ao abate (PA), o valor de F também foi baixo, igual a 2,64, na posição 125 cM, indicando a ausência de QTL para esta característica neste cromossomo (Tabela 4 e Figura 2). GELDERMANN et al. (2003), ao utilizarem 129 marcadores microssatélites espalhados por todo o genoma suíno, encontraram, porém, um QTL significativo $P(<0,05)$ no cromossomo 4, na posição 71 cM, que explicava 5,1% da variação fenotípica para PA em animais oriundos do cruzamento entre suínos da

raça chinesa Meishan e Piétrain. VARONA et al. (2002), ao estudarem características de carcaça e crescimento em animais obtidos do cruzamento entre suínos Ibéricos e Landrace, encontraram um QTL para peso ao abate aos 100 kg no cromossomo 4, na posição 92 cM. A ausência de QTL neste estudo pode ser devido aos animais fundadores na população estudada em que os alelos não estão segregando.

Observa-se, na Tabela 3 e na Figura 3, que a característica conversão alimentar (CA) apresentou valor máximo de F igual a 4,38, na posição 10 cM, abaixo do nível para QTL sugestivo, evidenciando assim, a ausência de QTL para esta característica neste cromossomo. Aparece também outro pico a 90 cM com F igual a 3,87, portanto abaixo do nível para um QTL sugestivo. As regiões em que estes dois picos aparecem correspondem, entretanto, a regiões pouco saturadas, necessitando, assim, de outros marcadores para a comprovação da existência de um QTL. GELDERMANN et al. (2003) encontraram, no entanto, um QTL para conversão alimentar no cromossomo 4, na posição 76 cM, em animais obtidos do cruzamento entre porco selvagem Europeu (javali) e Piétrain.

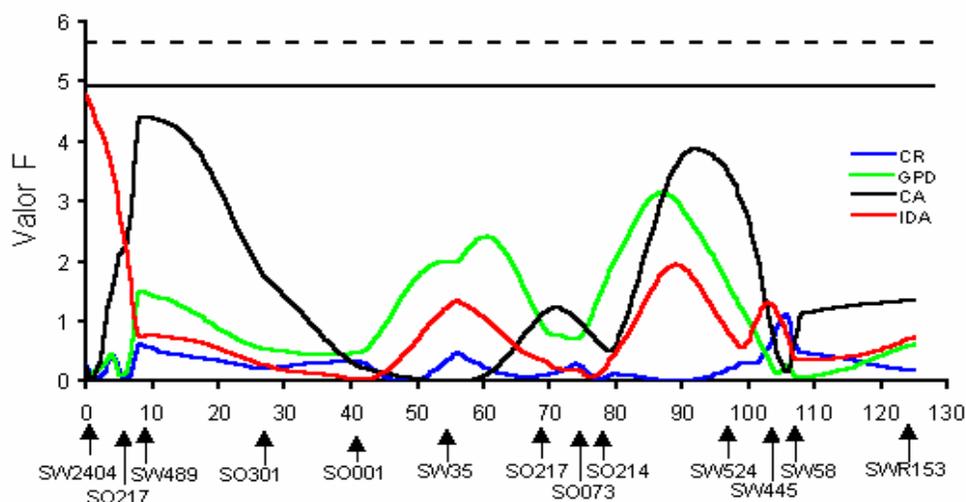


Figura 3 – Estimativas dos valores de F para as características consumo de ração (CR), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA) e idade ao abate (IDA). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha contínua) e QTL sugestivo (10% = linha tracejada).

O valor máximo de F para consumo de ração (CR) foi igual a 1,09, valor este bem pequeno, indicando não haver a presença de um QTL influenciando esta característica (Tabela 4 e Figura 3). ROHRER (2000) encontrou QTL para consumo médio de ração, porém nos cromossomos 1 (119 cM) e 5 (71 cM). PIRES (2003), estudando esta mesma população, encontrou um QTL significativo ($P < 0,05$), porém no cromossomo 6.

Para a característica ganho de peso diário (GPD), foi verificado valor máximo de F igual a 3,16, na posição 87 cM, indicando a ausência de QTL (Tabela 4 e Figura 3). Nota-se que, mesmo abaixo do nível sugestivo, este pico está na mesma região onde se encontra o segundo pico para CA (90 cM), indicando que se houvesse um QTL para CA nesta região ele também poderia estar influenciando GPD. Isto mostra que, quanto maior a eficiência alimentar melhor seria o ganho de peso diário. WALLING et al. (2000) ao estudarem várias populações de suínos encontraram um QTL no cromossomo 4 para GPD na posição 60 cM em uma população sueca e um QTL na posição 99 cM em uma população alemã. Na posição próximo a 60 cM, resultados semelhantes foram obtidos por BIDANEL et al. (2001), que estudando vários cruzamentos entre Piétrain, porco selvagem europeu (javali) e Meishan encontraram vários QTL para ganho de peso médio da décima a vigésima segunda semana em vários cromossomos, inclusive um significativo no cromossomo 4 na posição 69 cM. Resultados semelhantes foram encontrados por GELDERMANN et al. (2003) que encontraram um QTL para ganho de peso no cromossomo 4 na posição 60 cM em uma população obtida entre animais da raça Chinesa Meishan e Piétrain. Já na região próxima a 90 cM, ANDERSSON et al. (1994) verificaram a presença de um QTL para características de crescimento no cromossomo 4. O mesmo foi obtido por MALEK et al. (2001) que encontraram um QTL significativo ($P < 0,05$) na região a 97 cM para GPD do desmame até ao abate. Nesta região estão localizados vários genes já descritos acima (*EAL*, *AMPD1*, *NGFB* e *TSHB*), como também o gene *FAT1* que está envolvido, principalmente, na composição de ácidos graxos no tecido adiposo (MARKLUND et al., 1999). Algum destes genes podem estar afetando, mesmo que em pequena magnitude, esta característica.

O valor de F para a característica idade ao abate (IDA) apresentou-se abaixo do nível de 10% de significância, com valor máximo igual 4,78 na posição 0 cM, indicando que não foi verificado QTL para IDA no cromossomo 4 nesta população (Tabela 4 e Figura 3). Não foi verificado nenhum trabalho na literatura consultada em que essa característica foi avaliada.

4. CONCLUSÕES

Para a característica peso aos 21 dias (P21), foram encontrados dois QTL significativos ($P < 0,05$), um na posição 45 e outro a 99 cM.

Para número de tetas (NT) foi encontrado um QTL sugestivo ($P < 0,10$) localizado a 73 cM no cromossomo 4 de suínos.

Para as outras características não foram observados QTL, porém apesar dos marcadores estarem dispostos a um intervalo médio de 10,7 cM, devem ser incluídos outros marcadores com o objetivo de saturar e melhor avaliar todas as regiões ao longo do cromossomo 4 de suínos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L., HALEY, C.S., ELLEGREN, H., KONTT, S.A. JOHANSSON, M. K. ANDERSSON, K., ANDERSSON-EKLUND, L., EDFORS-LILJA, I., FREDHOLM, M., HANSSON, I., HAKANSSON, J., LUNDSTRÖM, K. 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, v.263, p.1771-1774.
- BIDANEL, J.P., MILAN, D., IANNUCELLI, N., AMIGUES, Y., BOSCHER, M.Y., BOURGEOIS, F., CARITEZ, J.C., GRUAND, J., LE ROY, P., LAGANT, H., QUINTANILLA, R., RENARD C., GELLIN, J., OLLIVIER, L., CHEVALET, C.: Detection of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Genetic Selection Evolution*, v.33, p.289–309. 2001.
- BLAZKOVA P, KOPECNY, M., FONTANESI, L., STRATIL, A., DAVOLI, R., et al.: Linkage assignments of the porcine *ATP1A2*, *ATP1B1* V-*ATPase* (CGI-11) genes to chromosome 4. *Anim Genet* 31, 416–418. 2000.
- BOX, G. E. P., COX, D. R.: An Analysis of Transformations, *Journal of the Royal Statistical Society*, 211-243, discussion 244-252. 1964.
- CASSANDY, P.J., JOHNSON, R.K., POMP, D., ROHRER, G.A., VAN VLECK, L.D., SPIEGEL, E.K., GILSON, K.M.: Identification of quantitative trait loci affecting reproduction in pigs. *J. Anim. Sci.* 79. 623-633. 2001.
- CHURCHILL, G.A., DOERGE, R.W.: Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963-971, 1994.
- DEKKERS, J. C. M., HOSPITAL, F.: The use of molecular genetics in improvement of agricultural populations. *Nat. Rev. Genet.* v.3, p.22–32, 2002.

- GELDERMANN, H., MULLER, E., MOSER, G., REINER, G., ARTENSCHLAGER, S., CEPICA, S., STRATIL, A., KURL, J., MORAN, C., DAVOLI, R., BRUNSCH, C.: Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Piétrain, Meishan and Wild Boar crosses. *J. Anim. Breed. Genet*, v.120, p.363-393, 2003.
- GERBENS, F., JANSEN, A., VAN ERP, A.J., HARDERS, F., MEUWISSEN, T.H., RETTENBERGER, G., VEERKAMP, J.H., TE PAS, M.F.: The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mamm Genome*, 1998, 9:1022-6.
- HALEY, C.S., KNOTT, S.A., ELSEN, J.M.: Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics*, v.36, p.1195-1207, 1994.
- HIROOKA, H., de KONING, D.J., HARLIZIUS, B., van ARENDONK, J.A.M., RATTINK, A.P., GROENEN, M.A.M., BRASCAMP, E.W., BOVENHUIS, H.: A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs. *Journal of Animal Science*, v.79, p.2320-2326. 2001.
- MALEK, M., DEKKERS, C.M.J., LEE, H.K., BAAS, T.J., ROTHSCCHILD, M.F.: A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian Genome*, v.12, p.630-636. 2001.
- MARKLUND, L., NYSTROM, P.E., STREN, S., ANDERSSON-EKLUND, ANDERSSON, L.: Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity*, v.82, p.134-141. 1999.
- PIRES, A. V.: Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 6 de suínos. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento. Universidade Federal de Viçosa, 75 p, 2003.

- PUMFREY, R. A., JOHNSON, R. K., CUNNINGHAM, P. J., and ZIMMERMAN, D. R.: Inheritance of teat number and its relationship to maternal traits in swine. *J. Anim. Sci.* 50. 1057–1060. 1980.
- QUINTANILLA, R., MILAN, D., BIDANEL, J. P.: A further look at quantitative trait loci affecting growth and fatness in a cross between meishan and Large White pig. *Genet. Sel. Evol.*, v.34, p. 193-210, 2002.
- ROHRER, G.A.: Identification of quantitative trait loci affecting birth characters and accumulation of back fat and weight in Meishan-White Composit resource population. *Journal of Animal Science*, v.78, p.2547– 2553, 2000.
- ROTHSCHILD, M.F.: U.S. Pig gene mapping coordination program. Disponível em: <<http://www.genome.iastate.edu/pig>>. Acessado em: 20 de janeiro de 2003.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. SAS/STAT® user's guide: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.
- SEATON, G., HALEY, C. S., KNOTT, S. A., KEARSEY, M., VISSCHER, P. M.: QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics*, v.18, n.2, p.339-340, 2002. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>. Acessado entre 03 e 15 de junho de 2005.
- STRATIL, A., KNOLL, A., MOSER, G., KOPEČNY, M., GELDERMANN, H.: The porcine adenosine monophosphate deaminase 1 (*AMPD1*) gene maps to chromosome 4. *Anim. Genet.* 31: 147–148. 2000.
- VARONA, L., OVILO, C., CLOP, A., NOGUEIRA, J.L., PEREZ-ENCISO, M., COLL, A., FOLCH, J.M., BARRAGAN, C., TORO, M.A., BABOT, D., SANCHEZ, A.: QTL mapping for growth and traits in a Iberian by landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic effects. *Genet. Res. Camb.* 80. 145-154. 2002.

- VEEKAMP, J. H., MAATAMAN, R. G. H. J.: Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes. *Progr. Lipid. Res.* 34, 17-52, 1995.
- VISSCHER, P.M. THOMPSON, R., HALEY, C.S.: Confidence intervals in QTL mapping by bootstrapping. *Genetics*, v.143, n.2, p.1013-1020. 1996.
- WADA, Y., AKITA, T., FURUKAWA, T., HISAMATSU, N., ITO, Y., KOBAYASHI, E., KOMATSU, M., KUSUMOTO, H., MIKAMI, H., MIKAWA, S., MINEZAWA, M., MIYAKE, M., SHIMANUKI, S., SUGIYAMA, T., UCHIDA, Y., YANAI, S., and YAUE, H.: Quantitative trait loci (QTL) analysis in a Meishen × Goettingen cross population. In: *Proc. 6th World Cong. Genet. Appl. To Livest. Prod., Armidale, Australia* 26:320–323. 1998.
- WALLING G. A., ARCHIBALD, A. L., CATTERMOLE, J. A., DOWNING, A. C., FINLAYSON., H. A., NICHOLSON, D., VISSCHER, P. M., WALKER, C. A., HALET, C. S.: Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. *animal genetics*, v. 29, p. 415-424, 1998.
- WALLING, G.A., VISSCHER, P.M., ANDERSSON, L., ROTHCHILD, M.F., WANG, L., MOSER, G., GROENEN, M.A.M., BIDANEL, J.P., CEPICA, S., ARCHIBALD, A.L., GELDERMANN, H., De KONING, D.J., MILAN, D., HALEY, C.S.: Combined analyses of data from quantitative trait loci mapping studies: chromosome 4 effects on porcine growth and fatness. *Genetics*, v.155, p.1369–1378, 2000.
- WANG L., YU, T.P., TUGGLE, C.K., LIU, H.-C., ROTSCCHILD, M.F.: A direct search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *Journal of Animal Science*, v.76, p.2560-2567. 1998.

CAPÍTULO 3

Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 (SSC4) de uma população F2 de suínos: II - Características de carcaça, cortes de carcaça, órgãos e vísceras.

RESUMO. O objetivo ao realizar este trabalho foi o mapeamento de QTL no cromossomo 4 de suínos (SSC4) e a associação destes a diversas características de carcaça, cortes de carcaça, órgãos e vísceras. Para isto, foi desenvolvida uma população F2 com 800 animais a partir do intercruzamento da geração F1, obtida do acasalamento divergente entre machos da raça naturalizada brasileira Piau e 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White X Piétrain) e genotipada para 13 marcadores tipo microsatélites. As características de carcaça, cortes de carcaça, órgãos e vísceras avaliadas na população F2 foram: comprimento de carcaça pelos métodos brasileiro e americano, peso e rendimento de carcaça; espessura de toucinho nas regiões: da copa, após a última costela, entre a última e a penúltima vértebra lombar, acima da última vértebra lombar e imediatamente após a última costela (a 6,5 cm da linha dorso-lombar), espessura de bacon, profundidade de lombo, área de olho de lombo, pesos de órgãos internos (coração, pulmões, fígado, baço e rins), comprimento de intestino, peso total do pernil, peso do pernil sem pele e sem capa de gordura, peso total da copa, peso da copa sem pele e sem capa de gordura, peso total da paleta, peso da paleta sem pele e sem capa de gordura, peso total do carré, peso do lombo, peso total do bacon, peso das costelas, peso total da papada, peso do filezinho e peso da banha rama. Foi utilizado o método de regressão por intervalo de mapeamento e as análises foram realizadas por meio do programa QTL EXPRESS. Foram constatados um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para comprimento de intestino na posição 75 cM, dois QTL significativos ($P < 0,05$), sendo um para peso de coração na posição 79 cM e o outro para peso de pulmão na posição 69 cM, e um QTL significativo ($P < 0,01$) para espessura de bacon na posição 69 cM. Para as características de corte foram identificados três QTL sugestivos ($P < 0,10$), sendo um para

peso de pernil limpo na posição 95 cM, um para peso de paleta limpa na posição 95 cM e um para peso de costela na posição 7 cM.

CHAPTER 3

Mapping Quantitative Trait Loci on chromosome 4 (SSC4) in a F2 pig population: II – carcass, carcass cuts, organs and viscera traits.

ABSTRACT. The objective of this work was mapping QTL on porcine chromosome 4 (SSC4), and associate them to carcass and carcass cuts traits. For this, a F2 pig population with 800 animals was established from a cross of the F1 generation, produced by crossing using two naturalized Brazilian Piau sires and 18 commercial dams (Landrace x Large White X Piétrain). The population was genotyped for 13 microsatellite markers. The carcass traits were evaluated: carcass length for the Brazilian and American classification methods, carcass weigh, carcass yield, backfat thickness at last 2nd - 3rd thoracic vertebrae, after the last rib, between last 1st - 2nd lombar vertebrae, after last lombar vertebrae and after the last rib (at 6,5 cm from the midline); bacon depth, loin depth, loin eye area, internal organs weight (heart, lungs, liver, spleen and kidneys) and intestine length; the carcass cuts traits were evaluated: total ham weight, skinless and fatless ham weight, total boston shoulder weight, skinless and fatless boston shoulder weight, total picnic shoulder weight, skinless and fatless picnic shoulder weight, loin (bone-in) weight, loin weight, bacon weight, ribs weight, double chin weight, sirloin weight and fat weight. Data were analyzed by multiple regressions developed for analysis of outbred lines crosses, using QTL EXPRESS software. To carcass traits was found one suggestive QTL ($P < 0,10$) for intestine length located about 75 cM, two significant QTL ($P < 0,05$), one for weight of heart located about 79 cM and another for weight of lung located about 69 cm and one significant QTL ($P < 0,01$) for bacon depth locate about 69 cM. To carcass cuts traits were identified three suggestive QTL ($P < 0,10$), one for skinless and fatless ham weight located about 95 cM, one for skinless and fatless picnic shoulder weight located about 95 cM and one for ribs weight located about 7 cM.

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do genoma e o estabelecimento de mapas genéticos são fundamentais para isolar e caracterizar os genes de interesse. Para isto, os mapas de ligação e físico do genoma suíno se desenvolveram consideravelmente (ROTHSCHILD e PLASTOW, 1999) e têm sido explorados em busca de genes que influenciam características comercialmente importantes.

O mapeamento de regiões que influenciam características de interesse econômico utiliza marcadores genéticos espalhados por todo o genoma do animal. Para tal, é necessário estabelecer uma população com delineamento para este fim, como o cruzamento entre duas linhagens divergentes para a característica em estudo. Com a utilização de métodos estatísticos adequados, é possível identificar estas regiões, bem como estimar sua posição e o efeito sobre a característica. Além disso, os pesquisadores não têm medido esforços na procura de genes individuais para características de carcaça, como espessura de toucinho, área de olho de lombo, bem como para as características de qualidade.

Conforme KLONT et al. (2001), a produção de carne tem sido um negócio baseado em *commodities*. As características de quantidade de carne costumavam impulsionar o principal valor econômico de diferentes cadeias de produção de carne devido os meios relativamente fáceis para medir o peso da carcaça e a porcentagem/rendimento de carne magra após o abate. Neste contexto, a identificação de regiões do genoma que controlam essas características seria de grande interesse para indústria suinícola. Uma vez encontrados e validados os genes e marcadores, essas informações poderão ser utilizadas em conjunto aos métodos tradicionais por meio da seleção assistida por marcadores (MAS), para melhorar a eficiência dos programas de melhoramento.

Muitos estudos têm sido voltados para a busca de QTL afetando características de carcaça em suínos, sendo que a maioria deles tem encontrado QTL com efeitos significativos e sugestivos na variação fenotípica das características quantitativas. Poucos, porém, têm utilizado informações referentes aos rendimentos de cortes da carcaça.

O objetivo ao realizar este trabalho foi mapear QTL associados a características de carcaça, cortes de carcaça, órgãos e vísceras, no cromossomo 4 de suínos, a partir de uma população F2, obtida por cruzamento divergente.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção dos dados e delineamento utilizado

A fase de campo deste experimento foi conduzida na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001.

Foi utilizado o delineamento de F2 para se obter desequilíbrio de fase ligação entre os marcadores e os QTL. Para tanto, foram construídas inicialmente duas famílias provenientes do cruzamento de dois varrões (C e J) da raça naturalizada brasileira Piau com 18 fêmeas originadas de linhagem desenvolvida na UFV pelo acasalamento de animais de raça comercial (Landrace x Large White x Piétrain) selecionados para desempenho. A geração F1 nasceu entre os meses de março e maio de 1999. Dentre os machos F1 foram selecionados ao acaso 11 varrões, provenientes de diferentes leitegadas que foram cruzados (monta natural) com 54 fêmeas. Estes animais foram acasalados entre os meses de fevereiro e outubro de 2000, para a produção da geração F2, a qual nasceu entre junho de 2000 e fevereiro de 2001. Assim, foram obtidos 800 animais F2, divididos em cinco lotes:

- lote 1 = animais nascidos entre 20/06/00 a 03/07/00;
- lote 2 = animais nascidos entre 03/08/00 a 23/08/00;
- lote 3 = animais nascidos entre 16/09/00 a 01/11/00;
- lote 4 = animais nascidos entre 30/11/00 a 25/12/00;
- lote 5 = animais nascidos entre 19/01/01 a 12/02/01.

Os três primeiros lotes foram constituídos de animais nascidos de matrizes de primeira parição e os demais, de segunda parição. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade, sendo que os machos foram castrados aos 10 dias de idade. O abate dos animais foi realizado de acordo que o peso médio do lote atingia 65 kg de peso vivo e em

média 148 dias de idade. Antes do abate, os animais permaneceram em jejum de sólidos por 18 horas.

Ao abate, os animais foram submetidos à insensibilização elétrica, posicionando-se os eletrodos do insensibilizador (Sulmaq, Modelo 7654) na porção dorsal do pescoço, aplicando-se uma voltagem de 300 volts, por cerca de 5 segundos. Imediatamente após a insensibilização foi realizada a sangria pela punção do coração por meio de inserção sob a axila esquerda do animal. As carcaças foram, então, suspensas pelas patas traseiras, eventradas, evisceradas, lavadas, serradas longitudinalmente, inclusive a cabeça, e pesadas. A meia-carcaça direita de cada animal foi resfriada a uma temperatura de 4°C, por 24 horas. Após este período, foi realizada a dissecação da carcaça para se obter os dados das características de cortes.

2.2. Características avaliadas

As características em estudo foram divididas em dois grupos: 1) carcaça, órgãos e vísceras e 2) cortes de carcaça, para facilitar a descrição e posterior discussão.

Desta forma, as seguintes características foram avaliadas na meia-carcaça direita na geração F2: peso de carcaça com cabeça e pés (PCARC), rendimento de carcaça com cabeça e pés (RCARC), comprimento de carcaça pelo método brasileiro (MBCC) e pelo método americano (MLC); espessura de toucinho em mm, nas posições ETSH (maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar), ETUC (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar), ETUL (espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar), ETL (menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar) e ETO (espessura de toucinho imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar).

Na meia-carcaça resfriada, foram tomadas as medidas de PROLOM (profundidade de lombo, diâmetro do músculo *Longissimus dorsi* na região da última costela a 6,5 cm da linha dorso lombar, a partir

de um corte transversal no carré) e a área de olho-de-lombo em cm² (AOL). Esta foi medida em triplicata com auxílio de um planímetro, no decalque vegetal tomado da seção transversal do músculo *Longissimus dorsi*, na altura da última costela. Foi medida também a espessura do bacon (EBACON), imediatamente após a última costela, na altura da divisão carré-bacon e o peso de alguns órgãos internos: pulmão (PULMAO), coração (CORAC), fígado (FIGADO), baço (BACO), rim (RIM) e o comprimento total do intestino delgado (INTEST). O número de observações, médias, desvios padrão e os valores máximos e mínimos das características foram obtidas por meio do PROC MEANS do SAS (2000) (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de observações, média, desvio-padrão e valores máximos e mínimos das características de carcaça, órgãos e vísceras.

Característica	Unidade	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
PCARC	kg	531	53,709	5,358	40,330	72,960
RCARC	%	518	81,990	2,243	70,000	89,000
MBCC	cm	531	86,064	4,173	72,000	104,000
MLC	cm	531	71,709	3,874	40,000	87,500
ETSH	mm	532	40,496	5,578	20,000	59,000
ETUC	mm	532	19,889	4,825	5,000	36,000
ETUL	mm	531	28,678	6,110	14,000	54,000
ETL	mm	531	23,510	6,225	8,000	49,000
ETO	mm	531	16,951	3,835	8,000	33,000
EBACON	mm	528	25,138	6,965	5,000	53,000
PROLOM	mm	486	43,981	5,040	28,790	64,940
AOL	cm ²	494	26,281	4,059	14,530	39,700
PULMAO	kg	530	0,456	0,088	0,270	0,920
CORAC	kg	532	0,236	0,030	0,140	0,390
FIGADO	kg	526	1,267	0,155	0,840	1,820
BACO	kg	526	0,092	0,019	0,050	0,150
RIM	kg	536	0,127	0,019	0,070	0,210
INTEST	M	539	18,424	1,856	12,720	24,160

PCARC - peso da carcaça; RCARC - rendimento de carcaça com pés e cabeça; MBCC - comprimento de carcaça pelo Método Brasileiro de Classificação de Carcaça; MLC - comprimento de carcaça pelo Método Americano; ETSH - maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar; ETUC - espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar; ETUL - espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar; ETL - menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar; ETO - espessura de toucinho medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar; EBACON - espessura do bacon; PROLOM - profundidade de lombo; AOL - área de olho-de-lombo; PULMAO - peso de pulmão; CORAC - peso de coração; FIGADO - peso de fígado; BACO - peso de baço; RIM - peso de rim e INTEST - comprimento total do intestino delgado.

A meia carcaça direita foi resfriada a 4°C por 24 horas e então se procedeu a sua dissecação para se obter os dados referentes as características de cortes: peso total pernil (PP), peso do pernil limpo (PPL), peso total da copa (PCOPA), peso da copa limpa (PCOPAL), peso total da paleta (PPA), peso da paleta limpa (PPAL), peso total do carré (PC), peso do lombo (PL), peso total do bacon (PB), peso das costelas (PCOST), peso total da papada (PAPADA), peso do filezinho (PF) e peso da banha rama (PBR). O número de observações, média, desvio-padrão e os valores máximos e mínimos das características de corte foram obtidas por meio do PROC MEANS do SAS (2000) (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de observações, média, desvio padrão e valores máximos e mínimos para as características de cortes em quilos (kg).

Característica	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
PP	536	7,282	0,862	3,880	10,180
PPL	538	5,010	0,650	2,780	7,840
PCOPA	538	2,334	0,354	1,210	3,870
PCOPAL	537	1,682	0,272	0,750	2,670
PPA	538	4,865	0,642	2,560	7,070
PPAL	538	2,708	0,408	1,530	5,700
PC	538	3,487	0,533	1,740	5,880
PL	537	1,028	0,202	0,290	2,300
PB	534	2,690	0,467	1,280	4,310
PCOST	538	1,524	0,252	0,900	2,690
PAPADA	538	0,709	0,210	0,280	1,620
PF	538	0,221	0,041	0,110	0,360
PBR	538	0,460	0,167	0,130	1,230

PP - peso total do pernil; PPL - peso do pernil sem pele e sem capa de gordura; PCOPA – peso total da copa; PCOPAL - peso da copa sem pele e sem capa de gordura; PPA - peso total da paleta; PPAL - peso da paleta sem pele e sem capa de gordura; PC - peso total do carré; PL - peso do lombo; PB - peso total do bacon; PCOST - peso das costelas; PAPADA - peso total da papada; PF - peso do filezinho e PBR - peso da banha rama.

2.3. Extração de DNA

A análise genotípica foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

O DNA dos animais parentais, F1 e F2 foi extraído do sangue imediatamente após o abate. As amostras foram mantidas a 60°C por uma hora em CTAB, sendo posteriormente centrifugadas e deproteinizadas em um banho de clorofórmio seguido de centrifugação, sendo o DNA então precipitado em etanol absoluto, e guardado a -20°C para uso posterior. As soluções de DNA para uso (na concentração aproximada de 25 ng/μL) foram mantidas em geladeira a 4°C até serem amplificadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.4. Obtenção dos genótipos marcadores

Foram utilizados *primers* de microssatélites para cobrir o cromossomo quatro de suínos a um intervalo médio de 10,7 cM. A Tabela 3 apresenta os *primers* com algumas características específicas a cada um deles, como localização, fluorescência, faixa da variação de tamanho, em pares de base (pb), e número de alelos.

Tabela 3 – *Primers* utilizados na varredura do cromossomo 4.

Marcador	Posição (cM) ¹	Fluorescência	Temp ²	Mínimo alelo (pb)	Máximo alelo (pb)	Número de alelos
SW2404	0,0	TET	62°C	150	166	5
S0227	4,1	HEX	60°C	227	251	3
SW489	8,0	HEX	55°C	159	171	3
S0301	27,1	FAM	58°C	253	259	3
S0001	41,8	HEX	50°C	183	189	3
SW35	55,9	HEX	58°C	135	143	4
S0217	69,6	FAM	62°C	141	151	3
S0073	74,4	HEX	55°C	103	119	6
SO214	79,3	HEX	58°C	128	142	5
SW524	99,3	TET	62°C	176	196	2
SW445	105,8	FAM	58°C	187	207	10
SW58	107,9	TET	58°C	210	220	4
SWR153	125,6	FAM	58°C	217	233	4

¹ segundo ROTHSCILD (2003); ² temperatura de anelamento.

Para as ampliações, foram utilizados aparelhos termocicladores *MJ Research, Inc.* modelo *PTC-100 (Watertown, USA)* sendo os sistemas constituídos de Taq polimerase 1 U, dNTPs 0,2 mM, *primers forward* e *reverse* 0,2 μM cada, Tris-HCl pH 8,3 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 a 4

mM, de acordo com cada *primer*, e DNA genômico 25 ng por reação. O volume final da reação foi de 20µL. Os programas de amplificação variaram para cada par de *primer* constituindo-se basicamente dos seguintes passos:

- 6- Desnaturação inicial = 94°C/3 min.;
- 7- Desnaturação = 94°C/1min.;
- 8- Anelamento do *primer* = a temperatura variou para cada par de *primer*;
- 9- Polimerização = 72°C/1 min.; (repetindo-se os passos 2, 3, e 4 por 25 a 35 vezes, de acordo com o *primer*);
- 10-Polimerização final = 72°C/20 min.

AS amplificações dos fragmentos dos marcadores foram observadas em gel de poliacrilamida a 5%, onde foram aplicados 5 µL de cada reação. Após a corrida em cuba de eletroforese foi realizada a coloração com nitrato de prata. Confirmadas as amplificações os produtos foram congelados a -20°C.

As amostras foram submetidas à análise de fragmentos, para o escoreamento das bandas e detecção de polimorfismo entre elas. Estas análises foram feitas por meio de sequenciador automático ABI PRISM 310, do Laboratório de Biotecnologia Animal, no Departamento de Zootecnia da UFV. O escoreamento dos fragmentos amplificados foi feito utilizando o “software” GenScan.

2.5. Análises estatísticas

Foram utilizadas as distâncias de consenso do mapa de ligação suíno (ROTHSCHILD, 2003). Todos os animais, incluindo parentais, F1 e F2, foram genotipados.

Antes de serem submetidos a análises estatísticas para avaliar a existência de QTL, os valores para as características de carcaça e cortes foram testados previamente no SAS (2000) para verificar a normalidade na distribuição dos dados. As características que não tinham distribuição

normal foram normalizadas por procedimentos estatísticos, sendo que foi utilizado o BoxCox (BOX e COX, 1964) (Tabela 4 e 5).

O mapa de ligação contendo as distâncias entre os marcadores, os genótipos para os diversos marcadores nos animais analisados e os dados fenotípicos foram submetidos ao programa QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002) (<http://www.qtl.cap.ed.ac.uk>).

Tabela 4 – Procedimentos estatísticos de normalização para os valores de carcaça, órgãos e vísceras.

Característica	Distribuição
PCARC	Normalizada por BoxCox
RCARC	Normalizada por BoxCox
MBCC	Normal
MLC	Normalizada por BoxCox
ETSH	Normal
ETUC	Normalizada por BoxCox
ETUL	Normalizada por BoxCox
ETL	Normalizada por BoxCox
ETO	Normalizada por BoxCox
EBACON	Normal
PROLOM	Normal
AOL	Normal
PULMAO	Normalizada por BoxCox
CORAC	Normal
FIGADO	Normalizada por BoxCox
BACO	Normal
RIM	Normalizada por BoxCox
INTEST	Normal

PCARC - peso da carcaça; RCARC - rendimento de carcaça com pés e cabeça; MBCC - comprimento de carcaça pelo Método Brasileiro de Classificação de Carcaça; MLC - comprimento de carcaça pelo Método Americano; ETSH - maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar; ETUC - espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar; ETUL - espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar; ETL - menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar; ETO - espessura de toucinho medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar; EBACON - espessura do bacon; PROLOM - profundidade de lombo; AOL - área de olho de lombo; PULMAO - peso de pulmão; CORAC - peso de coração; FIGADO - peso de fígado; BACO - peso de baço; RIM - peso de rim e INTEST - comprimento total do intestino delgado.

O programa QTL EXPRESS mapeia os QTL existentes por meio de regressão linear (HALEY et al., 1994), com dois procedimentos sucessivos: primeiramente são obtidas as probabilidades de identidade por descendência (IBD) para locos cromossômicos específicos, utilizando dados dos vários marcadores. Em um segundo passo é empregado um

modelo estatístico para as observações e os coeficientes de IBD. De acordo com SEATON et al. (2002), o programa QTL EXPRESS é adequado para processar dados gerados em populações F2 obtidas a partir de linhagens não endogâmicas, pois aplica um modelo linear aos dados fenotípicos, com efeitos fixos adicionais e covariáveis que expliquem variações para a característica avaliada. Os QTL podem ser especificados em termos de efeitos aditivos e dominantes. O programa possibilita ainda que um ou mais QTL mapeados em um cromossomo sejam utilizados como co-fatores no modelo, possibilitando que um QTL de pequeno efeito seja detectado.

Tabela 5 – Procedimentos estatísticos de normalização para os valores de cortes.

Característica	Distribuição
PP	Normalizada por Log ₁₀
PPL	Normalizada por Log ₁₀
PCOPA	Normalizada por Log ₁₀
PCOPAL	Normalizada por Rad
PPA	Normalizada por Log ₁₀
PPAL	Normalizada por BoxCox
PC	Normalizada por Rad
PL	Normalizada por BoxCox
PB	Normalizada por BoxCox
PCOST	Normal
PAPADA	Normalizada por BoxCox
PF	Normalizada por BoxCox
PBR	Normalizada por BoxCox

PP - peso total do pernil; PPL - peso do pernil sem pele e sem capa de gordura; PCOPA – peso total da copa; PCOPAL - peso da copa sem pele e sem capa de gordura; PPA - peso total da paleta; PPAL - peso da paleta sem pele e sem capa de gordura; PC - peso total do carré; PL - peso do lombo; PB - peso total do bacon; PCOST - peso das costelas; PAPADA - peso total da papada; PF - peso do filezinho e PBR - peso da banha rama.

No modelo estatístico assume-se que o QTL é dialélico, com alelos alternativos fixados em cada raça parental (HALEY et al., 1994). Considerou-se o genótipo QQ para o genótipo Comercial, com efeito a, qq para o genótipo Nativo, com efeito –a, e Qq para o F1, com efeito d. A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada conforme os marcadores, a intervalos de 1 cM ao longo do cromossomo. Estas probabilidades são usadas para se

fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL em estudo, para cada animal.

Os valores da razão de verossimilhança (F) foram plotados e os pontos com os maiores valores mostram a posição do provável QTL. Os níveis de significância ($\alpha=0,10, 0,05$ ou $0,01$) “cromossome-wide” foram obtidos pelo teste de permutação (CHURCHILL e DOERGE, 1994), para um total de 10.000 permutações, para cada característica. Os dados foram obtidos para o teste de permutação pelo “software” QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002).

Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijk} = S_i + L_j + (C_{ijk} - \bar{C})b + c_a a + c_d d + e_{ijk}$$

em que:

y_{ijk} = é o fenótipo;

S_i = é o efeito fixo do sexo i , $i = 1, 2$;

L_j = é o efeito fixo do lote j , $j = 1, 2, 3, 4, 5$;

$(C_{ijk} - \bar{C})b$ = ajustamento para as covariáveis (peso de carcaça para as características de carcaça; e peso da banda direita resfriada para as características de cortes);

Os valores c_a e c_d são funções das probabilidades condicionais do QTL dado o genótipo dos marcadores e são calculados da seguinte maneira:

$$c_a = P(QQ / Mi) - P(qq / Mi)$$

$$c_d = P(Qq / Mi)$$

em que:

$P(QQ)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem homozigotos com origem Comercial;

$P(qq)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem homozigotos com origem da raça Naturalizada;

$P(Qq)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem heterozigotos.

O modelo anterior foi utilizado para estimar a regressão do fenótipo nos coeficientes c_a e c_d , variando a posição do QTL a cada cM. Para cada posição, era calculada uma razão de verossimilhança (F), comparando o modelo que considera a presença do QTL (modelo completo) ao modelo sem o QTL (modelo reduzido).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características de carcaça

Na Tabela 6 é apresentado o resumo dos valores de razão de verossimilhança (F) máximas, as posições (cM) para os prováveis QTL e as estimativas dos efeitos aditivos e de dominância, com os respectivos erros padrão, para as características de carcaça, órgãos e vísceras.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 são apresentadas as distribuições dos valores de razão de verossimilhança (F), ao longo do cromossomo, em que os picos das curvas indicam as posições, em cM, onde os prováveis QTL estão localizados.

Na Tabela 6 e Figura 1 observa-se que não foi detectado QTL para PCARC e RCARC no cromossomo 4. O valor máximo de F para PCARC foi igual a 3,36 na posição 8 cM. Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, ANDERSSON-EKLUNK et al. (1998), ao estudarem uma população obtida do cruzamento entre porco selvagem europeu (javali) e Large White, encontraram um QTL sugestivo ($P < 0,10$) no cromossomo 4 para PCARC. Já MALEK et al. (2001), ao estudarem uma população obtida do cruzamento entre suínos da raça Berkshire e Yorkshire, encontraram um QTL significativo ($P < 0,05$) sobre PCARC na posição 123 cM no cromossomo 4. Resultado semelhante foi obtido por VARONA et al. (2002) que, ao estudarem características de carcaça em uma população obtida do cruzamento entre suíno Ibérico e Landrace, encontraram um QTL significativo ($P < 0,05$) para PCARC na posição 89 cM. Nesta região está localizado o gene *FAT1*, descrito por ANDERSONN et al. (1994), e o gene *DERC* (2,4-dienoyl-CoA-redutase), descrito por CLOP et al. (2002). Esses dois locos podem estar atuando no PCARC na população utilizada no presente estudo.

Para RCARC, o valor máximo de F foi de 4,82 na posição 22 cM e 4,53 na posição 92 cM, portanto abaixo do nível para QTL sugestivos. O segundo pico aparece na mesma região dos dois genes acima citados. Porém, essas regiões possuem baixa saturação, necessitando assim de outros marcadores para melhor avaliação dos efeitos desses genes.

Tabela 6 – Resumo dos valores de verossimilhança (F) máximas, suas posições (cM) para os QTL e as respectivas estimativas dos efeitos aditivos e de dominância.

Característica	Posição	F _{máx}	Aditivo (\pm EP) ¹	Dominância (\pm EP) ¹
PCARC	8cM	3,36	-1,0E-4 \pm 9,4E-5	3,0E-4 \pm 1,49E-4
RCARC	22cM	4,82	0,003 \pm 0,002	0,008 \pm 0,003
MBCC	27cM	3,64	-0,468 \pm 0,257	-0,719 \pm 0,4169
MLC	82cM	1,96	-4549,68 \pm 8853,04	-29509,760 \pm 16911,97
ETSH	0cM	4,50	-0,969 \pm 0,329	0,274 \pm 0,542
ETUC	92cM	1,92	0,095 \pm 0,128	-0,442 \pm 0,227
ETUL	0cM	3,73	-0,139 \pm 0,053	-0,062 \pm 0,087
ETL	25cM	4,21	0,197 \pm 0,086	0,220 \pm 0,145
ETO	94cM	3,80	0,067 \pm 0,027	-0,081 \pm 0,045
EBACON	69cM	9,27*	1,726 \pm 0,439	0,804 \pm 0,761
PROLOM	101cM	4,66	-3,285 \pm 1,105	1,779 \pm 1,707
AOL	102cM	4,00	-1,858 \pm 0,687	1,098 \pm 1,118
PULMAO	69cM	6,16†	-0,002 \pm 5,7E-4	-6,0E-4 \pm 9,87E-4
CORAC	79cM	7,45†	-0,007 \pm 0,002	-0,005 \pm 0,004
FIGADO	112cM	2,57	0,004 \pm 0,004	0,012 \pm 0,006
BACO	99cM	4,32	-0,002 \pm 0,001	0,005 \pm 0,002
RIM	97cM	3,93	-7,0E-4 \pm 4,61E-4	0,002 \pm 7,44E-4
INTEST	75cM	5,33+	-0,414 \pm 0,135	-0,134 \pm 0,215

* significativo a 1%; † significativo a 5%; + sugestivo a 10%; ¹ desvio-padrão.

PCARC - peso da carcaça; RCARC - rendimento de carcaça com pés e cabeça; MBCC - comprimento de carcaça pelo Método Brasileiro de Classificação de Carcaça; MLC - comprimento de carcaça pelo Método Americano; ETSH - maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar; ETUC - espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar; ETUL - espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar; ETL - menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar; ETO - espessura de toucinho medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar; EBACON - espessura do bacon; PROFLOMB - profundidade de lombo; AOL - área de olho de lombo; PULMAO - peso de pulmão; CORAC - peso de coração; FIGADO - peso de fígado; BACO - peso de baço; RIM - peso de rim e INTEST - comprimento total do intestino delgado.

Como se pode observar na Tabela 6 e na Figura 1, não foi detectado QTL para comprimento de carcaça pelo Método Brasileiro de Classificação de Carcaça (MBCC), como também não foi detectado para comprimento de carcaça pelo Método Americano (MLC). Os valores máximos de F foram, respectivamente, 3,64 (27 cM) e 1,96 (82 cM). EVANS et al. (2003), ao estudarem uma população comercial, não encontraram QTL para comprimento de carcaça no cromossomo 4.

ROHRER e KEELE (1998), ao estudarem uma população obtida do cruzamento entre animais da raça chinesa Meishan e Large White, encontraram, no entanto, um QTL significativo para comprimento de carcaça no cromossomo 4 na posição 67 cM. O mesmo foi obtido por CEPICA et al. (2003) que, ao estudarem vários cruzamentos, encontraram um QTL a 1% de significância na posição 72 cM no cromossomo 4 em uma população obtida do cruzamento entre animais da raça chinesa Meishan e Piétrain. A região do cromossomo onde foi identificado este QTL estão presentes os genes *V-ATPase*, *ATP1B1* e *ATP1A2*, que codificam diferentes subunidades da enzima ATPase. Provavelmente, os alelos que possuem algum efeito sobre comprimento de carcaça não estão atuando na população usada no presente estudo.

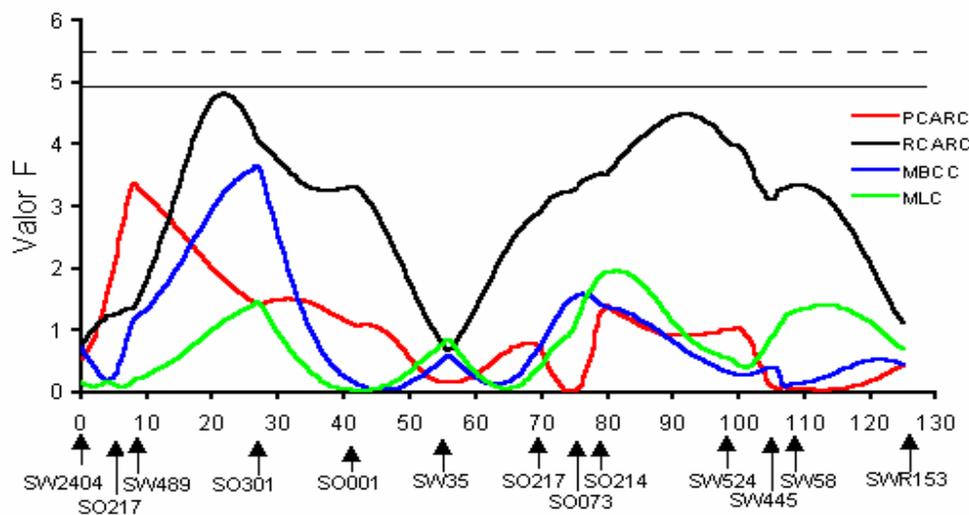


Figura 1 – Estimativas dos valores de F para as características peso (PCARC), rendimento de carcaça (RCARC) e comprimento de carcaça pelo método brasileiro (MBCC) e pelo método americano (MLC). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Durante as últimas décadas, a espessura de toucinho foi usada como uma das principais características na seleção de suínos com o objetivo de melhorar o rendimento de carne magra na carcaça (SATHER e FREDEEN, 1978). Assim, para as características de espessura de toucinho (ETSH, ETUC, ETUL, ETL e ETO) (Tabela 6 e Figura 2), não foi verificados QTL significativos ou sugestivos. Os valores máximos de F

foram 4,50, 1,92, 3,73, 4,21 e 3,80, respectivamente. Ao contrário dos resultados obtidos no presente estudo, WALLING et al. (2000), encontraram um QTL significativo na posição 83 cM no cromossomo 4 para ETUC em uma população de suínos da França obtida do cruzamento entre animais da raça chinesa Meishan e Large White. O mesmo foi obtido por VARONA et al. (2002) que, ao estudarem características de carcaça em uma população obtida do cruzamento entre suínos da raça Ibérica e Landrace, encontraram dois QTL significativos para espessura de toucinho, sendo um para espessura medida na altura da primeira costela e outro na altura da última costela no cromossomo 4. Esses QTL foram identificados na região onde se encontra o gene *FAT1*, que está envolvido no metabolismo de gordura. Os suínos Ibéricos têm como característica maior espessura de toucinho do que as linhas comerciais, assim como a raça naturalizada Piau, utilizada na formação da população do presente estudo. Porém, no cromossomo 4, não foi identificado QTL para espessura de toucinho nas diversas regiões medidas, provavelmente os alelos deste QTL não estejam segregando nesta população.

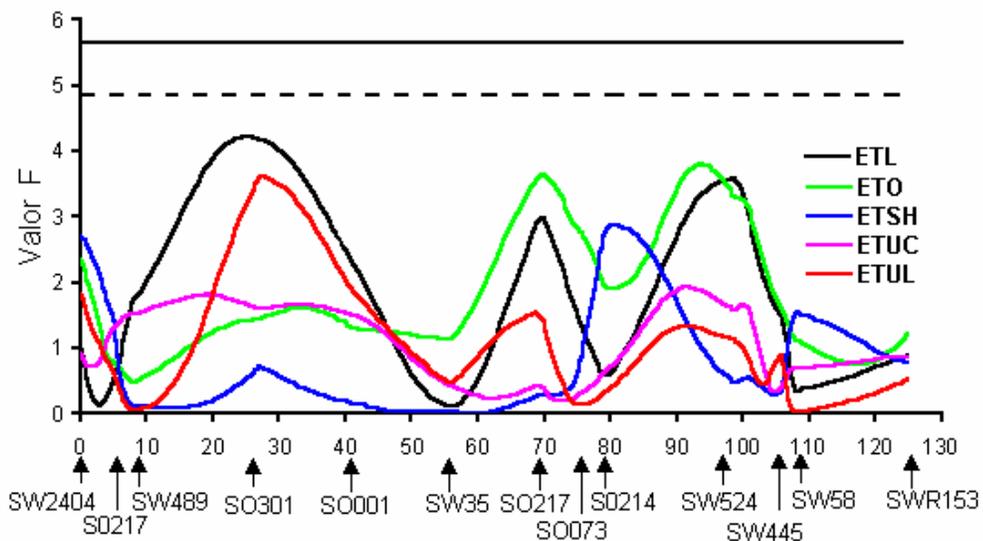


Figura 2 – Estimativas dos valores de F para as características de espessura de toucinho ETSH, ETUC, ETUL, ETL e ETO. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Para PROLOM (Tabela 6 e Figura 3), o valor máximo de F foi de 4,66 na posição 101 cM indicando que não foi encontrado QTL significativo para esta característica neste cromossomo. Para a característica de AOL, o valor máximo de F foi de 4,0 na posição 102 cM, indicando que também não foi identificado QTL para esta característica neste cromossomo. Ao contrário das linhas comerciais, os suínos da raça naturalizada Piau, utilizada neste estudo, apresentam pequena AOL. Esta característica apresenta correlação negativa para espessura de toucinho de modo que, caso fosse encontrado um QTL significativo, este estaria afetando as duas características em sentidos opostos. Ao contrário dos resultados obtidos neste estudo, VARONA et al. (2002) encontraram um QTL significativo para AOL na posição 73 cM ao estudarem animais oriundos do cruzamento entre suínos da raça Ibérica e Landrace.

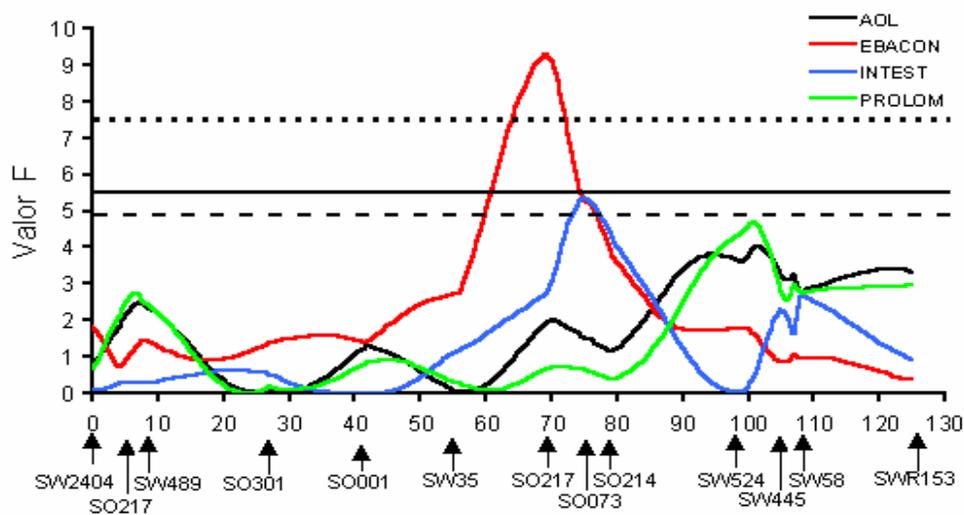


Figura 3 – Estimativas dos valores de F para as características espessura de bacon (EBACON), profundidade de lombo (PROFLOM), área de olho de lombo (AOL) e comprimento de intestino (INTEST). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (1% = linha pontilhada, 5% = linha contínua) e QTL sugestivo (10% = linha tracejada).

Para a característica EBACON (Tabela 6 e Figura 3) foi identificado um QTL significativo ($P < 0,01$). O valor de F foi de 9,27 na posição 69 cM e o intervalo de confiança ficou entre 60 e 75 cM. Não foi encontrado

trabalhos na literatura consultada medindo esta característica. Conforme mencionado anteriormente, esta região contém os genes *V-ATPase*, *ATP1B1* e *ATP1A2* que, possivelmente, estejam controlando esta característica nesta população. Um estudo detalhado destes genes poderia confirmar a sua influência na EBACON. Além destes genes, outros podem ser identificados nesta região por meio de mapeamento comparativo com espécies cujos mapas estão mais saturados, como de humano e camundongo. Uma vez confirmado, os genes candidatos podem ser seqüenciados e suas trocas nucleotídicas associadas a EBACON. Os polimorfismos associados às variações fenotípicas poderiam, então, ser utilizados nos programas de melhoramento, pois as exigências do mercado é que direcionam a produção. Assim, o uso de tecnologias moleculares, além de reduzir a variação na composição das carcaças, irá permitir a direcionar programas de cruzamento e, portanto, diferenciação de suínos para mercados específicos. Neste sentido, a espessura de bacon pode ser utilizada como critério de seleção para a produção de bacon, assim como a gordura intramuscular é utilizada para a qualidade da carne.

Para comprimento de intestino (INTEST), o valor de F foi de 5,33 na posição 75 cM, indicando a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para esta característica (Tabela 6 e Figura 3). Para essa mesma característica, KNOTT et al. (1998) ao estudarem animais oriundos do cruzamento entre porco selvagem europeu (javali) e Large White, encontraram um QTL significativo próximo a essa região, a 66 cM. Provavelmente ele seja o mesmo loco que esteja controlando esta característica na presente população.

Para peso de baço (BACO), fígado (FIGADO) e rim (RIM) não foram encontrados QTL significativos para essas características (Tabela 6 e Figura 4). Os valores máximos de F foram, respectivamente, 4,32 (99 cM), 2,57 (112 cM) e 3,93 (97 cM). ANDERSSON-EKLUND et al. (1998) ao utilizarem 236 marcadores em uma população oriunda do cruzamento entre porco selvagem europeu (javali), encontraram, entretanto, três QTL significativos para FIGADO, sendo um deles no cromossomo 4.

Observa-se na Tabela 6 e Figura 4 que, tanto para peso do coração (CORAC) como para peso do pulmão (PULMAO), foi encontrado um QTL significativo (Tabela 6 e Figura 4). Os valores de F foram 7,45 (79 cM) e 6,16 (69 cM). O intervalo de confiança ficou entre 60 e 90 cM para coração e entre 25 e 73 cM para pulmão. Verifica-se que os picos para as duas características estão bem próximos. Isso pode indicar um loco com efeito pleiotrópico para as duas características. CEPICA et al. (2003), ao estudarem vários cruzamentos, encontraram um QTL significativo para CORAC no cromossomo 4, na posição 66 cM, em animais obtidos do cruzamento entre suínos selvagem europeu (javali) e a raça chinesa Meishan.

Os resultados deste estudo mostram que, a maioria dos QTL, significativos e sugestivos, se encontra em regiões comuns no cromossomo 4. Isso indica que os mesmos genes estão controlando diferentes características, ou seja os genes possuem efeitos pleiotrópicos para as características de carcaça.

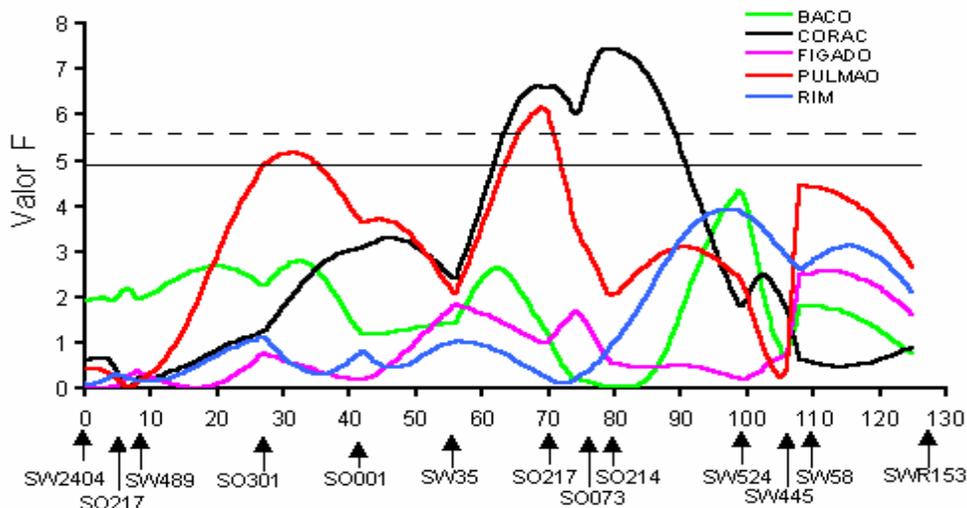


Figura 4 – Estimativas dos valores de F para as características peso de rim (RIM), pulmão (PULMAO), coração (CORAC), fígado (FIGADO) e baço (BACO). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

3.2. Características de cortes de carcaça

Na Tabela 7 é apresentado o resumo dos valores de verossimilhança (F) máximas, as posições (cM) para os prováveis QTL, as estimativas dos efeitos aditivos e de dominância e os respectivos erros-padrão, para as características de cortes de carcaça.

Nas Figuras 5, 6 e 7 são apresentadas as distribuições dos valores de F ao longo do cromossomo, onde os picos das curvas indicam as posições, em cM, em que os prováveis QTL estão localizados.

Tabela 7 – Resumo dos valores de verossimilhança (F) máximas e suas posições (cM) para os QTL e as respectivas estimativas dos efeitos aditivos e de dominância.

Característica	Posição	F _{máx}	Aditivo (\pm EP) ¹	Dominância (\pm EP) ¹
PP	48cM	3,10	-0,003 \pm 0,002	-0,006 \pm 0,004
PPL	95cM	4,57†	-0,007 \pm 0,003	0,013 \pm 0,005
PCOPA	99cM	3,30	0,008 \pm 0,003	0,005 \pm 0,004
PCOPAL	99cM	2,83	0,005 \pm 0,006	0,016 \pm 0,008
PPA	11cM	3,34	0,005 \pm 0,003	-0,008 \pm 0,005
PPAL	95cM	4,58†	-0,006 \pm 0,003	0,009 \pm 0,004
PC	8cM	4,16	-0,008 \pm 0,006	0,025 \pm 0,009
PL	85cM	3,13	-0,010 \pm 0,004	1,0E-4 \pm 0,008
PB	74cM	1,45	0,012 \pm 0,007	-0,005 \pm 0,011
PCOST	7cM	4,65†	0,007 \pm 0,003	-0,007 \pm 0,004
PAPADA	21cM	4,05	-2,0E-4 \pm 0,003	0,013 \pm 0,005
PF	50cM	3,28	-0,001 \pm 0,001	-0,005 \pm 0,002
PBR	100cM	3,66	0,011 \pm 0,004	-0,008 \pm 0,006

† sugestivo a 10%; ¹ desvio-padrão.

PP - peso total do pernil; PPL - peso do pernil sem pele e sem capa de gordura; PCOPA - peso total da copa; PCOPAL - peso da copa sem pele e sem capa de gordura; PPA - peso total da paleta; PPAL - peso da paleta sem pele e sem capa de gordura; PC - peso total do carré; PL - peso do lombo; PB - peso total do bacon; PCOST - peso das costelas; PAPADA - peso total da papada; PF - peso do filezinho e PBR - peso da banha rama.

Constata-se, na Tabela 7 e na Figura 5, que não foram detectados QTL significativos para peso da copa (PCOPA) e peso da copa limpa (PCOPAL). Os valores máximos de F foram, respectivamente, 3,30 (99 cM) e 2,83 (99 cM). Mesmo sendo abaixo do nível para QTL sugestivo, nota-se que a posição para os valores máximos de F para PCOPA e PCOPAL é a mesma. Isto sugere que, caso fosse encontrado um QTL para PCOPA, ele também estaria atuando sobre PCOPAL. Neste

contexto, GELDERMANN et al. (2003), ao utilizarem 129 marcadores microssatélites distribuídos por todo genoma, encontraram um QTL significativo para PCOPA na posição 78 cM e um outro QTL significativo para PCOPAL na posição 77 cM no cromossomo 4, em uma população obtida do cruzamento entre suínos da raça chinesa Meishan e suínos Piétrain. A pequena distância entre esses dois QTL sugere que seja o mesmo loco atuando nas duas características. CEPICA et al. (2003), ao utilizarem 19 marcadores no cromossomo 4, encontraram um QTL significativo para PCOPA em cada uma das três populações estudadas nas posições 77 cM (Meishan X Piétrain), 115 cM (porco selvagem europeu (javali) X Piétrain) e 90 cM (porco selvagem europeu (javali) X Meishan). A característica PCOPAL, no entanto, não foi avaliada por esses autores.

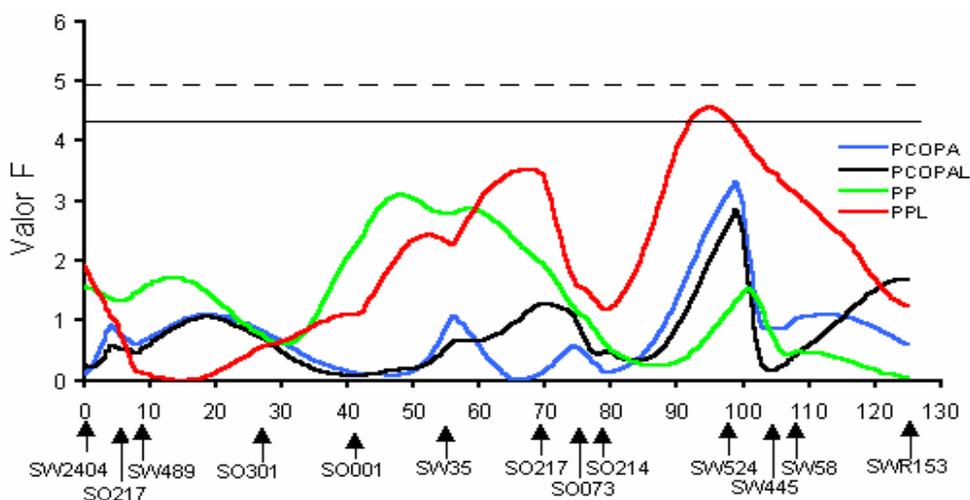


Figura 5 – Estimativas dos valores de F para as características peso do pernil (PP), peso do pernil limpo (PPL), peso total da copa (PCOPA) e peso da copa limpa (PCOPAL). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

O valor máximo de F para a característica peso de pernil (PP) foi de 3,10 na posição 48 cM, indicando que não foi verificada a presença de QTL no cromossomo 4 (Tabela 7 e Figura 5). Para a característica peso de pernil limpo (PPL), o valor máximo de F foi, porém, de 4,57, indicando a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,10$) na posição 95 cM. Esses resultados mostram que diferentes locos controlam essas duas

características. O QTL sugestivo encontrado na posição 95 cM está próximo a vários genes já estudados (BLASKOVA et al., 2000; STRATIL, et al., 2000), como o *EAL* (antígeno do eritrócito L), *AMPD1* (Adenosina Monofosfato Deaminase 1), *NGFB* (Fator β de crescimento de tecido nervoso) e *TSHB* (Hormônio estimulador da tireóide), assim como também está próximo do gene *FAT1*, que está envolvido, principalmente, na composição de ácidos graxos no tecido adiposo. Algum destes genes pode estar atuando no controle PPL na população utilizada no presente estudo. CEPICA et al. (2003) encontraram QTL distintos para as duas características no cromossomo 4. Para PP os autores encontraram um QTL significativo na posição 68 cM e para PPL foi encontrado um QTL significativo na posição 90 cM.

Para as características peso total de carré (PC), peso do filezinho (PF) e peso do lombo (PL), não foi verificada a presença de QTL significativo (Tabela 7 e Figura 6). Os valores máximos de F foram, respectivamente, 4,16 (8 cM), 3,28 (50 cM) e 3,13 (85 cM). Para PC, o valor da estatística F ficou abaixo do nível para QTL sugestivo. Nota-se que a região é pouco saturada, devendo-se colocar outros marcadores para uma melhor avaliação.

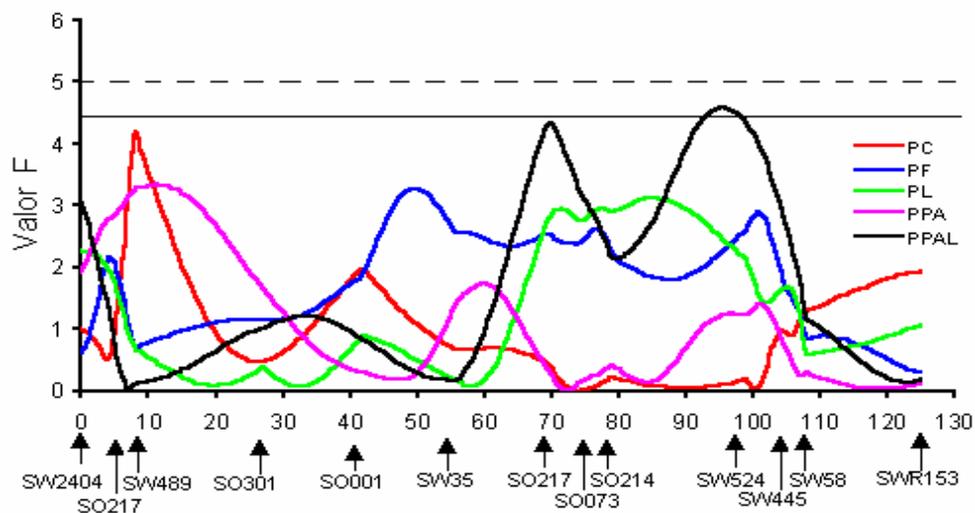


Figura 6 – Estimativas dos valores de F para as características peso da paleta (PPA), para peso da paleta limpa (PPAL), peso do carré (PC), peso do lombo (PL) e peso do filezinho (PF). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Para a característica de peso da paleta (PPA), não se verificou a presença de QTL significativo ou sugestivo (Tabela 7 e Figura 6). O valor máximo de F foi de 3,34 na posição 11 cM. Para peso da paleta limpa (PPAL) foi, porém, observado a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,10$). O valor máximo de F foi de 4,58 na posição 95 cM. Pode-se observar a presença de outro pico na posição 70 cM, porém com o valor máximo de F abaixo do nível para QTL sugestivo. Na região de 70 cM do cromossomo 4 estão presentes os genes *V-ATPase*, *ATP1B1* e *ATP1A2*, que codificam diferentes subunidades da enzima ATPase. Já na região 90 cM estão localizados os genes *FAT1* e *DERC* (2,4-dienoyl-CoA-redutase), que estão envolvidos no metabolismo da gordura no tecido adiposo. Essas duas regiões contêm genes de pequeno efeito no controle de PPAL, assim como no controle de outras características estudadas neste trabalho.

Ao analisar os dados da Tabela 7 e a Figura 7, referentes à característica de peso total do bacon (PB), verifica-se que nenhum QTL foi detectado. O valor máximo de F foi de 1,45 na posição 74 cM. Ao contrário do presente resultado, VARONA et al. (2002) encontraram um QTL significativo para PB no cromossomo 4, na posição 75 cM, ao estudarem uma população obtida do cruzamento de suínos da raça Ibérica e Landrace. Esta região contém vários genes mencionados anteriormente, porém nenhum deles parece estar atuando no PB na população em estudo.

Para peso da banha (PBR), não foi verificado nenhum QTL significativo ou sugestivo. O valor máximo de F foi de 3,66 na posição 100 cM (Tabela 7 e Figura 7). Foi observado, no entanto, dois picos distintos, porém abaixo do nível para QTL sugestivos. Também não foi verificado a presença de QTL significativo para a característica peso da papada (PAPADA), cujo valor máximo da estatística F foi de 4,05 na posição 21 cM (Tabela 7 e Figura 7). O pico para esta característica está localizado em uma região pouco saturada. Aconselha-se, assim, colocar outros marcadores com o objetivo de melhor avaliar o efeito desta região.

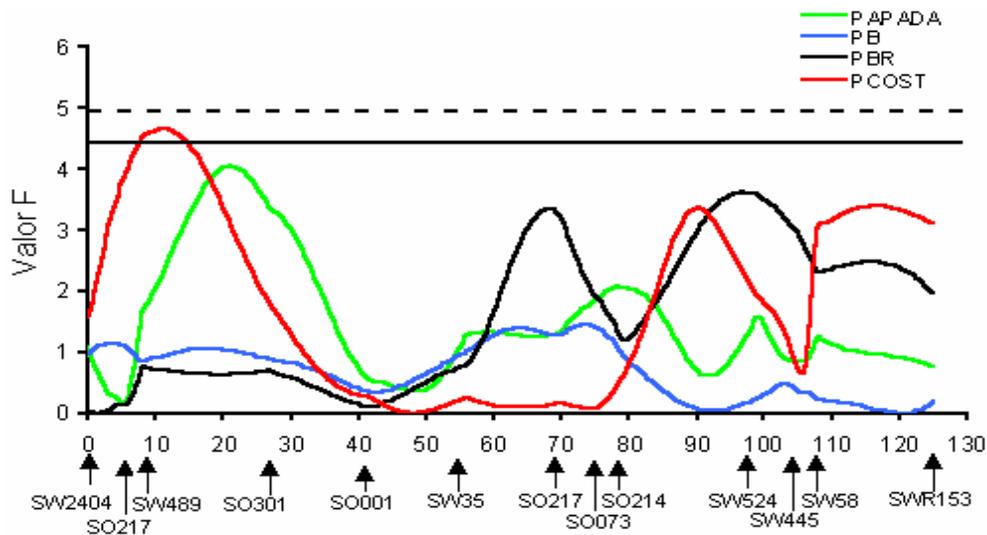


Figura 7 – Estimativas dos valores de F para as características peso do bacon (PB), peso das costelas (PCOST), peso da papada (PAPADA) e peso da banha rama (PBR). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Constatou-se a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para peso de costela (PCOST), cujo valor de F foi 4,65 na posição 11 cM (Tabela 7 e Figura 7). Ao contrário do resultado aqui encontrado, VARONA et al. (2002), ao estudarem uma população obtida do cruzamento de suínos da raça Ibérica e Landrace, não encontraram QTL significativo ou sugestivo no cromossomo 4, mas foi identificado um QTL significativo para PCOS no cromossomo 7. Como a população utilizada no presente trabalho teve como animais fundadores suínos da raça naturalizada Piau, que não foi submetida à seleção artificial, pode se esperar que certos alelos não estejam fixados e que haja segregação para esta característica.

4. CONCLUSÕES

Para as características de carcaça, órgãos e vísceras foram encontrados um QTL sugestivo ($P < 0,10$) para comprimento de intestino (INTEST) na posição 75 cM, dois QTL significativos ($P < 0,05$), sendo um para peso de coração (CORAC) na posição 79 cM e o outro para peso de pulmão (PULMAO) na posição 69 cM e um QTL significativo ($P < 0,01$) para espessura de bacon (EBACON) na posição 69 cM.

Para as características de corte de carcaça foram identificados três QTL sugestivos ($P < 0,10$), sendo um para peso de pernil limpo (PPL) na posição 95 cM, um para peso de paleta limpa (PPAL) na posição 95 cM e um para peso de costela (PCOS) na posição 7 cM.

As regiões em que foram encontrados QTL sugestivos devem ser mais investigadas para se confirmar a real presença destes QTL. Para as regiões onde há baixa saturação de marcadores e que apresentaram picos abaixo do nível para QTL sugestivos deve se colocar outros para melhor avaliação do efeito destas regiões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L., HALEY, C.S., ELLEGREN, H., KONTT, S.A. JOHANSSON, M. K. ANDERSSON, K., ANDERSSON-EKLUND, L., EDFORS-LILJA, I., FREDHOLM, M., HANSSON, I., HAKANSSON, J., LUNDSTRÖM, K.: Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science*, v.263, p.1771-1774. 1994.
- ANDERSSON-EKLUND, L., MARKLUND, L. LUNDSTRÖM, K., HALEY, C.S., ANDERSSON, K., HANSSON, I., MOLLER, M., ANDERSSON, L.: Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a Wild Boar x Large White intercross. *Journal of Animal Science*, v.76, p.694- 700. 1998.
- BLAZKOVA P, KOPECNY, M., FONTANESI, L., STRATIL, A., DAVOLI, R., et al.: Linkage assignments of the porcine *ATP1A2*, *ATP1B1* V-*ATPase* (CGI-11) genes to chromosome 4. *Anim Genet* 31, 416–418. 2000.
- BOX, G. E. P., COX, D. R.: An Analysis of Transformations, *Journal of the Royal Statistical Society*, 211-243, discussion 244-252. 1964.
- CEPICA, S., STRATIL, A., KOPECNY, M., BLASKOVA, P., SCHROFFEL JR, J., DAVOLI, R., FONTANESI, L., REINER, G., BARTENSCHLAGER, H., MOSER, G., GELDERMANN, H.: Linkage and QTL mapping for *Sus Scrofa* chromosome 4. *J. Anim. Breed. Genet.*, v.120, p. 28-37, 2003.
- CHURCHILL, G.A., DOERGE, R.W.: Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963-971, 1994.
- CLOP, A., CERCOS, A., TOMAS, A., PEREZ-ENCISO, M., VARONA, L., NOGUERA, J. L., SANCHEZ, A., and AMILLS, M.: The porcine 2,4-dienoyl-CoA reductase gene (*DECR*) maps to chromosome 4 and lies within the confidence interval of the *FAT1* locus. *Animal Genetics*, 33, 164-165. 2000.

- EVANS, G. J., GIUFFRA, E., SANCHEZ, A., KERJE, S., DAVALO, G., VIDAL, O., ILLAN, S., NOGUERA, J. L., VARONA, L., VELANDER, I., SOUTHWOOD, O. I., DE KONING, D. J., HALEY, C. S., PLASTOW, G. S., ANDERSSON, L.: Identification of Quantitative trait loci for production traits in commercial pig populations. *Genetics*, v. 164, p. 621-627, 2003.
- GELDERMANN, H., MULLER, E., MOSER, G., REINER, G., ARTENSCHLAGER, S., CEPICA, S., STRATIL, A., KURYL, J., MORAN, C., DAVOLI, R., BRUNSCH, C.: Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Piétrain, Meishan and Wild Boar crosses. *J. Anim. Breed. Genet.*, v.120, p.363-393, 2003.
- HALEY, C.S., KNOTT, S.A., ELSEN, J.M.: Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics*, v.36, p.1195-1207, 1994.
- KLONT, R. E., SOSNICKI, A. A., NASCIMENTO, J. D., PEREIRA, F.: Produção personalizada de carne suína através da otimização da genética e de controle de processo. II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, 05 de novembro à 06 de dezembro de 2001 — Via Internet
- KNOTT, S. A., MARKLUND L., HALEY .C S., ANDERSSON, K., DAVIES, W., ELLEGREN, H., FREDHOLM, M., HANSSON, I., HOYHEIM, B., LUNDSTROM, K., MOLLER, M., ANDERSSON, L.: Multiple marker mapping of quantitative trait loci in a cross between outbred wild boar and Large White pigs. *Genetics*, v. 148, p. 1069-1080, 1998.
- MALEK, M., DEKKERS, C.M.J., LEE, H.K., BAAS, T.J., ROTHSCCHILD, M.F. : A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. I. Growth and body composition. *Mammalian Genome*, v.12, p.630-636. 2001.

- ROHRER, G.A., KEELE, J.W.: Identification of quantitative trait loci affecting carcass composition in swine: II. Muscling and wholesale product yield traits. *Journal of Animal Science*, v.76, p.2255-2262. 1998.
- ROTHSCHILD, M.F., PLASTOW, G.S. 1999. Advances in pig genomics and industry applications. *AgBiotechNet*, v.1, p.1-7.
- ROTHSCHILD, M.F.: U.S. Pig gene mapping coordination program. 2003. Disponível em: <<http://www.genome.iastate.edu/pig>>. Acessado em: 20 de junho de 2005.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. SAS/STAT® user's guide: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.
- SATHER, A.P. and FREDEEN, H.T. Effect of selection for lean growth rate upon feed utilization by the market hog. *Can. J. Anim. Sci.* v. 58, p. 285-289, 1978.
- SEATON, G., HALEY, C. S., KNOTT, S. A., KEARSEY, M., VISSCHER, P. M.: QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics*, v.18, n.2, p.339-340, 2002. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>. Acessado entre 03 e 15 de junho de 2005.
- STRATIL, A., KNOLL, A., MOSER, G., KOPECNY, M., GELDERMANN, H.: The porcine adenosine monophosphate deaminase 1 (*AMPD1*) gene maps to chromosome 4. *Anim. Genet.* 31: 147–148. 2000.
- VARONA, L., OVILO, A. C., NOGUERA, J. L., PEREZ-ENCISO, M., COLL, A., FOLCH, J. M., BARRAGÁN, C., TORO, M. A., BABOT, D., SÁNCHEZ, A.: QTL mapping for growth and carcass traits in a Iberian by Landrace pig intercross: additive, dominant and epistatic affects. *Genet. Res. Cam.* V. 80, p. 145-154, 2002.

WALLING, G.A., VISSCHER, P.M., ANDERSSON, L., ROTHCHILD, M.F.,
WANG, L., MOSER, G., GROENEN, M.A.M., BIDANEL, J.-P.,
CEPICA, S., ARCHIBALD, A.L., GELDERMANN, H., de KONING, D.J.,
MILAN, D., HALEY, C.S.: Combined analyses of data from quantitative
trait loci mapping studies: chromosome 4 effects on porcine growth and
fatness. *Genetics*, v.155, p.1369–1378. 2000.

CAPÍTULO 4

Mapeamento de locos de características quantitativas no cromossomo 4 (SSC4) de uma população F2 de suínos: III – Características de qualidade da carne.

RESUMO. O objetivo ao realizar este trabalho foi o mapeamento de QTL no cromossomo 4 de suínos (SSC4) e a associação destes a diversas características de qualidade de carne. Para isto, foi desenvolvida uma população F2 com 800 animais a partir do inter cruzamento da geração F1, obtida do acasalamento divergente entre machos da raça naturalizada brasileira Piau e 18 fêmeas comerciais (Landrace x Large White X Piétrain) e genotipada para 13 marcadores tipo microssatélites. As características de qualidade de carne avaliadas na população F2 foram: pH medido aos 45 minutos e 24 horas *post-mortem*, perda por gotejamento, perda por cozimento, perda total, gordura intramuscular, maciez objetiva e coloração da carne (luminosidade, índice de vermelho, índice de amarelo, tonalidade de cor e índice de saturação). Foi utilizado o método de regressão por intervalo de mapeamento, por meio do programa QTL EXPRESS. Foram encontrados dois QTL sugestivos ($P < 0,1$), sendo um QTL associado a gordura intramuscular na posição 3 cM e um QTL associado a características de coloração da carne, mais especificamente ao índice de amarelo, na posição 3 cM.

CHAPTER 4

Mapping quantitative trait loci on chromosome 4 (SSC4) in a F2 pig population: III – meat quality traits

ABSTRACT. The objective of this work was mapping QTL on porcine chromosome 4 (SSC4), and associate them to meat quality traits. For this, a F2 pig population with 800 animals was established from a cross of the F1 generation, produced by crossing using two naturalized Brazilian Piau sires and 18 commercial dams (Landrace x Large White X Piétrain). The population was genotyped for 13 microsatellite markers. pH measured 45 minutes and 24 hours “post-mortem”, drip loss, cooking loss, total loss, intramuscular fat content, objective tenderness and muscle color Minolta measurements (lightness, redness, yellowness, hue angle and chroma). Data were analyzed by multiple regressions developed for analysis of outbred lines crosses, using QTL EXPRESS software. To meat quality traits were found two suggestive QTL ($P < 0,10$), one associated to intramuscular fat content located at about 3 cM and one associated to muscle color Minolta measurements, more specifically to the yellowness, located at about 3 cM.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da carne é um conjunto de características organolépticas que são de grande importância para a indústria suinícola. Até poucos anos atrás, o melhoramento genético dos suínos esteve focalizado, principalmente, no aumento do rendimento de carne magra na carcaça. O problema é que a seleção para aumento na quantidade de carne na carcaça, aliada ao aumento da eficiência de produção, tem causado redução na qualidade da carne. Há consenso de que a seleção de suínos para a produção de carcaças com mais carne e menos gordura provocou efeito negativo sobre a qualidade da carne, resultando em perdas importantes que devem ser consideradas (DEKKERS et al., 2001).

Melhorar geneticamente a qualidade da carne por meio de métodos convencionais de seleção é difícil porque a maioria das características de qualidade só pode ser medida após o abate. Além disso, apenas fenótipos de parentes podem ser usados para prever os valores genéticos, o que limita a precisão da seleção.

As limitações da seleção com base na informação fenotípica tornam a qualidade de carne um candidato ideal para o uso na seleção assistida por marcadores (MAS). Assim, o uso de marcadores genéticos constitui um mecanismo direto para identificação do genótipo (constituição genética) dos suínos para características de interesse. O primeiro marcador genômico usado no melhoramento genético de suínos somente se tornou disponível em 1991, quando pesquisadores canadenses desenvolveram a técnica para identificação do chamado Gene Halotano (FUJII et al., 1991), que está diretamente relacionado com a qualidade da carne.

Após a identificação do gene Halotano (HAL), muitos estudos têm sido realizados para a busca de QTL afetando características de qualidade da carne em suínos, sendo que na maioria deles tem sido encontrado QTL com efeito significativo ou sugestivo.

O objetivo ao realizar este trabalho foi mapear QTL associados a características de qualidade da carne, no cromossomo 4 de suínos, a partir de uma população F2, obtida por cruzamento divergente.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção dos dados e o delineamento usado

A fase de campo deste experimento foi conduzida na Granja de Melhoramento de Suínos do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG, Brasil, no período de novembro de 1998 a julho de 2001.

Foi utilizado o delineamento de F2 para se obter desequilíbrio de fase de ligação entre os marcadores e os QTL. Para tanto, foram construídas inicialmente duas famílias provenientes do cruzamento de dois varrões (C e J) da raça naturalizada Piau com 18 fêmeas originadas de linhagem desenvolvida na UFV pelo acasalamento de animais de raça comercial (Landrace x Large White x Piétrain) selecionados para desempenho. A geração F1 nasceu entre os meses de março e maio de 1999. Dentre os machos F1 foram selecionados ao acaso 11 varrões, provenientes de diferentes leitegadas que foram cruzados (monta natural) com 54 fêmeas. Estes animais foram acasalados entre os meses de fevereiro e outubro de 2000, para a produção da geração F2, a qual nasceu entre junho de 2000 e fevereiro de 2001. Assim, foram obtidos 800 animais F2, divididos em cinco lotes:

- lote 1 = animais nascidos entre 20/06/00 a 03/07/00;
- lote 2 = animais nascidos entre 03/08/00 a 23/08/00;
- lote 3 = animais nascidos entre 16/09/00 a 01/11/00;
- lote 4 = animais nascidos entre 30/11/00 a 25/12/00;
- lote 5 = animais nascidos entre 19/01/01 a 12/02/01.

Os três primeiros lotes foram constituídos de animais nascidos de matrizes de primeira parição e os demais, de segunda parição. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade, sendo que os machos foram castrados aos 10 dias de idade.

2.2. Características avaliadas

As seguintes características de qualidade da carne foram avaliadas na geração F2: pH medido 45 minutos e 24 horas *post-mortem* (pH45 e pH24, respectivamente), perda por gotejamento (GOTEJ), perda por cozimento (COZ), perda total (PTOT), gordura intramuscular (GOINTR), maciez objetiva (força de cisalhamento – MACIEZ) e coloração. A coloração foi determinada pelo sistema HUNTER LAB, sendo medidos a luminosidade (L), o índice de vermelho (A) e o índice de amarelo (B), em espectrofotômetro. Foram, então, calculados os índices de saturação [$C = (A^2 + B^2)^{1/2}$] e de tonalidade ($H = \arctang B/A$).

Maiores informações sobre a metodologia empregada na análise das características de qualidade da carne foram apresentadas por BENEVENUTO JÚNIOR (2001). O número de observações, as médias, os desvios padrão e os valores máximos e mínimos destas características foram obtidas por meio do PROC MEANS do SAS (2000) (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de observações, média, desvio padrão e valores mínimos e máximos para as características de qualidade.

Característica	unidade	N	Média	Desvio padrão	MIN	MAX
pH45	pH	410	6,530	0,284	5,350	7,060
pH24	pH	501	5,720	0,184	5,400	6,870
L	Absorb.	452	45,076	2,016	32,620	50,720
A	Absorb.	446	0,666	0,631	-0,800	3,380
B	Absorb.	453	6,605	0,649	1,240	8,290
GOINTR	%	456	1,546	0,667	0,200	6,830
GOTEJ	%	501	3,221	1,741	1,080	9,120
COZ	%	503	32,575	2,672	15,660	42,230
MACIEZ	kg/cm ²	411	5511,630	972,335	1948,070	8135,150
PTOT	%	499	35,747	3,488	17,760	44,950
H	Absorb.	426	84,0738	5,5618	46.6233	89.9119
C	Absorb.	455	6,687	0,541	4,998	8,354

pH45 - pH 45 minutos após o abate; pH24 - pH 24 horas após o abate; GOINTR – porcentagem de gordura intramuscular; GOTEJ - perda por gotejamento; COZ – perda por cozimento; PTOT - perda total; MACIEZ - maciez objetiva (força de cisalhamento); L - luminosidade; A - índice de vermelho; B - índice de amarelo; H - tonalidade de cor; e C – índice de saturação.

2.3. Extração de DNA

A análise genotípica foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da UFV.

O DNA dos animais parentais, F1 e F2 foi extraído do sangue imediatamente após o abate. As amostras foram mantidas a 60°C por uma hora em CTAB, sendo posteriormente centrifugadas e desproteinizadas em um banho de clorofórmio seguido de centrifugação, sendo o DNA então precipitado em etanol absoluto, e guardado a -20°C para uso posterior. As soluções de DNA para uso (na concentração aproximada de 25 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$) foi mantida em geladeira a 4°C. Para as amplificações, este DNA foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

2.4. Obtenção dos genótipos marcadores

Foram utilizados *primers* de microssatélites para cobrir o cromossomo quatro dos suínos a um intervalo médio de 10,7 cM. A Tabela 2 apresenta os *primers* com algumas características específicas a cada um deles, como localização, fluorescência, faixa da variação de tamanho, em pares de base (pb), e número de alelos.

Tabela 2 – *Primers* utilizados na varredura do cromossomo 4.

Marcador	Posição ¹	Fluorescência	Temp. ²	Mínimo alelo (pb)	Máximo alelo (pb)	Número alelos
SW2404	0,0	Tet	62	150	166	5
S0227	4,1	Hex	60	227	251	3
SW489	8,0	Hex	55	159	171	3
S0301	27,1	Fam	58	253	259	3
S0001	41,8	Hex	50	183	189	3
SW35	55,9	Hex	58	135	143	4
S0217	69,6	Fam	62	141	151	3
S0073	74,4	Hex	55	103	119	6
SO214	79,3	Hex	58	128	142	5
SW524	99,3	Tet	62	176	196	2
SW445	105,8	Fam	58	187	207	10
SW58	107,9	Tet	58	210	220	4
SWR153	125,6	Fam	58	217	233	4

¹ segundo ROTHSCILD (2003); ² temperatura de anelamento em °C.

Para as ampliações, foram utilizados aparelhos termocicladores *MJ Research, Inc. modelo PTC-100 (Watertown, USA)* sendo os sistemas constituídos de Taq polimerase 1 U, dNTPs 0,2 mM, *primers forward* e *reverse* 0,2 µM cada, Tris-HCl pH 8,3 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 a 4 mM, de acordo com cada *primer*, e DNA genômico 25 ng por reação. O volume final da reação foi de 20 µL. Os programas de amplificação variaram para cada par de *primer* constituindo-se basicamente dos seguintes passos:

11-Desnaturação inicial = 94°C/3 min.;

12-Desnaturação = 94°C/1min.;

13-Anelamento do *primer* = temperatura de anelamento, variou para cada par de *primer*;

14-Polimerização = 72°C/1 min.; (repetindo-se os passos 2,3, e 4 por 25 a 35 vezes, de acordo com o *primer*);

15-Polimerização final = 72°C/20 min.

As ampliações dos fragmentos dos marcadores foram observadas em gel de poliacrilamida a 5%, onde foram aplicados 5 µL de cada reação. Após a corrida em cuba de eletroforese foi realizada a coloração com nitrato de prata. Confirmadas as ampliações os produtos foram congelados a -20°C.

As amostras foram submetidas à análise de fragmentos, para o escoreamento das bandas e detecção de polimorfismo entre elas. Estas análises foram feitas por meio de sequenciador automático ABI PRISM 310, do Laboratório de Biotecnologia Animal, no Departamento de Zootecnia da UFV. O escoreamento dos fragmentos amplificados foi feito utilizando o “software” GenScan.

2.5. Análises estatísticas

Foram utilizadas as distâncias de consenso do mapa de ligação suíno (ROTHSCHILD, 2003). Todos os animais, incluindo parentais, F1 e F2 foram genotipados.

Antes de serem submetidos a análises estatísticas para avaliar a existência de QTL, os valores para as características de qualidade de carne foram testados previamente no SAS (2000) para verificar a normalidade na distribuição dos dados. As características que não tinham distribuição normal foram normalizadas pelo procedimento estatístico de BoxCox (BOX e COX, 1964) (Tabela 3).

Tabela 3 – Procedimento estatístico de normalização para os valores de crescimento.

Característica	Distribuição
pH45	Normal
pH24	Normal
L	Normal
A	Normal
B	Normalizada por BoxCox
GOINTR	Normalizada por BoxCox
GOTEJ	Normalizada por BoxCox
COZ	Normalizada por BoxCox
MACIEZ	Normal
PTOT	Normal
H	Normalizada por BoxCox
C	Normal

pH45 - pH medido aos 45 minutos após o abate; pH24 - pH medido 24 horas após o abate; GOINTR – porcentagem de gordura intramuscular; GOTEJ - perda por gotejamento; COZ – perda por cozimento; PTOT - perda total; MACIEZ - maciez objetiva (força de cisalhamento); L - luminosidade; A - índice de vermelho; B - índice de amarelo; H - tonalidade de cor; e C – índice de saturação.

O mapa de ligação contendo as distâncias entre os marcadores, os genótipos para os diversos marcadores nos animais analisados e os dados fenotípicos foram submetidos ao programa QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002) (<http://www.qtl.cap.ed.ac.uk>).

O programa QTL EXPRESS mapeia os QTL existentes por meio de regressão linear (HALEY et al., 1994), com dois procedimentos sucessivos: primeiramente são obtidas as probabilidades de identidade por descendência (IBD) para locos cromossômicos específicos, utilizando dados dos vários marcadores. Em um segundo passo é empregado um modelo estatístico para as observações e os coeficientes de IBD.

De acordo com SEATON et al. (2002), o programa QTL EXPRESS é adequado para processar dados gerados em populações F2 obtidas a partir de linhagens não endogâmicas, pois aplica um modelo linear aos

dados fenotípicos, com efeitos fixos adicionais e covariáveis que expliquem variações para a característica avaliada. Os QTL podem ser especificados em termos de efeitos aditivos e dominantes. O programa possibilita ainda que um ou mais QTL mapeados em um cromossomo sejam utilizados como co-fatores no modelo, possibilitando que um QTL de pequeno efeito seja detectado.

No modelo estatístico assume-se que o QTL é dialélico, com alelos alternativos fixados em cada raça parental (HALEY et al., 1994). Considerou-se o genótipo QQ para o genótipo Comercial, com efeito a , qq para o genótipo Nativo, com efeito $-a$, e Qq para o F1, com efeito d . A probabilidade de cada indivíduo F2 apresentar cada um dos três genótipos do QTL é calculada conforme os marcadores, a intervalos de 1 cM ao longo do cromossomo. Estas probabilidades são usadas para se fazer a regressão das características nos coeficientes aditivos e de dominância do QTL em estudo, para cada animal.

Os valores da razão de verossimilhança (F) foram plotados e os pontos com os maiores valores mostram a posição do provável QTL. Os níveis de significância ($\alpha=0,10, 0,05$ ou $0,01$) “cromossome-wide” foram obtidos pelo teste de permutação (CHURCHILL e DOERGE, 1994), para um total de 10000 permutações, para cada característica. Os dados foram obtidos para o teste de permutação pelo “software” QTL EXPRESS (SEATON et al., 2002).

Foi adotado o seguinte modelo estatístico:

$$y_{ijkl} = S_i + L_j + H_k + (C_{ijkl} - \bar{C})b + c_a a + c_d d + e_{ijkl}$$

em que:

y_{ijk} = é o fenótipo;

S_i = é o efeito fixo do sexo i , $i = 1, 2$;

L_j = é o efeito fixo do lote j , $j = 1, 2, 3, 4, 5$;

H_k = é o efeito fixo do genótipo do halotano k , $k = 1$ (NN), 2 (Nn);

$(C_{ijkl} - \bar{C})b$ = ajustamento para a covariável idade ao abate;

Os valores c_a e c_d são funções das probabilidades condicionais do QTL dado o genótipo dos marcadores e são calculados da seguinte maneira:

$$c_a = P(QQ / Mi) - P(qq / Mi)$$

$$c_d = P(Qq / Mi)$$

em que:

$P(QQ)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem homozigotos com origem da raça Comercial;

$P(qq)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem homozigotos com origem da raça Naturalizada;

$P(Qq)$ = é a probabilidade de os alelos do QTL serem heterozigotos.

O modelo anterior foi utilizado para estimar a regressão do fenótipo nos coeficientes c_a e c_d , variando a posição do QTL a cada cM. Para cada posição, era calculada uma razão de verossimilhança (F), comparando o modelo que considera a presença do QTL (modelo completo) ao modelo sem o QTL (modelo reduzido).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 4 é apresentado um resumo das estatísticas F máximas e suas posições (cM) para os prováveis QTL, além das estimativas dos efeitos aditivos e de dominância, com os respectivos erros-padrão. Os altos valores apresentados para as estimativas dos efeitos aditivos e de dominância para algumas características são devido ao processo de normalização dos dados.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 são apresentadas as distribuições dos valores de verossimilhança (F) ao longo do cromossomo 4, sendo que os picos das curvas indicam as posições, em cM, em que os prováveis QTL estão localizados.

Tabela 4 – Resumo dos valores de verossimilhança (F) máximas e suas posições (cM) para os QTL e as respectivas estimativas dos efeitos aditivos e de dominância.

Característica	Posição	F _{máx}	Aditivo (\pm EP) ¹	Dominância (\pm EP) ¹
pH45	86cM	1,48	0,020 \pm 0,055	0,164 \pm 0,108
pH24	109cM	3,39	-0,055 \pm 0,033	0,083 \pm 0,047
L	74cM	2,12	-0,200 \pm 0,698	-2,184 \pm 1,099
A	89cM	2,74	-0,139 \pm 0,074	0,262 \pm 0,140
B	3cM	5,44*	-4,166 \pm 8,087	44,311 \pm 13,578
GOINTR	3cM	5,65*	-0,009 \pm 0,013	0,070 \pm 0,021
GOTEJ	107cM	3,81	-0,007 \pm 0,005	0,014 \pm 0,007
COZ	106cM	4,31	-32,076 \pm 33,516	128,927 \pm 48,783
MACIEZ	82cM	2,05	-4,786 \pm 81,952	-300,085 \pm 152,949
PTOT	19cM	2,33	0,023 \pm 0,021	-0,073 \pm 0,038
H	88cM	2,69	-0,113 \pm 0,099	0,438 \pm 0,194
C	85cM	2,61	-0,148 \pm 0,065	0,083 \pm 0,127

* sugestivo a 10%; ¹ desvio-padrão.

pH45 - pH 45 minutos após o abate; pH24 - pH 24 horas após o abate; GOINTR – porcentagem de gordura intramuscular; GOTEJ - perda por gotejamento; COZ - perda por cozimento; PTOT - perda total; MACIEZ - maciez objetiva (força de cisalhamento); L - luminosidade; A - índice de vermelho; B - índice de amarelo; H - tonalidade de cor; e C – índice de saturação.

De acordo com a Tabela 4 e Figura 1, verifica-se que não foi detectado QTL para pH medido aos 45 minutos após o abate (pH45). O valor de F foi 1,48 localizado na posição 86 cM, sendo assim não significativo. Na literatura consultada não foram encontrados relatos de

trabalhos utilizando pH45, talvez pela dificuldade de mensuração desta característica, que deve ser realizada ainda no frigorífico. O pH45 é muito influenciado pelo ambiente, de modo que está diretamente associada às condições de transporte e pré-abate dos animais.

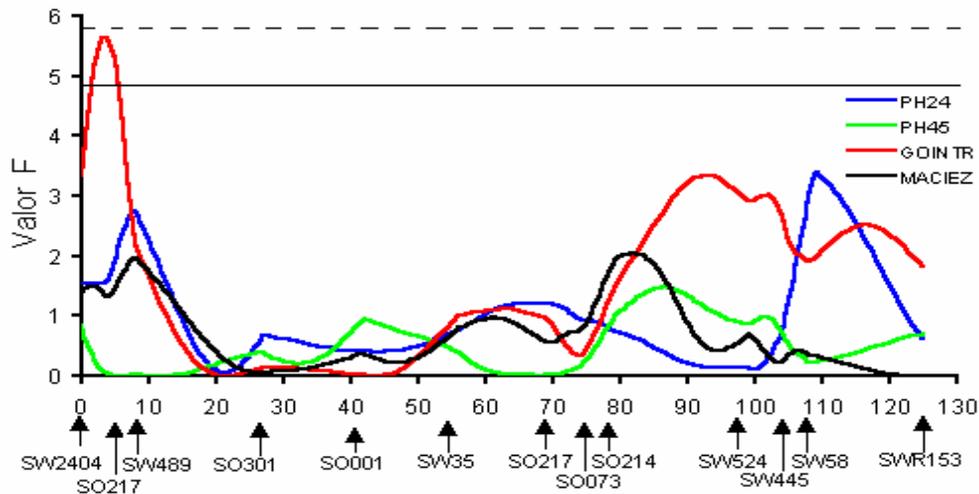


Figura 1 – Estimativas do valor de F para as características pH45, pH24, GOINTR e MACIEZ. As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Ainda de acordo com a Tabela 4 e Figura 1, verifica-se que não foi detectado QTL para pH medido 24 horas após o abate (pH24). O valor de F foi 3,39, localizado a 109 cM, portanto não significativo. Resultado semelhante foi obtido por ANDERSSON-EKLUND et al. (1998) que, ao utilizarem 236 marcadores para cobrir os 18 cromossomos autossômicos, não encontraram QTL significativos para pH24. MALEK et al. (2001), efetuando uma varredura genômica para identificação de locos influenciando características economicamente importantes, não encontraram QTL para pH24 no cromossomo 4, porém foi encontrado um QTL significativo ($P < 0,05$) no cromossomo 5 e um significativo ($P < 0,01$) no cromossomo 14. ÓVILO et al. (2002), ao estudarem características de qualidade de carne em uma população obtida do cruzamento entre suínos da raça Ibérica e Landrace, encontraram um QTL significativo ($P < 0,01$) no cromossomo 3 que explicava 6,4% da variação para esta característica. De KONING et al. (2001), ao estudarem características de qualidade de carne em uma população de animais obtidos do cruzamento entre a raça

chinesa Meishan e linhas comerciais da Holanda, encontraram, no entanto, um QTL sugestivo no cromossomo 4 entre os marcadores S0301 e S0001. Como não foram evidenciados no presente estudo, provavelmente os alelos deste QTL não estejam segregando nesta população. O pH24 é, no entanto, muito importante, pois influencia várias outras de qualidade da carne, principalmente a capacidade de retenção de água, a coloração e a maciez.

Para a característica gordura intramuscular (GOINTR) foi encontrado um QTL sugestivo ($P < 0,10$). O valor de F foi de 5,65 na posição 3 cM (Tabela 4 e Figura 1). Não foram encontrados trabalhos na literatura consultada reportando a presença de QTL nesta região. Este, porém, pode ser devido a algum gene presente nos suínos da raça naturalizada Piau, usada na formação das famílias e que possui um maior conteúdo de gordura intramuscular em relação as linhas comerciais. Conforme GERBENS et al. (1998), o conteúdo de gordura intramuscular está diretamente associada a qualidade da carne, porém, devido a extensiva seleção para alto rendimento de carne magra na carcaça, o conteúdo de gordura intramuscular tem decrescido abaixo do recomendável. ANDERSSON et al. (1994) encontraram um QTL afetando conteúdo de gordura no cromossomo 4 na região de 70 cM. Resultados semelhantes foram obtidos por RATTINK et al. (2000), que encontraram um QTL sugestivo na posição 69 cM, e De KONING et al. (1999), que também encontraram um QTL sugestivo na posição 65 cM.

No cromossomo 4 está localizado o gene *FABP4* que codifica a proteína de ligação dos ácidos graxos nos Adipócitos (A-FABP), responsável pelo transporte de ácidos graxos da membrana celular até sítios de oxidação e síntese (VEERKAMP e MAATMAN, 1995). Esse gene tem sido proposto como candidato para o aumento do conteúdo de gordura intramuscular (GERBENS et al., 1998; DEKKERS et al., 2001). Ele está localizado, no entanto, na região do marcador SO001 (42cM) e um estudo prévio de seqüenciamento não mostrou nenhuma diferença na seqüência do gene entre os animais fundadores na população mapeada. GERBENS et al. (1998) também não encontraram diferença na seqüência de nucleotídeos do gene *FABP4* nos animais fundadores de uma

população de Duroc. Encontraram, porém, uma associação entre gordura intramuscular e os alelos para o marcador SO001, na posição 42 cM, no cromossomo 4. A ausência de associação com gordura intramuscular neste estudo pode ser devido ao baixo número de alelos para o marcador, somente três, quando comparado com o estudo acima, em que foram encontrados nove alelos. Neste mesmo cromossomo, na região de 90 cM, está localizado o gene *FAT1* (MARKLUND et al., 1999; MOLLER et al., 2004) que está envolvido, principalmente, na composição de ácidos graxos no tecido adiposo, porém nesta região o valor de F para GOINTR foi igual a 3,34, bem abaixo para um QTL sugestivo, mostrando que na população utilizada neste estudo os alelos presentes não estão atuando nesta característica.

Conforme a Tabela 4 e Figura 1, não foi encontrado QTL significativo para maciez objetiva da carne (MACIEZ), em que o valor máximo de F foi igual a 2,05, na posição 82 cM. Resultados semelhantes foram obtidos por GRINDFLEK et al. (2001) que não encontraram QTL significativos para maciez subjetiva no cromossomo 4. Segundo BENEVENUTO JÚNIOR (2001), a maciez aumenta com o conteúdo de gordura intramuscular. Como foi encontrado um QTL sugestivo para GOINTR no presente estudo, era de se esperar que o mesmo estivesse afetando a maciez, o que não foi verificado. Neste caso, outros genes em outras regiões ou cromossomos podem estar segregando para a maciez da carne.

Nenhum QTL foi encontrado para perda por gotejamento (GOTEJ). O valor de F foi de 3,81 na posição 107 cM, portanto abaixo do nível para QTL sugestivo (Tabela 4 e Figura 2). Conforme MALEK et al. (2001), a perda por gotejamento mede a habilidade do músculo em reter umidade. A perda de umidade está, freqüentemente, associada com a firmeza e a cor da carne. ANDERSSON-EKLUND et al. (1998) também não encontraram QTL significativos para GOTEJ no cromossomo 4. De KONING et al. (2001), entretanto, ao estudarem uma população obtida do cruzamento entre animais da raça chinesa Meishan e linhagem comerciais, encontraram um QTL sugestivo para GOTEJ no cromossomo 4 na posição 32 cM. A característica GOTEJ está diretamente associada

com a magnitude do declínio do pH após o abate. Assim, era de se esperar que, caso fosse encontrado um QTL para pH₂₄, ele também estaria influenciando a perda por gotejamento.

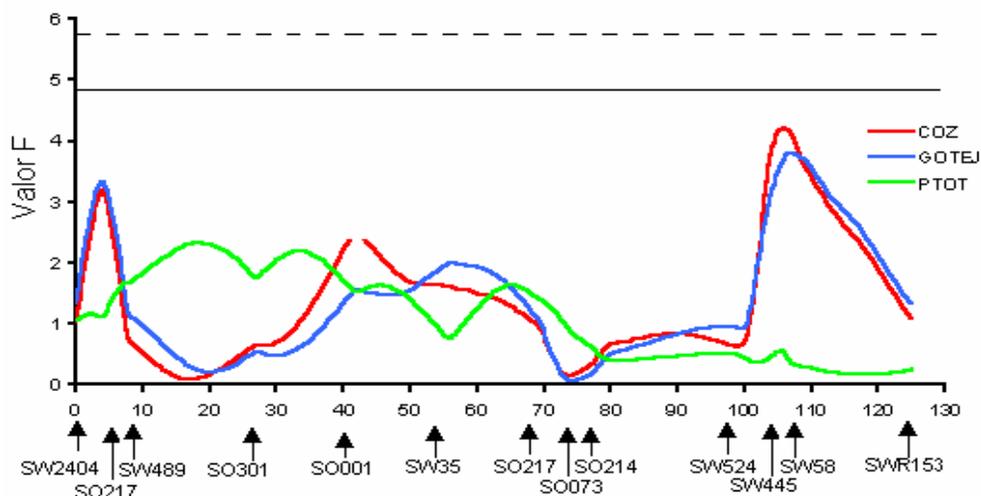


Figura 2 – Estimativas do valor de F para as características perda de peso por gotejamento (GOTEJ), perda por cozimento (COZ) e perda total (PTOT). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

As características perda por cozimento (COZ) e perda total (PTOT) apresentaram valores de F baixos, sendo de 4,31 (106 cM) e 2,33 (19 cM), respectivamente (Tabela 4 e Figura 2). Não foram encontrados QTL significativos ou sugestivos para estas características. Pode-se observar que as características GOTEJ e COZ apresentaram picos na mesma região, porém os valores da estatística F ficaram bem abaixo do sugestivo. Essa região apresenta pouca saturação de marcadores e outros devem ser incluídos para uma melhor caracterização. Não foram encontrados trabalhos na literatura consultada em que essas características foram estudadas.

Foi encontrado apenas um QTL para as características relacionadas à coloração de carne (Tabela 4 e Figura 3). A característica índice amarelo (B) apresentou um valor máximo de F igual a 5,44, indicando a presença de um QTL sugestivo ($P < 0,10$) na região a 3 cM. De acordo com MALEK et al. (2001), a cor é um dos parâmetros visuais mais importantes para a qualidade de carne e de grande influencia na aceitação do produto pelos consumidores. ÓVILO et al. (2002) também

encontraram um QTL para B no cromossomo 4, porém, na posição 89 cM. Nota-se que o QTL significativo encontrado para B na posição 3 cM coincide com o QTL significativo para GOINTR. Isso indica que o mesmo loco poderia estar influenciando esta característica. Não foi encontrado nenhum trabalho na literatura consultada descrevendo genes que estejam controlando essas duas características.

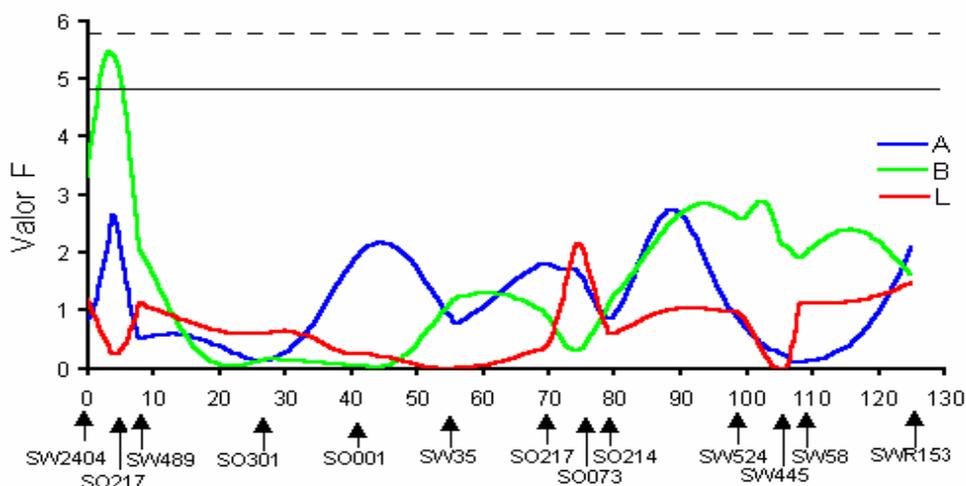


Figura 3 – Estimativas do valor de F para as características luminositade (L), índice de vermelho (A) e índice de amarelo (B). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

As características luminositade (L) e índice de vermelho (A) apresentaram valores máximos de F iguais a 2,12 (74 cM) e 2,74 (89 cM), respectivamente, sendo todos não significativos. WANG et al. (1998) também não encontraram QTL para cor ao investigarem os cromossomos 4, embora tenham usado valores de cor subjetivos. Em contrapartida, ÓVILO et al. (2002) encontraram QTL significativos para A e L no cromossomo 4, nas posições 89 e 109 cM, respectivamente. Estes autores afirmam que o índice de vermelho esta diretamente relacionado com o tipo de pigmento presente e ao tipo de fibra muscular.

Para as características índice de saturação (C) e de tonalidade (H) (Tabela 4 e Figura 4), verifica-se que os valores máximos da estatística F foram baixos, iguais a 2,61 (85 cM) e 2,69 (88 cM), respectivamente. A

ausência de QTL significativos ou sugestivos no cromossomo 4 para C e H também foi verificada por ÓVILO et al. (2002).

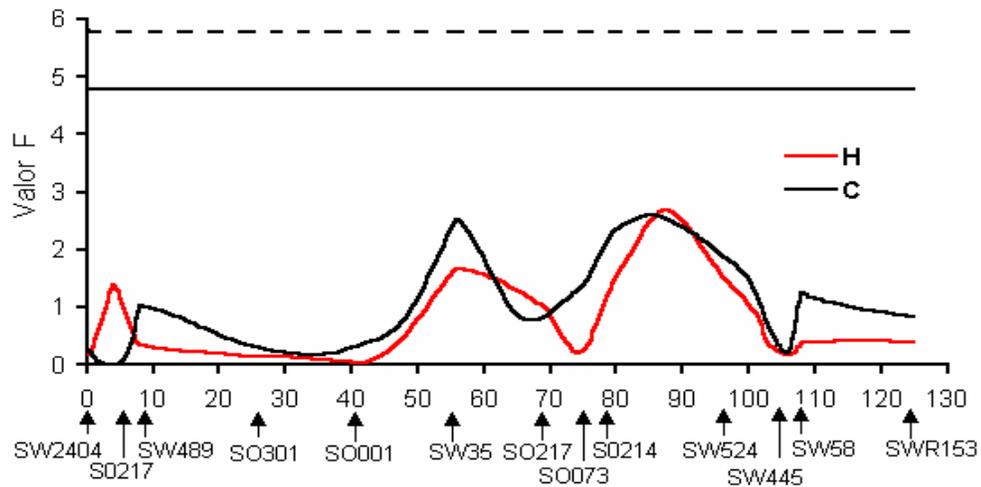


Figura 4 – Estimativas do valor de F para as características saturação (C) e tonalidade (H). As linhas horizontais indicam os níveis de significância ao longo do cromossomo para QTL significativo (5% = linha tracejada) e QTL sugestivo (10% = linha contínua).

Como não foi encontrado QTL significativo para as características relacionadas à coloração de carne no cromossomo 4, é de se esperar que os genes responsáveis pela maior parte do controle destas características estejam localizados em outros cromossomos, ou não estão segregando na população em estudo.

4. CONCLUSÕES

Para características de qualidade de carne foram encontrados dois QTL sugestivos ($P < 0,10$) no cromossomo 4. Um QTL foi associado a gordura intramuscular na posição 3 cM e o outro QTL a características de coloração da carne, mais especificamente ao índice de amarelo (B), também na posição 3 cM. Os genes responsáveis pela maior parte do controle das características de qualidade da carne estão localizados em outros cromossomos, ou não estão segregando nesta população.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON-EKLUND, L., MARKLUND, L. LUNDSTRÖM, K., HALEY, C.S., ANDERSSON, K., HANSSON, I., MOLLER, M., ANDERSSON, L.: Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a Wild Boar x Large White intercross. *Journal of Animal Science*, v.76, p.694- 700. 1998.
- BENEVENUTO JÚNIOR, A. A.: Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados. Dissertação de mestrado, 2001. Dep. de Tecnologia de Alimentos, UFV. 98p.
- BOX, G. E. P., COX, D. R.: An Analysis of Transformations, *Journal of the Royal Statistical Society*, 211-243, discussion 244-252. 1964.
- CHURCHILL, G.A., DOERGE, R.W.: Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, v.138, p.963-971, 1994.
- De KONING, D. J., JONSS, L. L. G., RATTINK, A. P., VAN GERS, P. A. M., De VRIES, B. J., GORENEN, M. A. N., VAN DER POEL J. J., DE GROOT, P. N., BRASCAMP, E. W., VAN ARENDONK J. A, M.: Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (SUS SCROFA). *Genetics*, v.12, p.1679-1690, 1999.
- DEKKERS, J. C. M., ROTHSCHILD, M. F., MALEK, M. M.: Potencial e Aplicação de Seleção Assistida por Marcadores para Qualidade de Carne. II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, 05 de novembro a 06 de dezembro de 2001 — *Via Internet*.
- FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F., de LEON, S., KHANNA, V.K., WEILER, J.L., O'BRIEN, P.J., MacLENNAN, D.H.: Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, v.253, p.448-451, 1991.

- GERBENS, F., JANSEN, A., VAN ERP, A.J., HARDERS, F., MEUWISSEN, T.H., RETTENBERGER, G., VEERKAMP, J.H., TE PAS, M.F.: The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs. *Mammalian Genome*, v.9, p.1022-6, 1998.
- GRINDFLEK, E., SZYDA, J., LIU, Z., LIEN, S.: Detection of quantitative trait loci for meat quality in a commercial slaughter pig cross. *Mammalian Genome*, v.12, p.299-304, 2001.
- HALEY, C.S., KNOTT, S.A., ELSE, J.M.: Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. *Genetics*, v.36, p.1195-1207, 1994.
- MALEK, M., DEKKERS, C.M.J., LEE, H.K., BAAS, T.J., ROTHSCHILD, M.F.: A molecular genome scan analysis to identify chromosomal regions influencing economic traits in the pig. II. Meat and muscle composition. *Mammalian Genome*, v.12, p.637-645, 2001.
- MARKLUND, L., NYSTROM, P.E., STERN, S., ANDERSSON-EKLUND, L., ANDERSSON, L.: Confirmed quantitative trait loci for fatness and growth on pig chromosome 4. *Heredity*. v.82. 134-141. 1999.
- MOLLER, M., FRIDA, B., RIQUET, J., POMP, D., ARCHIBALD, A., et al.: High-resolution comparative mapping of pig chromosome 4, emphasizing the *FAT1* region. *Mammalian Genome*, v.15, p.717-731, 2004.
- ÓVILO, C., CLOP, A., NOGUERA, J.L., OLIVER, M.A., BARRAGÁN, C., RODRÍGUEZ, C., SILIÓ, L., TORO, M.A., COLL, A., FOLCH, J.M., SÁNCHEZ, A., BABOT, D., VARONA, L., PEREZ-ENCIZO, M.: Quantitative trait locus for meat quality traits in an Iberian x Landrace F2 pig population. *Journal of Animal Science*, v.80, p.2801-2808, 2002.

- RATTINK, A. P., KONING, D. J., FAIVRE, M., HARLIZIUS, B., van ARENDONK, J. A. M., GROENEN, M. A. M.: Fine mapping and imprinting analysis for fatness trait QTLs in pigs. *Mammalian Genome*, v.11, p.656-661, 2000.
- ROTHSCHILD, M.F.: U.S. Pig gene mapping coordination program. 2003. Disponível em: <<http://www.genome.iastate.edu/pig>>. Acessado em: 20 de junho de 2005.
- SAS INSTITUTE INCORPORATION. SAS/STAT® user's guide: version 6. 4 ed. Cary, NC:2000.
- SEATON, G., HALEY, C. S., KNOTT, S. A., KEARSEY, M., VISSCHER, P. M.: QTL express: mapping quantitative trait loci in simple and complex pedigrees. *Bioinformatics*, v.18, n.2, p.339-340, 2002. Disponível em: <<http://qtl.cap.ed.ac.uk>>. Acessado entre 03 e 15 de junho de 2005.
- VEERKAMP, J. H., MAATMAN, R. G. H. J.: Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes. *Prog Lipid Res* 34, 17–52, 1995.
- WANG L., YU, T. P., TUGGLE, C. K., LIU, H. C., ROTSCHILD, M. F.: A direct search for quantitative trait loci on chromosomes 4 and 7 in pigs. *Journal of Animal Science*, v.76, p.2560-2567, 1998.