

Genoma de Bovinos: Mapeamento de Caracteres de Importância Econômica

Mário Luiz Martinez
Marco Antonio Machado*

1. Introdução

O melhoramento genético dos animais domésticos é baseado na seleção e multiplicação de animais superiores. Técnicas reprodutivas, tais como inseminação artificial e transferência de embriões, vem sendo utilizadas, visando aumentar o número de progênies de animais geneticamente superiores (Martinez *et al.*, 2000a). A inseminação artificial, por ser de mais simples execução, está sendo amplamente utilizada e tem provocado um grande impacto no melhoramento atual. A transferência de embriões é muito utilizada para aumentar o número de descendentes de fêmeas de genética superior. Recentemente, a manipulação e alteração do material genético, por meio de transferência nuclear, tem possibilitado a geração de animais transgênicos, que certamente irá provocar impactos ainda maiores no melhoramento animal. A identificação de indivíduos geneticamente superiores e o isolamento de genes são imperativos para os programas de melhoramento atuais e futuros. Nos últimos anos tem havido um grande progresso na área de genômica, com sequenciadores automáticos de DNA, robôs para manuseio de bibliotecas de DNA, computadores e programas na área de bioinformática, etc. Toda esta tecnologia vai, com certeza, causar forte impacto no melhoramento animal.

Até recentemente, as decisões sobre seleção de animais de genética superior eram baseadas apenas em informações fenotípicas. Neste caso, a seleção é bastante efetiva para características simples, pois a variação fenotípica é controlada por poucos genes. A seleção para características mais complexas, tais como produção de leite e carne, é bem mais complicada pois a variação fenotípica é controlada por vários genes, o que diminui bastante a eficiência da seleção. Neste caso, a variação genética é de natureza quantitativa e os locos individuais que afetam a expressão da característica são denominados QTLs, do inglês, *Quantitative Trait Loci* (Geldermann, 1975).

As modernas técnicas da genética molecular permitem o desenvolvimento de mapas genéticos saturados e a identificação de marcadores para características quantitativas. O marcador molecular de DNA é uma técnica que permite detectar diferenças na sequência do DNA, possibilitando a seleção indireta para genes de interesse no melhoramento. O ganho genético, para características de difícil mensuração, baixa herdabilidade e limitadas pelo sexo, poderá ser aumentado com a utilização de marcadores moleculares no auxílio à seleção. A identificação individual ao nível molecular irá certamente contribuir para uma melhor utilização dos recursos genéticos. Estas novas ferramentas moleculares, baseadas na tecnologia do DNA, irão possibilitar entender a biologia dos genes envolvidos nas características de interesse.

2. Mapas de Ligação

Cada célula nucleada no corpo possui duas cópias completas do material genético, uma de origem paterna e outra materna. O material genético é organizado em cromossomos, sendo

* EMBRAPA Gado de Leite - Rua Eugênio do Nascimento, 610 - Dom Bosco, Juiz de Fora - MG, 36038-330.
E-mail: martinez@cnpqgl.embrapa.br; machado@cnpqgl.embrapa.br

que um conjunto completo de cromossomos é denominado genoma. O genoma de bovinos é constituído de 30 cromossomos.

O primeiro passo para pesquisa em genoma é o desenvolvimento de um mapa de ligação saturado que requer um grande número de marcadores moleculares. Os marcadores moleculares mais utilizados na área genômica são chamados microssatélites, que são pequenas seqüências repetidas de DNA de 1 a 5 pares de base. O polimorfismo é devido a um número variável destas repetições que cada indivíduo possui. Os microssatélites são analisados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (Mullis e Fallona, 1987) e o polimorfismo é detectado como diferenças nos tamanhos dos produtos de amplificação numa eletroforese em gel (Primrose, 1995). Estes marcadores podem se localizar dentro ou próximo a um gene, mas a maioria deles está localizada em segmentos isolados de DNA.

Um mapa genético é construído pela análise de segregação de uma família, ou seja, a herança dos marcadores genéticos é traçada a partir dos progenitores heterozigotos para a progênie. Por meio da genotipagem dos pais e da progênie de uma família, em relação a um par de marcadores, é possível determinar se eles estão sendo herdados ligados num mesmo cromossomo, ou independentemente, em cromossomos diferentes. Se um dos progenitores é heterozigoto para ambos marcadores, a informação sobre ligação e recombinação pode ser obtida a partir da distribuição dos marcadores entre os indivíduos da progênie. Desta maneira, os marcadores são utilizados para determinar se uma região do cromossomo é de origem paterna ou materna. Se os cromossomos fossem transmitidos como uma única unidade, dos progenitores para a progênie, seria necessário apenas um marcador para cada cromossomo. No entanto, os cromossomos são quebrados e recombinados durante a meiose, originando uma mistura de segmentos paternos e maternos para formar os cromossomos da progênie. Este evento é denominado recombinação que é avaliado usualmente em centimorgan (cM), sendo que 1 cM \approx uma recombinação em 100 eventos de meiose. A quantidade de recombinação num genoma pode ser utilizada para determinar o tamanho de um genoma, que em bovinos é de aproximadamente 3.000 cM.

Embora qualquer estrutura de população possa ser usada para mapear marcadores polimórficos, é muito importante que os progenitores sejam os mais heterozigotos possíveis e a progênie em maior número possível. Grandes famílias de meio-irmãos (como em rebanhos de gado de leite) ou mesmo populações experimentais F₂, produzidas com auxílio de múltipla ovulação e transferência de embriões, são comumente utilizadas para a geração de mapas de ligação. Os primeiros mapas de bovinos foram elaborados em 1994 (Barendse *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 1994). Um mapa mais saturado, de segunda geração, com 1.425 marcadores, foi produzido em 1997 (Kappes *et al.*, 1997; <http://sol.marc.usda.gov>).

O mapa genético de ligação possui inúmeros marcadores que podem ser utilizados para identificar regiões genômicas envolvidas com características de interesse. O mapa de ligação permite acompanhar a segregação de cada marcador dos progenitores para a progênie. Comparando a segregação dos marcadores com valores de médias obtidas, de cada indivíduo da progênie, para uma característica fenotípica de interesse, é possível encontrar associações entre marcadores e a característica. Desta forma são identificadas regiões no genoma associadas com características fenotípicas de interesse (Lander & Botstein, 1986).

3. Identificação de Locos de Interesse Econômico (ETLs)

Existem dois procedimentos que são utilizados para detectar associações entre marcadores e características de interesse econômico (ETLs – *Economic Trait Loci*). Um procedimento, denominado varredura com marcadores, baseia-se na genotipagem de todo o genoma com marcadores distribuídos ao longo dos cromossomos e são estabelecidas associações entre alelos específicos do marcador e variação para a característica fenotípica. Outro

procedimento, denominado gene candidato (Rothschild & Soller, 1997), baseia-se no estudo da variação fenotípica para uma característica, em relação ao nível de polimorfismo de DNA, na seqüência de genes previamente conhecidos por estarem envolvidos na fisiologia e desenvolvimento da característica.

Quando são encontradas associações entre marcadores e características de interesse, a seleção pode ser realizada com base nos marcadores. A seleção assistida por marcadores (MAS – *Marker Assisted Selection*) pode trazer inúmeras vantagens aos melhoristas. Touros jovens podem ser selecionados, para marcadores específicos, logo após o nascimento. Desta maneira, os animais de alto mérito genético são mantidos no programa, enquanto os animais de baixo mérito genético podem ser descartados, evitando o custo de manutenção destes animais por vários anos. Com a seleção assistida por marcadores, é possível combinar ETLs de duas ou mais raças numa única raça que irá possuir todas as características combinadas. Apesar das vantagens que a seleção assistida por marcadores possibilita, é aconselhável que ela seja realizada associada à seleção fenotípica para minimizar a chance de descarte de um animal que possua um alto potencial genético, devido a uma possível associação inconsistente entre marcador e característica fenotípica.

3.1. Varredura do genoma com marcadores anônimos

A varredura do genoma é um método que tem demonstrado ser bastante efetivo na detecção de ETLs. Para detectar associações, é necessário genotipar uma população segregante para a característica a ser mapeada. Em bovinos, para se ter uma boa cobertura de todo o genoma, é aconselhável genotipar a população segregante com cerca de 150 a 200 marcadores, o que representa uma densidade de um marcador para cada 20 cM (Soller e Andersson, 1998). Quanto maior a população utilizada, mais eventos de recombinação meiótica ocorreram, o que acarreta maior poder de resolução do mapeamento para a característica de interesse. Cada animal da população é genotipado e avaliado fenotipicamente para as características de interesse. Os dados fenotípicos e genotípicos são combinados visando detectar marcadores significativos.

Apesar deste procedimento ser bastante eficiente na detecção de ETLs, ele apresenta algumas dificuldades. É um processo bastante demorado e com um custo elevado para genotipar centenas de indivíduos com marcadores cobrindo o genoma inteiro. Outro ponto a considerar é que a densidade de um marcador para cada cM é suficiente para detectar ETLs. No entanto, esta resolução ainda é baixa, o que dificulta o isolamento dos genes que estão presentes na região detectada pelos marcadores (Haley, 1999).

Vários trabalhos têm demonstrado que a estratégia de varredura do genoma é bastante eficiente na identificação de ETLs em bovinos. O grupo de pesquisa do ARS-USDA (Serviço de Pesquisa em Agricultura do Departamento de Agricultura dos estados Unidos) vem se destacando nesta área, tendo publicado vários trabalhos tanto em gado de leite (BARC – *Beltsville Agriculture Research Center*) quanto em gado de corte (MARC – *Meat Animal Research Center*).

Várias regiões genômicas, que contêm locos de importância econômica, foram encontradas em gado de leite. ETLs foram identificados para contagem de células somáticas, gordura, proteína e produção de leite (Ashwell *et al.*, 1997). Características reprodutivas, contagem de células somáticas, tipo leiteiro (Ashwell *et al.*, 1998a). Uma região no cromossomo 27, perto do marcador BM203, foi encontrada afetando significativamente tipo leiteiro e produção de leite, o que mostra uma inter-relação entre estas duas características. No cromossomo 23 foi encontrada uma região afetando profundidade de úbere e contagem de células somáticas. No cromossomo 9 foi encontrada uma região afetando conformação de pés e pernas (Ashwell *et al.* 1998b). Uma varredura no genoma com 70 marcadores foi utilizada para mapear 30 características fenotípicas (21 para conformação, 5 para leite, 2 para ordenha,

contagem de células somáticas, reprodução). Nove regiões foram detectadas: 4 regiões para conformação, nos cromossomos 4, 5, 14 e 23; 2 regiões para porcentagem de proteína, nos cromossomos 6 e 14; 3 regiões com efeito sobre características reprodutivas, nos cromossomos 2, 21 e 23 (Ashwell *et al.*, 1999). Seguindo o mesmo trabalho, foram utilizadas diferentes populações incluindo um total de 105 marcadores (35 novos) e 38 características fenotípicas e 16 características canônicas derivadas. Foram encontradas novas associações entre famílias específicas. Novos marcadores estão sendo adicionados para identificar, nestas diferentes populações, os ETLs identificados previamente (Van Tassell *et al.*, 2000). Uma genotipagem realizada no cromossomo 6, com marcadores microssatélites e com haplótipos do gene da caseína, sugere que existem duas regiões com efeito na produção de leite (Velmalala *et al.*, 1999). Ainda no cromossomo 6, foram detectadas regiões associadas aos terores de proteína e gordura do leite. No entanto este experimento não detectou ETLs para produção de leite, provavelmente porque a população utilizada não segregava para esta característica (Kühn *et al.*, 1999). Uma análise realizada em várias famílias indicou uma forte evidência de um ETL para produção de leite, localizada na extremidade telomérica do cromossomo 20 (Arranz *et al.*, 1998). Novas famílias foram utilizadas para confirmar a presença de ETLs para porcentagem de gordura no leite. Os resultados indicam consistência de uma região, próxima ao gene da amilase sérica-1, no cromossomo 4 (Lindersson *et al.*, 1998).

Vários trabalhos com ETLs têm sido realizados em gado de corte. Foi identificado um loco, perto do centrômero do cromossomo 2, que causa a musculatura dupla em bovinos (mh) (Smith *et al.*, 1998). Animais com a presença do alelo mh apresentaram baixos valores para marmorização, produtividade, espessura de gordura e gordura no coração, se comparados aos animais sem o alelo mh. Animais heterozigotos para o alelo mh apresentam uma carcaça mais pesada e melhor se comparado aos animais homozigotos para este alelo (Casas *et al.*, 1998). Animais da raça Piedmontese, homozigotos para o alelo mh, foram avaliados visando estudar a influência deste loco em caracteres como facilidade ao parto, peso ao nascimento, na desmama e com um ano de idade. Para peso ao nascimento, animais heterozigotos foram mais pesados que animais homozigotos. Para facilidade ao parto, animais homozigotos foram ligeiramente superiores. Animais heterozigotos foram mais pesados na desmama e com um ano de idade se comparados aos homozigotos (Casas *et al.*, 1999). Outro estudo foi realizado, visando detectar ETLs adicionais em populações segregantes para uma forma inativa do alelo mh. Foram detectados ETLs, para profundidade de gordura e produtividade, no cromossomo 5. No cromossomo 29 foi encontrada uma região relacionada à maciez da carne. Os resultados indicam que mesmo em famílias segregantes para formas inativas do alelo mh, outras regiões estão influenciando estas características (Casas *et al.*, 2000). Devido ao grande número de genotipagens de animais para o loco da musculatura dupla (mh), foi desenvolvida uma técnica baseada em PCR, que detecta genótipos mh/mh, mh/-, -/- (Fahrenkrug *et al.*, 1999). Uma população segregante de 300 animais, do cruzamento de um touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) com vacas *Bos taurus*, foi utilizada para detectar associações para características de carcaça e crescimento. Foi encontrada uma região, no cromossomo 5, associada ao aumento de músculo na costela e à diminuição na porcentagem de gordura de cobertura (Stone *et al.*, 1999). Uma varredura no genoma com 196 marcadores foi utilizada para estudar regiões afetando maciez de carne. Um ETL no cromossomo 15 foi detectado para maciez da carne com 14 dias após abate, em apenas um grupo de abate, dos quatro grupos utilizados no experimento. Os autores alegam que a variação ambiental é bastante acentuada em experimentos para maciez de carne, o que mascarou o efeito do ETL nos outros grupos de abate (Keele *et al.*, 1999).

3.2. Genes candidatos

O procedimento de genes candidatos utiliza informações prévias sobre a função e fisiologia de genes previamente identificados nos mapas de Humanos e Camundongos, visando identificar mutações específicas em genes homólogos no genoma de animais. Uma vantagem desta metodologia em relação à varredura com marcadores anônimos, é que, uma vez detectado um ETL, não é necessária a execução de mapeamento posicional, que é um processo bastante demorado e trabalhoso (Rothschild & Soller, 1997).

Para detectar associações entre o gene candidato e a característica de interesse, é necessário encontrar formas alternativas do gene, resultantes de mutações de ponto na sequência do gene. É necessário sequenciar um grupo de indivíduos de uma população segregante para encontrar os polimorfismos na sequência do gene, denominados haplótipos. Existem técnicas que são utilizadas para detectar essas mutações de ponto na sequência do gene candidato, que eliminam a necessidade de sequenciar cada indivíduo da população segregante. A técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição) (Mullis *et al.*, 1987; Botstein *et al.*, 1980) e a técnica de ssCP (*single stranded Conformation Polymorphism*) (Orita *et al.*, 1989) são técnicas bastante utilizadas para detecção de mutações na sequência do gene candidato (Olsen *et al.*, 2000; Drögemüller *et al.*, 2000; Damiani *et al.*, 2000). A associação do gene com a característica fenotípica é realizada pela comparação dos vários haplótipos com o fenótipo para a característica de interesse de cada indivíduo da população segregante.

Esta metodologia já foi utilizada para detectar ETLs potenciais para várias características. No entanto, grande parte dos estudos utilizaram um baixo poder estatístico, pois estes experimentos foram realizados com populações sem estrutura de família. Frequentemente nos estudos de genes candidatos, é considerado um nível de significância nominal, que é apropriado para um único experimento. Lander e Kruglyak (1995) sugerem que deveriam ser realizados vários estudos para um mesmo gene candidato. Desta forma, o nível de significância seria comparado aos obtidos com experimentos de varredura do genoma.

Um estudo realizado em dois rebanhos de gado holandês (Zanotti *et al.*, 1996) indicou uma associação entre alelos do gene do antígeno de linfócito de bovino – BoLA com uma maior resistência à infecção causada pelo vírus da leucemia bovina – BLV. Foi encontrada uma associação de haplótipos gerados, por ssCP, do gene de hormônio do crescimento – bGH com porcentagem de proteína do leite numa população de gado de leite de Israel (Lagziel *et al.*, 1996). Rebanhos das raças Holandesa e raça Jersey foram examinados para polimorfismos do segundo exon do gene BoLA-DRB3, usando a técnica de PCR-RFLP. Foram encontradas associações entre contagem de células somáticas e alelos do gene BoLA (Sharif *et al.*, 1998a). Os mesmos polimorfismos do gene BoLA-DRB3 foram avaliados em relação a características de produção de leite. Em animais da raça Holandesa, verificou-se que o alelo *8 estava significativamente associado com aumento da produção de leite aos 305 dias, proteína e gordura do leite (Sharif *et al.*, 1998b). Análise de ssCP do gene do hormônio do crescimento (bGH) em rebanhos de gado Holandês de Israel revelou a presença de cinco haplótipos diferentes. Animais heterozigotos para o alelo E (+/-) apresentaram um aumento significativo na porcentagem de proteína, se comparado aos animais homozigotos (+/+) (Lagziel *et al.*, 1999).

A metodologia de genes candidatos é dependente do conhecimento prévio da função de genes. No entanto, apenas cerca de 8% dos genes de Humanos e Camundongos têm a sua função conhecida. Com o programa do genoma Humano, o conhecimento a respeito da biologia e função dos genes será bastante acelerado, o que irá facilitar sobremaneira a utilização da metodologia de genes candidatos.

4. Análise de Locos de Importância Econômica – ETLs

Vários procedimentos estatísticos foram desenvolvidos, bem como programas específicos foram elaborados, visando estudar a associação de dados moleculares com informações fenotípicas.

4.1. Dados experimentais

A maioria dos estudos de ETLs, em animais domésticos, são baseados em cruzamentos entre raças geneticamente diferentes, tais como as raças de porcos Meishan e Européias, ou linhagens de aves de corte e postura. Para essas situações tem-se verificado que as análises utilizando o método dos quadrados mínimos (LS), baseadas, no mapeamento por intervalo, proporciona um alto poder estatístico para a detecção de ETLs e grande precisão nas estimativas (Anderson *et al.*, 1994; Halley *et al.*, 1994). A análise de uma família com três gerações (avos, pais F_1 e progênie F_2) com informações genotípicas permite seguir a herança dos alelos dos marcadores de uma maneira fácil e direta. A análise por LS permite que se ajuste um modelo genético para os padrões herdados, seja dentro de famílias (Knott *et al.*, 1996, 1997) ou entre famílias (Halley *et al.*, 1994).

As análises baseadas no método da Máxima Verossimilhança (ML) são também possíveis de serem utilizadas em dados com esta estrutura de famílias, assim como é comum para as análises de dados provenientes dos cruzamentos entre linhagens consanguíneas (Lander & Botstein, 1989). Em tais situações, tem-se verificado que os métodos LS e a ML apresentam resultados semelhantes (Halley & Knott, 1992).

Uma pressuposição comumente feita nas análises de dados provenientes de cruzamentos entre duas populações é que os alelos alternativos do ETL estão fixos nas populações, ou seja, um alelo a_1 está fixo na população X e o alelo alternativo a_2 está fixo na população Y. Esta simplificação é um ponto inicial muito útil para as análises, e se for verdadeira, proporciona uma análise dos dados com alto poder de detecção de ETLs. Mesmo quando esta pressuposição é falsa, e uma ou ambas as populações estão segregando para aquele ETL, o uso daquela pressuposição ainda proporciona uma análise com grande poder de detecção do ETL se a frequência dos alelos alternativos entre as populações forem bem diferentes (Alfonso & Halley, 1998). Todavia, Perez – Enciso & Varanda (2000) sugerem para estes casos uma análise utilizando-se de um modelo misto, considerando as diferenças de médias entre as duas populações (efeito fixo) e a variação dentro das populações (efeito aleatório), para se obterem estimativas dos efeitos do ETL com menores vícios e com maior poder estatístico. Em análises em população segregante derivada de acasalamentos de indivíduos pertencentes a famílias diferentes dentro da mesma população, é muito comum se verificar que o ETL que parece ter um efeito significativo dentro da população não apresenta efeito significativo em todas as famílias que compõem aquela população que foi analisada. Isto é visto em alguns casos como uma evidência de um ETL que não estava segregando em todas as populações parentais. Em tais situações é necessário verificar se as diferenças entre famílias são realmente significativas. Nas análises por LS, pode-se testar essas diferenças, verificando-se a significância da interação entre o efeito do ETL e a família (Walling *et al.*, 1998).

É importante enfatizar que os cruzamentos entre populações são delineados para se detectar ETLs que diferem entre as populações, e que tem um poder estatístico limitado para se detectar ETLs que estejam segregando dentro das populações que foram cruzadas (Halley, 1999). Assim sendo, é incerta qual é a proporção de ETLs que são detectados nos cruzamentos que também estariam segregando dentro das populações parentais (populações de animais de raças puras).

4.2. Dados de populações comerciais

Enquanto tem havido um grande esforço para mapear ETLs com base no cruzamento entre linhagens divergentes de animais domésticos, têm ocorrido também alguns estudos para se detectar ETLs dentro de populações de animais puros (Georges *et al.*, 1995). Isto tem ocorrido principalmente em gado de leite, em que populações cruzadas de interesse (Retrocruzamento ou F2) são difíceis e demoradas para se obterem. As populações derivadas de cruzamentos entre linhagens geneticamente divergentes têm a vantagem de permitir o uso de uma análise estatística mais simples e possibilitam um maior poder estatístico para se detectar ETLs que as populações puras, quando se considera o mesmo número de indivíduos medidos. Os estudos dentro das populações puras, por outro lado, não necessitam do planejamento dos acasalamentos. Estão em geral disponíveis, têm um custo relativamente baixo para a obtenção das informações e podem conter ETLs segregando que sejam de interesse imediato para os programas de melhoramento. A análise destas populações é muito importante, pois o número delas é grande, desde aquelas com pequeno número de famílias e *pedigrees* simples, até aquelas que se expandem por várias gerações e que contêm relações de *pedigrees* complexos e informações perdidas. As análises destas últimas populações podem ser bastante complicadas e ainda não há uma metodologia que possa ser considerada ideal. Assim, um número grande de métodos tem sido desenvolvido com baseados nos métodos LS, na ML e na cadeia de Markov – Monte Carlo, ou mesmo uma mistura destes. Estes métodos refletem as diferentes filosofias dos pesquisadores que os desenvolvem, e representam uma troca entre simplicidade, velocidade de processamento, poder estatístico e precisão.

Hoeschele *et al.* (1997) fez uma excelente revisão dos procedimentos alternativos para a análise de ETLs em populações puras. O resumo desta revisão sugere que os procedimentos ou métodos baseados no LS é um bom primeiro passo para as análises de ETLs. Estes métodos são geralmente precisos, freqüentemente têm poder estatístico tão bom quanto os métodos mais complexos (Knott *et al.*, 1996) e a velocidade de processamento permite que se usem as análises de permutação e “bootstrap” para se obterem o nível de significância e intervalos de confiança. Todavia, a aplicação de métodos de análise simples (por ex. os baseados no método dos quadrados mínimos) está limitado a *pedigrees* simples. Embora *pedigrees* complexos possam ser divididos em componentes de famílias para permitir o uso de métodos tais como o da regressão de meio-irmãos (Knott *et al.*, 1996) ou análise de par de irmãos (Haseman & Elston, 1972; Hamann & Haley, 1998; Martinez *et al.*, 1999) o poder estatístico para detectar ETLs pode ser menor.

Para se analisar *pedigrees* complexos, ambos os procedimentos baseados na estimativa de componentes de variância e na análise Bayesiana podem ser empregados. Os procedimentos de estimação de componentes de variância foram desenvolvidos independentemente pelos geneticistas para análise de dados de humanos (Goldgar, 1990; Amos, 1994; Almasy & Blangero, 1998), e os geneticistas de animais domésticos (Xu & Atchley, 1995; Grignola *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1998). Ambos os grupos estimaram componentes de variância pelo ML ou REML. Neste procedimento a informação do marcador em um determinado ponto do genoma é utilizada para se obter as estimativas da proporção de genes idênticos por descendência (IBD) entre indivíduos do *pedigree*. A matriz de parentesco obtida é utilizada para se estimar (via ML ou REML) a variância em virtude daquele segmento ou ponto do genoma no qual o marcador se localiza, assim como a variância poligênica (devido aos demais ETLs que possam afetar a característica em estudo). A obtenção das relações (coeficientes IBD) entre indivíduos para um determinado ponto no genoma é relativamente simples, se os marcadores são totalmente informativos e os *pedigrees* são simples (Martinez & Vukasinovick, 2000). Normalmente, isto não é o mais comum, além de freqüentemente haver indivíduos nos *pedigrees* que não tem seus genótipos conhecidos. Dessa forma, para *pedigrees* complexos pode ser necessário se usar o procedimento das cadeias de Markov – Monte Carlo para estimar estes coeficientes.

O procedimento baseado na análise Bayesiana tem uma série de vantagens teóricas, tais como a possibilidade de incluir na análise, como um parâmetro desconhecido, o número de ETLs em um cromossomo e se obter a distribuição marginal posterior deste parâmetro. Este método possibilita também extrair mais informações dos dados que os outros procedimentos e pode ser menos vulnerável ao viés por causa do efeito da seleção nas populações (Hoeschele *et al.*, 1997), que é um ponto importante nas populações comerciais de animais domésticos. Todavia, apesar de algumas aplicações bem sucedidas (Hoeschele *et al.*, 1997), a utilização deste procedimento em *pedigrees* complexos permanece ainda como um desafio e os problemas associados a convergência, reducibilidade e mistura de *pedigrees* precisam ainda ser melhor explorados.

Em síntese, os métodos simples baseados no LS são bons procedimentos para as análises iniciais confiáveis em populações puras. Os procedimentos baseados na estimação de componentes de variância também parecem ter bom poder estatístico e fornecem estimativas confiáveis nas análises de ETLs, e começam a mostrar o seu valor nas análises de *pedigrees* complexos. As análises Bayesianas ainda não se mostraram eficientes nas análises de *pedigrees* complexos.

4.3. Outros tipos de análises

A grande maioria das análises reportadas na literatura têm sido baseadas na análise de uma única característica. Todavia vários autores já têm indicado as vantagens das análises de múltiplas características simultaneamente. Essas vantagens incluem o aumento do poder estatístico para detectar ETLs, aumento da precisão no mapeamento do ETL e na habilidade para se testar a ligação entre ETL e o marcador versus o efeito pleiotrópico, em que o ETL aparentemente localizado na mesma região afeta duas características diferentes (Jiang & Zeng, 1995).

Uma razão para que os procedimentos baseados na análise de múltiplas características não estejam sendo usados com maior frequência, provavelmente está relacionado com a complexidade estatística das análises. Além disto, não está ainda muito claro como proceder nas análises de dados contendo medições de muitas características, isto é, deve-se começar com análises de uma única característica ou com análise de múltiplas características, considerando que há ETLs afetando todas as características? Todavia, o ganho potencial que se pode obter com a análise de múltiplas características é de tal ordem que o seu uso deve tornar-se bem comum à medida que se aumentem as experiências com este tipo de análise e os programas se tornem disponíveis. Neste sentido, Korol (comunicação pessoal) desenvolveu recentemente um software baseado no cruzamento de linhagens consanguíneas que realiza diversos tipos de análises baseadas em características múltiplas, até considerando-se as possíveis interações entre genótipos e meio ambiente. Este software encontra-se disponível no site www.multiqtl.com.

5. Isolamento de Genes

O número de marcadores moleculares disponíveis nos mapas de ligação de bovinos aumentou bastante nos últimos anos. Vários ETLs foram identificados, mas somente alguns poucos genes foram isolados (Smith *et al.*, 1997; Rijnkels *et al.*, 1997). Esses genes foram isolados utilizando informações sobre a fisiologia de genes homólogos de Humanos e Camundongos. O grande desafio dos geneticistas é identificar novos genes, visando atender à grande demanda do setor agropecuário. Atualmente, a maneira mais indicada para o isolamento de genes é por meio de clonagem posicional utilizando mapeamento comparativo (Kappes, 1999). Esta metodologia pode ser dividida em três etapas:

- Genotipar grandes famílias, utilizando marcadores distribuídos por todo o genoma, visando identificar regiões significativamente associadas a caracteres de interesse. Uma vez identificada uma região, é necessário realizar experimentos de validação e mapeamento fino da região, visando estreitar a frequência de recombinação entre o marcador e a característica, para valores menores de 2 cM.
- Produzir bibliotecas de cDNA, que permitam obter clones contíguos de DNA, nos quais os genes irão estar contidos.
- Identificar as seqüências codificantes presentes nos clones contíguos selecionados. Uma estratégia é utilizar o mapeamento comparativo com banco de dados de Humanos e Camundongos que irão auxiliar sobremaneira a identificação do gene em questão.

Os programas do genoma de Humanos e Camundongos vão ajudar identificar ETLs em bovinos, pois estes mapas possuem muito mais genes mapeados e as regiões são conservadas entre essas espécies. Um grande número de genes que estão sendo mapeados em Humanos e Camundongos são resultantes do mapeamento de ESTs (Expressed Sequence Tags), que são pequenas seqüências do DNA de genes oriundos de bibliotecas de cDNA. Os ESTs são muito importantes para o mapeamento comparativo, devido à grande similaridade de seqüência de genes homólogos entre os mamíferos. Uma vez identificado um ETL no genoma de bovino, são selecionados genes de regiões homólogas nos mapas de Camundongos e Humanos, que são utilizados para identificar clones homólogos no genoma de bovinos. Esses clones são parcialmente seqüenciados e mapeados no genoma de bovino. Se esses genes de bovino mapearem na região previamente identificada pelo ETL, faz-se o seqüenciamento desses genes em vários animais da população segregante, visando encontrar mutações de ponto na seqüência do DNA. A próxima etapa é verificar se a variação na seqüência do gene está associada ao fenótipo de interesse. Um exemplo recente dessa metodologia iniciou-se com o mapeamento do gene da musculatura dupla (mh) em bovinos (Charlier *et al.*, 1995). O mapeamento deste loco foi refinado para o final centromérico do cromossomo 2 (Casas *et al.*, 1998). Foi identificada uma deleção no gene da miostatina (GDF-8), que provoca hipertrofia muscular em camundongos, semelhantemente ao gene mh em bovinos (McPherron *et al.*, 1997). O gene de camundongo foi utilizado para identificar um clone homólogo bovino, que foi seqüenciado e mapeado no final centromérico do cromossomo 2 (Smith *et al.*, 1997). Mutações afetando a função do gene da miostatina em bovinos foram identificadas em raças específicas contendo a musculatura dupla (Kambadur *et al.*, 1997).

Mesmo com esta metodologia, ainda assim é difícil garantir se o gene identificado é realmente o gene responsável pelo fenótipo estudado, ou se este gene está ligado ao verdadeiro gene. Clones genômicos contendo o gene candidato podem ser injetados em embriões de camundongos mutantes, para determinar se ocorre reversão do fenótipo mutante nas progênes (Antoch *et al.*, 1997). Teoricamente, o mesmo pode ser realizado em bovinos, no entanto, a eficiência dos métodos de produção de bovinos transgênicos ainda precisa ser melhorada para tornar viável este processo. A produção de animais transgênicos, além de ser importante para determinar com certeza a função de um gene candidato, é a maneira mais rápida de transferir genes entre raças visando à produção de populações com diversas características para atender à demanda do setor agropecuário.

6. Literatura Consultada

ALFONSO, L.; HALEY, C. Power of different F₂ schemes QTL detection in livestock. **Animal Science**, v. **66**, p.1-8, 1998.

ALMASY, L.; BLANGERO, J. Multipoint quantitative-trait linkage analysis in general pedigrees. **American Journal of Human Genetics**, v.**62**, p.1198-1211,1998.

AMOS, C.I. Robust variance-components approach for assessing genetic linkage in pedigree. **American Journal of Human Genetics**, v.**54**, p.535-543, 1994.

ANDERSON, L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H.; KNOTT, S.A.; JOHANSSON, M.; ANDERSON, K.; ANDERSSON-EKLUND, L.; EDFORS-LILJA, I.; FREDHOLM, M.; HANSSON, I.; HAKANSSON, J.; LUNDSTRÖN, K. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.**263**, p.1771-1774, 1994.

ANTOCH, M.P.; SONG, E-J.; CHANG, A.-M.; VITATERNA, M.H.; ZHAO, Y.; WILSBACHER, L.D.; SANGORAM, A.M.; KING, D.P.; PINTO, L.H.; TAKAHASHI, J.S. Functional identification of the mouse circadian clock gene by transgenic BAC rescue. **Cell**, v. **89**, p.655-667, 1997.

ARRANZ, J.J.; COPPIETERS, W.; BERZI, P.; CAMBISANO, N.; GRISART, B., KARIM, L., MARCQ, F.; MOREAU, L.; MEZER, C.; RIQUET, J.; SIMON, P.; VANMANSHOVEN, P.; WAGENAAR, D.; GEORGES, M. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. **Animal Genetics**, v.**29**, p. 107-115, 1998.

ASHWELL, M.S.; DA, Y.; VAN TASSELL, C.P.; VANRADEN, P.M; MILLER, R.H.; REXROAD JR, C.E. Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and type traits in a United States Holstein population. **Journal of Dairy Science**, v.**81**, p.3309-3314, 1998a.

ASHWELL, M.S.; DA, Y.; VANRADEN, P.M.; REXROAD JR, C.E.; MILLER, R.H. Detection of putative loci affecting conformation type traits in an elite population of United States Holsteins using microsatellite markers. **Journal of Dairy Science**, v.**81**, p.1120-1125, 1998b.

ASHWELL, M.S.; REXROAD JR, C.E.; MILLER, R.H.; VANRADEN, P.M.; DA, Y. Detection of loci affecting milk production and health traits in na elite US Holstein population using microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. **28**, p. 216-222, 1997.

ASHWELL, M.S.; VAN TASSELL, C.P. Detection of putative loci affecting milk, health, and type traits in a US Holstein population using 70 microsatellite markers in a genome scan. **Journal of Dairy Science**, v.**82**, p.2497-2502, 1999.

BARENDSE W.; ARMITAGE, S.M.; KOSSAREK, L.; KIRKPATRICK, B.W.; RYAN A.M.; SHALOM, A.; CLAYTON, D.; LI L.; NEIBERGS, H.; NAN Z.; GROSSE, M.; CREIGHTON, P.; McCARTHY, F.; RON M.; SOLLER, M.; FRIES, R.; McGRAW, R.A.; MOORE, S.S.; TEALE, A.; GEORGES, M.; WOMACK, J.E.; HETZEL, D.J.S. A preliminary map of the bovine genome. **Nature Genetics**, v.**6**, p. 227-235, 1994.

BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; SUNDEN, S.L.F.; HAWKINS, G.A.; SOLINAS TOLDO, S.; FRIES, R.; GROSZ, M.D.; YOO, J.; BEATTIE, C.W. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, v.136, p. 619-625, 1994.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v.32, p. 314-331, 1980.

CASAS, E.; KEELE, J.W., SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.L.; KAPPES, S.M.; STONE, R.T. Association of the muscle hypertrophy locus with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.468-473, 1998.

CASAS, E.; KEELE, J.W.; FAHRENKRUG, S.C.; SMITH, T.P.L.; CUNDIFF, L.V.; STONE, R.T. Quantitative analysis of birth, weaning, and yearling weights and calving difficulty in Piedmontese crossbreeds segregating an inactive myostatin allele. **Journal of Animal Science**, v. 77, p.1686-1692, 1999.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S.D.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v.78, p.560-569, 2000.

CHARLIER, C.; COPPIETERS, W.; FARNIR, F.; GROBET, L.; LEROY, P.L.; MICHAUX, C.; MNI, M.; SCHWERS, A.; VANMANSHOVEN, P.; HANSET, R.; GEORGES, M. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. **Mammalian Genome**, v. 6, p. 78-792, 1995.

DAMIANI, G.; FLORIO, S.; BUDELLI, E.; BOLLA, P.; CAROLI, A. HpaII PCR-RFLP within a Bov-A2 element in the promoter region of the bovine CYP21 (steroid 21-hydroxylase) gene. **Animal Genetics**, v.31, p. 154, 2000.

DROGEMULLER, C.; KEMPERS, A. A TaqI PCR-RFLP at the bovine myogenic factor (MYF5) gene. **Animal Genetics**, 31, p.146, 2000.

FAHRENKRUG, S.C.; CASAS, E.; KEELE, J.W.; SMITH, T.P.L. Technical note: direct genotyping of the double-muscling locus (*mh*) in Piedmontese and Belgian blue cattle by fluorescent PCR. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2028-2030, 1999.

GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theoretical and Applied Genetics**. v. 46, p. 319-330, 1975.

GEORGES, M.; NIELSEN, D.; MACKINNON, M.; MISHRA, A.; OKIMOTO, R.; PASQUINO, A.T.; SARGEANT, L.S.; SORENSEN, A.; STEELE, M.R.; ZAO, X.; WOMACK, J.E.; HOESCHELE, I. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, v.139, p.907-913, 1995.

GOLDGAR, D.E. Multipoint analysis of human quantitative genetic variation. **American Journal of Human Genetics**, v. 47, p. 957-967, 1990.

GRIGNOLA, F.E.; HOESCHELE, I.; TIER, B. Mapping quantitative trait loci via residual maximum likelihood: I Methodology. **Genetics Selection Evolution**, v.28, p. 479-490. 1996.

HALEY, C. **Advances in quantitative trait locus mapping**. In: From Jay Lush to Genomics: Visions for Animal Breeding and Genetics, Ames – IA, USA. Maio de 1999. Anais..., Ames – IA, USA. p. 47-59, 1999.

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.

HALEY, C.S.; KNOTT, S.A.; ELSESEN, J.M. Mapping quantitative trait loci in crosses between outbred lines using least squares. **Genetics**, v.136, p.1195-1207, 1994.

HAMANN, H.; HALEY, C.S. **Combining full and half-sib data in a sib pair linkage analysis**. In: The 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Armidale, N.S.W., 11-16 Janeiro de 1998. Anais..., Armidale, Austrália, 1998.

HASEMAN, J.K.; ELSTON, R.C. The investigation of linkage between a quantitative trait and a markers locus. **Behavioral Genetics**, v.2, p. 3-19, 1972.

HOESCHELE, I.; UIMARI, P.; GRIGNOLA, F.E.; ZHANG, Q.; GAGE, K.M. Advances in statistical methods to map quantitative trait loci in outbred populations. **Genetics**, v.147, p.1445-1457, 1974.

JIANG, C.; ZENG, Z-B. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci, **Genetics**, v.140, p.1111-1117, 1995.

KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T.P.L.; BASS, J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v.7, p. 910-915, 1997.

KAPPES, S.M. Utilization of gene mapping information in livestock animals. **Theriogenology**, v.51, p.135-147, 1999.

KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; STONE, R.T.; MCGRAW, R.A.; SONSTEGARD, T.S.; SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; BEATTIE, C.W. A second-generation map of the bovine genome. **Genome Res.**, v.7, p. 235-241, 1997.

KEELE, J.W.; SHACKELFORD, S.D.; KAPPES, S.M.; KOOHMARAIE, M.; STONE, R.T. A region on bovine chromosome 15 influences beef longissimus tenderness in steers. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1364-1371, 1999.

KNOTT, S.A.; ELSESEN, J.M.; HALEY, C.S. Methods for multiple marker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v.93, p.71-80, 1996.

KNOTT, S.A.; ELSESEN, J.M.; HALEY, C.S. Methods for multiple marker mapping of quantitative trait loci in outbred pedigree of loblolly pine. **Theoretical and Applied Genetics**, v.94, p.810-820, 1996.

KUHN, CH; FREYER, G; WEIKARD, R; GOLDMMER, T; SCHWERIN, M. Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of a specifically developed marker map of BTA6. **Animal Genetics**, v.30, p.333-340, 1999.

LAGZIEL, A.; LIPKIN, E.; EZRA, E.; SOLLER, M.; WELLER, J.I. An MspI polymorphism at the bovine growth hormone (bGH) gene is linked to a locus affecting milk protein percentage. **Animal Genetics**, v.30, p. 296-299, 1999.

LAGZIEL, A.; LIPKIN, E.; SOLLER, M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**, v.142, p. 945-951, 1996.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping complex genetic traits in humans: new methods using a complete RFLP linkage map. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** v.51, p.49-62, 1986.

LANDER, E.S.; BOTSTEIN, K. Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. **Genetics**, v.121, p.185-199, 1989.

LANDER, E.S.; KRUGLYAK, L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. **Nature Genetics**, v.11, p.241-247, 1995.

LINDERSSON, M.; ANDERSSON-EKLUND, L.; KONING, D.J. DE.; LUNDÉN, A.; MÄKI-TANILA, A.; ANDERSSON, L. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome 4. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1454-1461, 1998.

MARTINEZ, M.L.; FERREIRA, A. M.; MACHADO, M.A. Biotecnologia na agropecuária: tecnologias reprodutivas. **Informe Agropecuário**, v.21, p. 79-88, 2000.

MARTINEZ, M.L.; VUKASINOVIC, N. Algoritmo para cálculo da proporção de genes idênticos por descendência para mapear QTL em famílias de meio-irmãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.443-451, 2000.

MARTINEZ, M.L.; VUKASINOVIC, N.; FREEMAN, A.E. Estimating QTL location and QTL variance in half-sib families under the random model with missing parental genotypes. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.115, p.165-180, 1998.

MARTINEZ, M.L.; VUKASINOVIC, N.; FREEMAN, A.E. Random model approach for mapping QTL in half-sib families. **Genetics Selection Evolution**, v.31, p.319-340,1999.

MC PHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S-J.; Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-B superfamily member. **Nature**, v.387, p. 83-90, 1997.

MULLIS, K. B.; FALLONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v.155, p. 335-339, 1987.

OLSEN, H.G.; VAGE, D.I.; LIEN, S.; KLUNGLAND, H. A DNA polymorphism in the bovine c-kit gene. **Animal Genetics**, v.31, p.71, 2000.

ORITA, M.; SUSUKI, Y.; SEKIYA, T.; HAYASHI, K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. **Genomics**, v.5, p. 874-879, 1989.

PRIMROSE S.B. **Principles of genome analysis**. Blackwell Science, Oxford, 148 p. 1995.

RIJNKELS, M.; MEERSHOEK, E.; DE BOER, H.A.; PIEPER, F.R. Organization of the bovine casein gene locus. **Mammalian Genome**, v.8, p.148-152, 1997.

ROTHSCHILD, M.F; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v.8, p.13-20,1997.

SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; WILKIE, B.N.; SARGEANT, J.M.; SCOTT, H.M.; DEKKERS, J.C.M.; LESLIE, K.E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.29, p. 185-193, 1998a.

SHARIF, S.; MALLARD, B.A.; WILKIE, B.N.; SARGEANT, J.M.; SCOTT, H.M.; DEKKERS, J.C.M.; LESLIE, K.E. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) with productions traits in Canadian dairy cattle. **Animal Genetics**, v.30, p. 157-160, 1998b.

SMITH, T.P.; CASAS, E.; FAHRENKRUG, S.C.; STONE, R.T.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W. **Myostatin mutations cause double muscling in cattle**. In: 51st Annual Reciprocal Meat Conference, Storrs - Connecticut, EUA. 28 de junho a 1º de julho. Anais..., Stors – Connecticut, EUA. p.112-117, 1998.

SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; KAPPES, S.M.; SONSTEGARD, T.S. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. **Mammalian Genome**, v.8, p.742-744, 1997.

SOLLER, M.; ANDERSSON, L. Genomic approaches to the improvement of disease resistance in farm animals. **Rev.sci.tech.Off.int.Epiz**, v.17, p. 329-345, 1998.

STONE, R.T.; KEELE, J.W.; SHACKELFORD, S.D.; KAPPES, S.M.; KOOHMARAIE, M. A primary screen of bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1379-1384, 1999.

VAN TASSELL, C.P.; ASHWELL, M.S.; SONSTEGARD, T.S. Detection of putative loci affecting milk, health, and conformation traits in a US Holstein population using 105 microsatellite markers. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1865-1872, 2000.

VELMALA, R.J.; VIKKI, H.J.; ELO, K.T.; KONING, D.J. DE; MÄKI-TANILA, A.V. A search for quantitative trait loci for milk production traits on chromosome 6 in Finnish Ayrshire cattle. **Animal Genetics**, v.30, p.136-143, 1999.

WALLING, G.A., ARCHIBALD, A.L.; CATTERMOLE, J.A.; FINLAYSON, H.A.; NICHOLSON, D.; VISSCER, P.M.; WALKER, C.A.; HALEY, C.S. Mapping of quantitative trait loci on porcine chromosome 4. **Animal Genetics**, v.29, p.415-424, 1998.

ZANOTTI, M; POLI, G.; PONTI, W.; POLLI, M.; ROCCHI, M.; BOLZANI, E.; LONGERI, M.; RUSSO, S.; LEWIN, H.A.; VAN EIJK, M.J.T. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle. **Animal Genetics**, v.27, p.337-341, 1996.