

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE BOVINOS

Polyana Barros Polido¹
 Fábio Gomes Ferreira¹
 Odair Alberton²
 Silvia Graciele Hülse de Souza^{2*}

POLIDO, P. B.; FERREIRA, F. G.; ALBERTON, O.; SOUZA, S. G. H. de. Marcadores moleculares aplicados no melhoramento genético de bovinos. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 161-169, jul./dez. 2012.

RESUMO: O recente desenvolvimento da biologia molecular tem aberto a possibilidade de identificar genes importantes e utilizar a variação genômica no melhoramento genético. Os marcadores moleculares baseados em DNA atuam como ferramentas versáteis e podem ser utilizados em diferentes estudos. Desde o seu desenvolvimento, os marcadores moleculares estão sendo modificados constantemente para melhorar sua empregabilidade e trazer a possibilidade de automação do processo em análises genômicas. A descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi um marco nesse esforço e diversos marcadores surgiram a partir do desenvolvimento da PCR. Nessa revisão, diferentes marcadores moleculares baseados em DNA desenvolvidos durante as últimas décadas foram abordados, no qual auxiliará na compreensão das diferentes classes de marcadores genéticos existentes e suas aplicações na seleção de genótipos superiores nos programas de melhoramento genético de bovinos.

PALAVRAS-CHAVE: Melhoramento animal; Polimorfismo de DNA; RFLP; SSR; SNPs.

MOLECULAR MARKERS APPLIED TO CATTLE BREEDING

ABSTRACT: The recent development in molecular biology has opened the possibility of identifying major genes and using genomic variation in breeding programs. DNA-based molecular markers have acted as versatile tools and can be used in different studies. Since their development, molecular markers are constantly being modified to improve their employment and bring the possibility of process automation in genomic analysis. The discovery of polymerase chain reaction (PCR) was a milestone in this effort and several markers have emerged from this technique. In this review, different DNA-based molecular markers developed during the last decades have been approached, which shall aid in the understanding of the different classes of genetic markers available and their application in the selection of superior genotypes in breeding cattle.

KEYWORDS: Animal breeding; DNA polymorphism; RFLP; SSR; SNPs.

MARCADORES MOLECULARES APLICADOS AL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE BOVINOS

RESUMEN: El reciente desarrollo de la biología molecular ha abierto la posibilidad de identificar genes importantes y utilizar la variación genómica en el mejoramiento genético. Los marcadores moleculares basados en ADN actúan como herramientas versátiles y pueden ser utilizados en diferentes estudios. Desde su desarrollo, los marcadores moleculares están siendo modificados constantemente para mejorar su empleabilidad y traer la posibilidad de automatización del proceso en análisis genómicas. El descubrimiento de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) fue un hito en ese esfuerzo y diversos marcadores han surgido a partir del desarrollo de la PCR. En esa revisión, diferentes marcadores moleculares basados en ADN desarrollados durante las últimas décadas han sido abordados, lo que ayudará en la comprensión de las distintas clases de marcadores genéticos existentes y sus aplicaciones en la selección de genotipos superiores en los programas de mejoramiento genético de bovinos.

PALABRAS CLAVE: Mejoramiento animal; Polimorfismo de ADN; RFLP; SSR; SNPs.

Introdução

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial, que, em 2011, contava com um rebanho de 1,01 bilhão de animais (USDA, 2012). O Brasil possui atualmente cerca de 200 milhões de cabeças, o maior rebanho bovino comercial do mundo (MAPA, 2012). O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois segmentos lucrativos, a cadeia produtiva da carne e a cadeia produtiva do leite. O valor bruto

da produção desses dois segmentos, estimado em R\$ 67 bilhões, bem como a presença da atividade em todos os estados brasileiros, evidenciam a importância econômica e social da bovinocultura no país (MAPA, 2012).

Dessa forma, há uma necessidade cada vez maior de se produzir alimentos derivados desses animais com qualidade, em grande escala, a custos cada vez menores. Para manter a competitividade comercial desses produtos, a agroindústria brasileira tem investido em programas de melhoramento genético buscando aumentar a eficiência da produção, a

¹Mestrando (a) em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense – UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes 4282, Cx Postal 224, 87502-210, Umuarama, Paraná. E-mail: polypolido@gmail.com; fagf2012@hotmail.com;

²Docente do curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense – UNIPAR, Praça Mascarenhas de Moraes 4282, Cx Postal 224, 87502-210, Umuarama, Paraná. E-mail: odair@unipar.br *Autor correspondente, E-mail: silviahulse@unipar.br.

padronização dos animais e de seus produtos (GARCIA; PORTO-NETO, 2006). A caracterização genética de animais possibilita a indicação de acasalamentos ou cruzamentos que favorecerão a manutenção da máxima variabilidade genética, evitando esforços na manutenção de amostras que geneticamente seriam similares, característica indesejável em um rebanho produtivo (EGITO; ALBUQUERQUE; MARIANTE, 2001).

Tradicionalmente, o melhoramento genético de bovinos foi baseado na seleção fenotípica (WALSH, 2000). Entretanto, os marcadores baseados no fenótipo são limitados, uma vez que dependem da idade do animal e são significativamente influenciados pelo ambiente (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998). Dessa forma, a seleção baseada no genótipo tornou-se importante na criação de bovinos.

Os marcadores moleculares surgiram como uma ferramenta capaz de detectar variações genéticas no DNA. Esses marcadores são numerosos e distribuídos por todo o genoma, possuem herança mendeliana e geralmente expressam caráter codominante e muitas vezes são multialélicos (YANG et al., 2013). Eles não são influenciados pelos fatores ambientais e, geralmente, não possuem efeitos pleiotrópicos sobre os *loci* de caracteres quantitativos (QTLs) (TENEVA, 2009).

Marcadores moleculares têm sido usados como ferramenta útil nos testes de paternidade e na identificação e estimativa da distância genética entre animais (GARCIA; PORTO-NETO, 2006). O polimorfismo atribuído aos marcadores moleculares pode ainda ser usado para construir mapas genéticos (VIGNAL et al., 2002; GEORGES, 2007). Extensos mapas genéticos foram construídos, nas últimas décadas, para uma variedade de espécies animais, especialmente em bovinos, e utilizados na seleção assistida por marcadores (SAM), análise de segregação de QTLs e na identificação de genes candidatos (ROHRER et al., 1994; VIGNAL et al., 2002). Nesse contexto, nesta revisão foram avaliados os recentes avanços nos marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético de bovinos.

Marcadores Moleculares

Os marcadores moleculares são considerados uma importante ferramenta para identificar e acessar a variação genética entre os indivíduos. Eles podem ainda ser usados para associar a variação genética a uma característica de interesse. O uso de marcadores de DNA permite identificar o potencial genético de um animal antes da expressão do seu fenótipo (REGINATO; COUTINHO, 2001). A maioria das características de interesse econômico apresenta o padrão de herança poligênica, sendo determinadas por inúmeros genes de grande e/ou de pequeno efeito individuais e sob forte influência de fatores ambientais (COUTINHO; ROSÁRIO, 2010). O emprego de marcadores moleculares no processo de caracterização genética tem sido amplamente realizado devido a diversas características desejáveis.

De forma geral, os marcadores moleculares podem ser basicamente classificados em duas categorias: (1) marcadores baseados em técnicas de hibridização, (2) marcadores baseados em técnicas de PCR.

Marcadores baseados em técnicas de hibridização

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

A publicação de Botstein et al. (1980) sobre a construção de mapas genéticos usando polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) foi o primeiro relato da técnica de marcadores para a detecção de polimorfismos de DNA. Nessa técnica, o polimorfismo é detectado por hibridação de uma sonda, marcada com radioatividade ou compostos que desencadeiam reação de luminescência, com o DNA digerido por endonucleases de restrição, resultando em um perfil diferencial de fragmentos de DNA. Esse perfil diferencial é gerado devido a substituições de nucleotídeos ou rearranjos de DNA, como inserções ou deleções de um único nucleotídeo. Os marcadores RFLP são altamente polimórficos, apresentam herança codominante e são facilmente reproduzíveis. Essa técnica apresenta algumas limitações uma vez que é demorada, dispendiosa e envolve reagentes radioativos, além de requerer grande quantidade de DNA genômico de alta qualidade. A exigência prévia da sequência para a construção da sonda aumenta a complexidade da metodologia. Essas limitações conduziram ao desenvolvimento de um conjunto de métodos menos complexos conhecidos como técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Marcadores baseados em técnicas de PCR

Após a invenção da PCR (MULLIS; FALOONA, 1987), um grande número de abordagens para a geração de novos marcadores moleculares baseados nessa técnica foram detalhados. Isso ocorreu devido, principalmente, à sua aparente simplicidade e sucesso. O uso de iniciadores aleatórios superou a limitação do conhecimento prévio da sequência e facilitou o desenvolvimento de marcadores genéticos para grande variedade de finalidades.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

O polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) é uma variação da técnica de PCR. Essa técnica baseia-se na amplificação do DNA genômico utilizando *primers* únicos de sequência arbitrária (WILLIAMS et al., 1990). O polimorfismo detectado é gerado devido a mutações ou a rearranjos (inserções ou deleções) entre os dois sítios de hibridização dos *primers* utilizados (LOPES et al., 2002). A principal desvantagem do método é que o perfil polimórfico depende das condições da reação podendo variar entre diferentes laboratórios e, como vários *loci* discretos no genoma são amplificados por cada iniciador, os perfis apresentam caráter dominante, ou seja, não são capazes de distinguir os indivíduos heterozigotos dos homozigotos (BARDAKCI, 2001).

Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

O polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) é uma classe de marcadores desenvolvida a fim de superar a limitação da reprodutibilidade associada ao RAPD (VOS et al., 1995). O AFLP associa o polimorfis-

mo gerado pelas enzimas de restrição com a capacidade de detecção da técnica de PCR. O DNA genômico é clivado por enzimas de restrição, originando um número extremamente elevado de fragmentos que, em função da concentração, não são detectados em eletroforese. Pequenas sequências de DNA (adaptadores) são acopladas às extremidades desses fragmentos de restrição, as quais serão reconhecidas por *primers* específicos durante a PCR (pré-amplificação e amplificação seletiva). Os fragmentos gerados são então separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. A técnica de AFLP apresenta vantagens comparativas, tais como detecção de um grande número de *loci*, cobertura ampla do genoma e baixo custo, além de serem altamente confiáveis e reprodutíveis (LOPES et al., 2002).

Microssatélites

Os microssatélites ou SSR são uma classe de marcadores que consistem de pequenas sequências (2 a 6 pares de base) tais como $(AT)_n/(TA)_n$ e $(ATT)_n/(TAA)_n$ repetidas em tandem, amplamente distribuídos nos genomas de procariontes e eucariontes (ZANE et al., 2002). Em mamíferos, em geral há uma maior frequência do motivo CA (ROHRER et al., 1994). Os microssatélites são encontrados em regiões codificadoras e não codificadoras do genoma (ZANE et al., 2002). As regiões expressas do genoma apresentam uma alta frequência de microssatélites, os quais estão predominantemente localizados nas regiões que não codificam proteínas como 3' e 5' UTR. Na região codante há uma maior predominância de motivos tri- e hexanucleotídeos, devido à seleção negativa para mutações na região de leitura dos códons (MORGANTE et al., 2002). O surgimento e a evolução dos microssatélites estão relacionados com mecanismos como a inserção/substituição de bases, *slippage*, mutação e *crossing-over* desigual (MOORE et al., 1991).

As sequências de DNA que flanqueiam os microssatélites geralmente são bem conservadas, permitindo a construção de *primers* e sua utilização para a amplificação dos microssatélites. Cada microssatélite constitui um *locus* altamente polimórfico, cujas variações no número de repetições determinam diferentes alelos que podem ser separados por eletroforese para acessar o perfil de cada indivíduo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Esses marcadores possuem vantagens, como: caráter codominante, multialelismo, distribuição aleatória no genoma e alta reprodutibilidade, essenciais para análises baseadas em marcadores moleculares (SOSINSKI et al., 2000). Além disso, é reduzida a possibilidade de ambiguidade ou erro na leitura de polimorfismo.

Single nucleotide polymorphism (SNPs)

Atualmente, uma variedade de projetos de sequenciamento de DNA está em andamento, o que permitiu a descoberta do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP). Os SNPs envolvem a substituição de um nucleotídeo por outro, a adição ou deleção de um ou de alguns nucleotídeos. Para que a variação seja considerada um SNP, ela tem que ocorrer em pelo menos 1% da população (BORÉM; CAIXETA, 2006). Há uma série de fatores para o crescente interesse no uso de SNPs como marcadores para análises genéticas. Eles são encontrados em abundância no genoma. Em humanos,

foi encontrado um SNP a cada 1000 bases (STONEKING, 2001; VIGNAL et al., 2002). Outro fator importante é que os SNPs localizados em regiões codificantes podem afetar diretamente a função da proteína. Esses SNPs podem ser diretamente responsáveis por algumas das variações entre os indivíduos com características importantes (YANG et al., 2013). E, finalmente, eles representam uma abordagem mais interessante para estudos de genotipagem, pois são geneticamente estáveis e passíveis de automatização (VIGNAL et al., 2002).

Os SNPs são marcadores bi-alelicos, o que significa que ocorre um polimorfismo específico somente em dois alelos em uma população (BEUZEN et al., 2000). Como consequência, o conteúdo informativo por SNP é inferior em comparação com os marcadores microssatélites que são multialélicos. Entretanto, isso pode ser compensado pela utilização de um número maior de marcadores (WERNER et al., 2004).

Aplicações dos marcadores moleculares

Diversidade genética

A caracterização genética de diferentes populações, raças e espécies permite a estimativa da diversidade genética. Em programas de conservação genética de rebanhos é fundamental o conhecimento da variabilidade genética (MACHUGH et al., 1994) e a caracterização genética pode ser utilizada no estudo de relações entre espécies e gêneros correlacionados através de suas características fenotípicas, morfológicas e fisiológicas, origem, hábitat, distribuição geográfica, produção e parâmetros genéticos (KEMP et al., 1995; MOHAMMED, 1997; VALE FILHO et al., 1997; DEL LAMA et al., 1996; HERNANDEZ et al., 1997). O conhecimento de tais aspectos é importante para os programas de conservação de recursos genéticos animais, pois possibilita a indicação de acasalamentos ou cruzamentos que possam favorecer a manutenção da máxima variabilidade genética e evita esforços na manutenção de amostras geneticamente similares (EGITO; ALBUQUERQUE; MARIANTE, 2001). Comparações entre raças bovinas utilizando diferentes marcadores vêm sendo empregadas na investigação da domesticação, migração, história evolutiva e estrutura populacional (LOFTUS et al., 1994; MACHUGH et al., 1997; EGITO et al., 2007; MCKAY et al., 2008).

Mapeamento de locais de características quantitativas (QTL)

Uma etapa importante no melhoramento de gado é a utilização da informação genômica e a associação dos marcadores moleculares a genes que codificam determinadas características. Os vários genes que afetam características quantitativas são individualizados mapeando-os em locais cromossômicos específicos (*loci*). Por essa razão, o termo *locus de característica quantitativa* (QTL) foi proposto para o mapeamento dos fatores genéticos que afetam o valor de traços quantitativos. Seidenspinner et al. (2010) detectaram QTLs para parto e fertilidade em bovinos nos cromossomos 7 (BTA7) e 10 (BTA10), respectivamente. Um estudo indicou vinte regiões-consenso no genoma de bovinos, corres-

pondentes às regiões contendo QTL, mapeados em populações independentes para a mesma característica. Dentre essas regiões-consenso, duas revelaram controlar o rendimento de leite, ambas localizadas no cromossomo 6, uma a 49 cM e outra a 87 cM, explicando 4,2% e 3,6% da variação genética dessa característica, respectivamente (KHATKAR et al., 2004). A primeira dessas regiões (localizada próxima ao marcador BM143) foi associada a cinco características da produção de leite, sendo elas percentual de gordura, percentual de proteína, rendimento de proteína, rendimento de gordura e rendimento de leite. Segundo o banco de dados Cattle QTL de bovinos (<<http://www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html>>), foram totalizados 6.305 QTLs mapeados, sendo 1.731 associados à produção de leite, 1.364 à qualidade de carne, 1.333 à reprodução, 1.202 à produção, 549 à sanidade animal e 126 a características exteriores. A identificação de locais de características quantitativas em programas de seleção oferece grande potencial para o melhoramento, particularmente em traços difíceis de serem mensurados. Para atingir esse potencial, há necessidade de identificar locais com grandes efeitos sobre essas características e a origem dos alelos potencialmente benéficos (MAHMOUD; NAWITO, 2012).

Marcadores ligados a características de interesse

A maior parte das características de interesse econômico apresenta padrão de manifestação quantitativo, sendo controladas por vários genes, cujos efeitos contribuem para o fenótipo final. No entanto, alguns genes apresentam papel primordial na expressão dessas características por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados genes principais (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998). O mapeamento de QTL possibilitou a identificação de genes responsáveis por características de interesse em bovinos, entre elas o gene codificador da enzima *diacilglicerol O-acetiltransferase* (DGAT 1), que controla a composição e produção de leite (GRISART et al., 2002) e o gene *miostatina*, que controla o desenvolvimento muscular (GROBET et al., 1997). A *miostatina*, ou gene da musculatura dupla, controla uma característica de valor comercial, que é o desenvolvimento da massa muscular de bovinos (REGINATO; COUTINHO, 2001). As raças *Belgian Blue* e *Piedmontese*, além de outras como a *Asturiana de los Valles*, *Maine Anjou*, *Charolesa*, *Limousin*, *Parthenaise* e *Rubea Gallega*, estão entre as mais estudadas e apresentam o fenótipo da musculatura dupla (TEIXEIRA et al., 2006). Na raça *Piedmontese*, uma mutação no gene da *miostatina* fez com que houvesse um desenvolvimento muscular diferenciado, capaz de gerar animais adultos com maior número de fibras musculares e maior deposição de músculo na carcaça (MCPHERSON; LEE, 1997; REGINATO; COUTINHO, 2001). Dessa forma, esses animais passaram a ser destinados à produção de carne por possuírem carcaças ideais (TEIXEIRA et al., 2006). Marcadores genéticos aplicáveis à seleção e melhoramento em bovinos foram descritos para enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas, como a calpaína que degrada as proteínas miofibrilares, principalmente as da linha Z, em determinados pontos internos das moléculas, melhorando a maciez da carne (BARENDSE, 1997; PAGE et al., 2002; GRISART et al., 2004). Haegeman et al. (2003) verificaram

um total de 13 SNPs associados a quatro diferentes genes, nomeados *carboxipeptidase E* (CPE), *proteína desacopladora 2* (UCP2), *single-minded* (Drosophila) homólogo 1 (SIM1) e *metalotioneína IIa* (MT2A), relacionados à qualidade da carne e da carcaça em bovinos. Switonski (2002), analisando vários estudos, verificou que, na maioria das vezes, os animais com genótipo VV (dois alelos mutantes do gene do Hormônio do Crescimento Bovino (bGH) mostraram menor ganho de peso diário e peso corporal, menor produção de carne e menor peso de carcaça. Por outro lado, Schlee et al. (1994) demonstraram que animais de genótipo LV apresentaram maiores valores genéticos para ganho de peso diário que os dos genótipos LL e VV. No caso, 35 mil marcadores SNPs foram identificados e validados, possibilitando a construção do mapa haplotípico em bovinos (*hapmap bovino*) (GIBBS et al., 2009). Martinez e Machado (2002) estudaram genes de resistência a carrapatos, a vermes gastrointestinais e a mastite em bovinos das raças Zebuínas, pois a variação genética existente entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus* permite a identificação de características associadas à resistência a parasitas, ao calor, isso combinado com qualidade da carne e de leite. Para a quantidade de gordura intramuscular ou marmoreio da carne, os genes já identificados e associados a essa característica têm sido aqueles que codificam os genes para: a leptina (BUCHANAN et al., 2002), diacilglicerol O-aciltransferase (DGAT 1) (THALLER et al., 2003), ácido retinóico receptor - relacionado ao receptor órfão C (RORC) (BARENDSE, 2003), (tireoglobulina) TG (BARENDSE et al., 2004), hormônio de crescimento 1 (GH1) (SCHLEE et al., 1994), esteroil-CoA desaturase (SCD), (MANNEN et al., 2003), fator de transcrição mitocondrial A (JIANG et al., 2005) e proteína de ligação de ácidos graxos 4 (FABP4) (MICHAL et al., 2006).

Fertilização

Em estudos de fertilização, a composição das proteínas presentes no plasma seminal e da membrana espermática tem despertado o interesse (RONCOLETTA et al., 1999). Um estudo utilizando eletrofocalização identificou 30 a 35 proteínas no plasma seminal de touros (LAVON, 1972). Bruschi et al. (1979) determinaram os valores normais de cada componente do plasma seminal de machos de várias espécies, indicando a existência de proteínas que se fixam à membrana espermática facilitando a fecundação. Em estudos imunológicos, Mattos et al. (2004) identificaram, por meio de anticorpo policlonal específico (anti-BSP A1/A2), proteínas do plasma seminal de bovinos, reconhecendo A1 (16,5 kDa, pI 4,7) e A2 (16 kDa, pI 4,9 e 5,2), propondo que essas proteínas possam ser utilizadas como marcadores para sêmen de alta congelabilidade. Roncoletta et al. (1999), estudando touros doadores de sêmen da raça Gir no Sul do Brasil, sugeriram a existência de uma banda caracterizada pela mobilidade relativa de 20,3 e massa molecular de aproximadamente 61,8 kDa, como possível marcador bioquímico para diferenciar o caráter de congelabilidade do sêmen. Por sua vez, Splan et al. (1998) e Pereira et al. (2002) verificaram baixa herdabilidade para a maioria das características de fertilidade, como taxa de parição (0,19); idade ao primeiro parto (0,19); dificuldade ao parto (0,18) e duração da gestação (0,26). O microssatélite ILSTS002, ligado ao gene do hor-

mônio luteinizante polipeptídeo beta (LH β), está diretamente associado à eficiência reprodutiva e tem sido utilizado como marcador (WEIMER et al., 2007; SILVEIRA, 2007). Dessa forma, estudos utilizando marcadores moleculares podem fornecer subsídios para a detecção de genes candidatos, cujos efeitos afetem a eficiência produtiva e reprodutiva, permitindo a seleção precoce, imediatamente após o nascimento ou durante a fase embrionária pré-implantação de características de interesse. Essas técnicas podem ser incorporadas em programas de reprodução *in vitro* e transferência de embriões, agilizando e aprimorando os sistemas de seleção genética e de produção animal (GARCIA; PORTO-NETO, 2001).

Seleção assistida por marcadores (SAM)

A utilização de marcadores moleculares para rastrear características de interesse possibilitou seu uso em programas de melhoramento genético. A seleção assistida por marcadores ou *Marker Assisted Selection* (SAM) permite a seleção assistida de genes ou *Genes Assisted Selection* (GAS) (FRANCO; MELO, 2006). A utilização da SAM permite a eliminação de genótipos desfavoráveis em uma única geração, facilitando esquemas de acasalamento uma vez que os custos dos testes de progênie são reduzidos, aumentando os efeitos heteróticos e possibilitando a identificação de efeitos transgressivos em raças sintéticas. Para a seleção de características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração, a SAM pode ser utilizada na seleção de indivíduos cujo sexo não permite a expressão da característica de interesse, ou para aquelas que se expressam tardiamente na vida do animal (WEIMER, 2003). Em bovinos a IGENITY[®], divisão de serviços genéticos da MERIAL[®] está utilizando comercialmente os marcadores genéticos para produção de leite β -lactoglobulina, κ -caseína e β -caseína; identificação e seleção dos animais que não são carreadores do gene BLAD (Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina), pois que os animais afetados por essa deficiência são mais susceptíveis às infecções bacterianas; DUMPS (Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase) é uma desordem monogenética recessiva autossomal que se origina da mutação no gene da uridina monofosfato sintetase no códon 405 do gene da UMP, sabendo-se que os animais provenientes de cruzamentos heterozigotos de portadores desse gene podem apresentar morte embrionária em torno do 40º dia de gestação; CVM (Complexo de Má-Formação Vertebral Cervical), pois que bezerros homozigotos para este gene podem ser reabsorvidos, abortados ou natimortos. Já animais portadores de apenas um gene da CVM são normais, podendo apresentar baixas taxas de prenhez quando cruzados com outros portadores e marcadores genéticos que determinam a coloração da pelagem (GOES; JUNIOR; SANTOS, 2012).

Hormônios

Receptores hormonais e os hormônios são considerados bons genes candidatos para as características associadas à produção. Segundo Lucy et al. (1993), as mutações no gene do hormônio do crescimento em bovinos (bGH) estão descritas na literatura. Com relação aos seus efeitos sobre as características de produção, o polimorfismo é devido a uma transversão de C por G no exon5 (posição 2141) res-

ponsável pela substituição de leucina (L) por valina (V) na posição 127 da cadeia polipeptídica, sendo a mais estudada. Switonski (2002), revisando vários estudos, verificou que, na maioria das vezes, os animais com genótipo VV (dois alelos mutantes do gene bGH) mostraram menor taxa de crescimento. Unanian et al. (2000) verificaram, em bovinos da raça Nelore, a associação do polimorfismo do gene para o hormônio de crescimento com ganho de peso. A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo e que atua sobre os mecanismos que regulam a ingestão de alimento, o metabolismo energético, a reprodução e até o sistema imune (HOUSENK-NECHT et al., 1998). Pomp et al. (1997) identificaram o primeiro polimorfismo no gene da leptina através da digestão de um fragmento de 1820 pb com a enzima de restrição *Sau3AI*. Zwierzchowski et al. (2001) avaliaram os efeitos desse polimorfismo sobre características de produção de gado de corte, verificando uma associação entre esse polimorfismo e o consumo e a conversão alimentar. Outros estudos identificaram polimorfismos no gene da leptina (STONE et al., 1996; LIEN et al., 1997; WILKINS; DAVEY, 1997; FITZSIMMONS et al., 1998; KONFORTOV et al., 1999; HAEGEMAN et al., 2000; LAGONIGRO et al., 2003; SALMAN, 2003). Moody et al. (1996) avaliaram dois polimorfismos no gene do fator I de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) quanto aos seus efeitos sobre as características produtivas de bovinos de corte. Um microsatélite (CA)_n polimórfico na região promotora do gene do IGF-I foi associado com o peso ao nascimento e com o ganho de peso no primeiro ano de vida de bovinos da raça Hereford. Ge et al. (2001) não observaram esse polimorfismo em uma população de bovinos da raça Angus, no entanto identificaram outro polimorfismo na região promotora que consistia de uma transição de T \rightarrow C, sendo o genótipo BB (C nos dois alelos) associado ao maior ganho de peso nos vinte primeiros dias após o desmame. Segundo Fortes (2007), o gene *TG*, encontrado na região centromérica do cromossomo 14, codifica a tireoglobulina, que é precursora da triiodotironina e tetraiodotironina, sinalizadores do desenvolvimento de adipócitos. Estudos de associação de *TG* e marmorização foram realizados, mas geraram resultados contraditórios. A tireoglobulina é um precursor hormonal que afeta o metabolismo de lipídeos, habilitando o gene *TG* como candidato a marcador molecular. Outros genes em bovinos de corte já foram mapeados, mas foram pouco estudados para a identificação de polimorfismos, como o do fator de transcrição específico da pituitária (PIT1), que controla a expressão do GH; o do fator 1 dos pré-adipócitos (PREF-1), o qual pode estar relacionado com a deposição de gordura intramuscular (marmoreio); os genes que se expressam exclusivamente nos músculos esqueléticos, como o do fator 1 de determinação miogênica (MYOD1), o da miogenina (MYOG), o do canal de cloreto do músculo esquelético (CLNC1), o da calpaína 3 (CANP3), o do fator 5 miogênico (MYF5) e o do fator 6 miogênico (MYF6) (SWITONSKY, 2002).

Considerações Finais

A avaliação precisa dos recursos genéticos animais é fundamental para a sua conservação e utilização em programas de melhoramento genético. Desde a primeira demonstração da técnica conhecida como RFLP até o completo sequenciamento de genomas, o polimorfismo genético detectado

diretamente no DNA tem proporcionado o desenvolvimento de um grande número de marcadores, abrindo novas oportunidades para se avaliar a diversidade dos recursos genéticos animais disponíveis. Entretanto, um problema óbvio que normalmente se levanta é como escolher o marcador de DNA mais apropriado entre os diferentes marcadores disponíveis, uma vez que atualmente não existe um marcador ideal a ser utilizado em todos os trabalhos. Nesse contexto, a escolha adequada do tipo de marcador a ser empregado dependerá dos objetivos do estudo e das características do material analisado, aliado à confiabilidade da técnica, à facilidade de análise e à viabilidade do laboratório. Futuramente, novos marcadores moleculares deverão ser desenvolvidos e sua identificação poderá auxiliar os programas de melhoramento genético de bovinos.

Referências

- BARDAKCI, F. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Turkish Journal of Biology**, v. 25, p. 185-196, 2001.
- BARENDSE, W. **Assessing lipid metabolism Patent WO9923248**. Patent US6383751. Disponível em: <<http://www.uspto.com>>. Acesso em: 08 fev. 2012.
- BARENDSE, W. **DNA markers for marbling**. Patent WO2004070055. 2003. Disponível em: <<http://ep.espacenet.com/>>. Acesso em: 08 fev. 2012.
- BARENDSE, W. et al. The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. **Australian Journal Experimental Agriculture**, v. 44, p. 669-674, 2004.
- BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG K, C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, v. 160, p. 42-52, 2000.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa-MG: UFV, 2006. 532p.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **The American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.
- BRUSCHI, J. H. et al. Teores de ácido cítrico, frutose, proteína total e seu fracionamento eletroforético no sêmen do cão pastor alemão normal. **Arquivos da Escola Veterinária da UFMG**, v. 31, n. 1, p. 13-17, 1979.
- BUCHANAN, F. C. et al. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.
- CATTLE QTL DATABASE**. Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/QTLdb/cattle.html>>. Acesso em: 07 fev. 2012.
- COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.
- DEL LAMA, S. N.; DEL LAMA, M. A.; MESTRINER, M. A. Esterase D polymorphism and partial characterization of red blood cell esterases in cattle and buffalo populations. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 243-248, 1996.
- EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A. S. Caracterização genética de raças naturalizadas. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Anais...** Londrina: Instituto Agrônomo do Paraná, 2001. p. 121-126.
- EGITO, A. A. et al. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC Genetics**, v. 8, p. 83, 2007.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1998. 220p.
- FITZSIMMONS, C. J. et al. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 432-434, 1998.
- FORTES, M. R. S. **Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem**. 2007. 84f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -Departamento de Reprodução Animal, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007.
- FRANCO, M. M.; MELO, E. O. **Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida**. Brasília. DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 14 p.
- GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. P. Praticalconsiderati onsofembryomanipulation: Preimplantiongeneticotyping. **Theriogenology**, v. 56, p. 1393-1399, 2001.
- _____. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 197-203, 2006.
- GE, W. et al. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 1757-1762, 2001.
- GEORGES, M. Mapping, fine mapping and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 8, p.131-162, 2007.
- GIBBS, R. A. et al. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. **Science**, v. 324, p. 528-532, 2009.

- GOES, P. R. N.; AGOSTINI JUNIOR, R.; SANTOS, J.M.G. Disponibilidade, usos e limitações dos marcadores moleculares em espécies de animais de produção. **Iniciação Científica Cesumar**, v. 14, n. 1, p. 5-16, 2012.
- GRISART, B. et al. Positional candidate cloning of a qtl in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *dgat 1* gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research**, v. 12, p. 222-231, 2002.
- GRISART, B. et al. Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGAT1 K232A* quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 2398-2403, 2004.
- GROBET, L. et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v. 17, p. 71-74, 1997.
- HAEGEMAN, A. et al. Mapping and SNP analysis of bovine candidate genes for meat and carcass quality. **Animal Genetics**, v. 34, p. 349-353, 2003.
- HAEGEMAN, A.; VAN ZEVEREN, A.; PEELMAN, L. J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v. 31, p. 70, 2000.
- HERNANDEZ, J. et al. Use of blood parameters as ethnic characteristics in cattle breeds. **Archiv. Fuer. Tierzucht**, v. 40, p. 521-533, 1997.
- HOUSENKNECHT, K. L. et al. The biology of leptin: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1405-1420, 1998.
- JIANG, Z. H. et al. Significant associations of the mitochondrial transcription factor a promoter polymorphisms with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, p. 516-523, 2005.
- KHATKAR, M. S. et al. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, v. 36, p. 163-190, 2004.
- KEMP, E.J. et al. A panel of polymorphic bovine, ovine and caprine microsatellite markers. **Animal Genetics**, v. 26, p. 299-306, 1995.
- KONFORTOV, B. A.; LICENCE, V. E.; MILLER, J. R. Re-sequencing of DNA from a diverse panel of cattle reveals a high level of polymorphism in both intron and exon. **Mammalian Genome**, v. 10, p. 142-145, 1999.
- LAGONIGRO, R. et al. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Animal Genetics**, v. 34, p. 371-374, 2003.
- LAVON, U. Characterization of boar, bull, ram and rabbit seminal plasma proteins by gel disc electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p. 29-37, 1972.
- LIEN, S. et al. Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (*OBS*). **Animal Genetics**, v. 28, p. 238-246, 1997.
- LOFTUS, R. T. et al. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 2757-2761, 1994.
- LOPES, M. S. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biociência & Desenvolvimento**, Uberlândia, v. 5, n. 29, p. 56-60, 2002.
- LUCY, M. C. et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 10, p. 325-333, 1993.
- MACHUGH, D. E. et al. Microsatellite DNA Variation Within and Among European Cattle Breeds. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 256, p. 25-31, 1994.
- MACHUGH, D. E. et al. Microsatellite DNA Variation and the Evolution, Domestication and Phylogeography of Taurine and Zebu Cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, p. 1071-1086, 1997.
- MANNEN, H. et al. Identification of mitochondrial DNA substitutions related to meat quality in Japanese Black cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 68-73, 2003.
- MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 01 fev. 2012.
- MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 4., 2002. **Anais... Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, 2002. Disponível em: <<http://sbmaonline.org.br/anais/iv/palestras/pdfs/ivp06.pdf>>. Acesso em: 01. fev. 2012.
- MATTOS, R. C. et al. BSP A1/A2: a seminal plasma marker of high semen freezability. In: 15th **International Congress on Animal Reproduction**. Abstracts, 2004, v. 2, p. 462.
- MCKAY, S. D. et al. An assessment of population structure in eight breeds of cattle using a whole genome SNP panel. **BMC Genetics**, n. 9, p. 37, 2008.
- MCPHERRON, A. C.; LEE, S. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 12457-12461, 1997.

- MERIAL**[®]. Disponível em: <<http://www.merial.com.br/pecuaristas/igenity/index.asp>>. Acesso em: 14 mar. 2008.
- MICHAL, J. J. et al. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, v. 37, p. 400-4002, 2006.
- MOHAMMED, T. A. Phenotypic characterization of the Saudi Arabian Hassawi cattle breed. **Animal Genetic Resources Information**, v. 21, p. 35-42, 1997.
- MAHMOUD, K. G. M.; NAWITO, M. F. Molecular Markers for Fertility in Farm Animals. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 2, n. 3, p. 203-222, 2012.
- MONTALDO, H. H.; MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 83-89, 1998.
- MOODY, D. E. et al. Characterization of DNA polymorphism in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line I Herefords. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.
- MOORE, S. S. et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, p. 654-660, 1991.
- MORGANTE, M.; HANAFEY, M.; POWEL, W. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 194-200, 2002.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. **Methods Enzymology**, v. 155, p. 350-355, 1987.
- PAGE, B. T. et al. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077-3085, 2002.
- PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n.5, p. 703-708, 2002.
- POMP, D. et al. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of PCR-based polymorphism. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 427, 1997.
- REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2001. 213 p.
- ROHRER, G. A. et al. A microsatellite link age map of the porcine genome. **Genetics**, v. 136, n. 1, p. 231-245, 1994.
- RONCOLETTA, M. et al. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, p. 36-42, 1999.
- SALMAN, A. K. D. **Polimorfismo e expressão gênica da lepina em bovinos super precoces**. 2003. 49 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.
- SCHLEE, P. et al. Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 111, p. 253-256, 1994.
- SEIDENSPINNER, T.; BENNEWITZ, J.; THALLER, G. Confirming QTL for calving and fertility traits on bovine chromosomes 7 and -10 in German Holsteins. **Livestock Science**, n. 129, p. 237-240, 2010.
- SILVEIRA, J. C. **Marcadores moleculares e associação com características reprodutivas em dois rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul**. 2007. 78f. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia) - ULBRA-Canoas/RS, 2007.
- SPLAN, R. K.; CUNDIFF, L. V.; VAN VLECK, L. D. Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 2272-2278, 1998.
- SOSINSKI, B.; GANNAVARAPU, M.; HAGER, L. D. Characterization of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 3, p. 421-428, 2000.
- STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; BEATTLE, C. W. The bovine homologue of obese gene maps to chromosome 4. **Mammalian Genome**, v. 7, p. 399-400, 1996.
- STONEKING, M. Single nucleotide polymorphisms: From the evolutionary past. **Nature**, v. 409, p. 821-822, 2001.
- SWITONSKY, M. Molecular Genetic in beef cattle breeding: a review. **Animal Science Papers and Reports**, v. 20, sup.1, p. 7-18, 2002.
- TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A.; QUIRINO, C. R. Musculatura dupla: II: determinação genética. **Archivos Latino Americanos de Produccion Animal**, v. 14, n. 1, p. 17-23, 2006.
- TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 25, n. 5-6, p. 1267-1284, 2009.
- THALLER, G. et al. DGAT 1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v. 34, p. 354-357, 2003.
- UNANIAN, M. M. et al. Associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com a característica

peso em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1380-1386, 2000.

USDA. **United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome>>. Acesso em: 15 out. 2012.

VALE FILHO, V. R. et al. A. Andrologic characterization of Nelore bulls, selected for the first breed season. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 42-44, 1997.

VIGNAL, A. et al. A review of SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, p. 4407-1444, 1995.

WALSH, B. Minireview: Quantitative genetics in the age of genomics. **Theoretical Population Biology**, v. 59, p. 175-184, 2000.

WEIMER, T. A. Diagnóstico genético-molecular aplicado à produção animal. In: MARKES, E. K. (Org.). **Diagnóstico genético-molecular**. Canoas: ULBRA, 2003. p. 203-218.

WEIMER, T. A. et al. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. **Ciência Rural**, v. 37, n. 5, p. 1502-1505, 2007.

WERNER, F. A. O. et al. Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. **Animal Genetics**, v. 35, p. 44-49, 2004.

WILKINS, R. J.; DAVEY, H. W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v. 28, p. 376, 1997.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YANG, W. et al. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, p. 2, 2013.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PARTANELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

ZWIERZCHOWSKI, L. et al. An association of growth hormone κ -casein, β -lactoglobulin, leptin and *Pit-1* loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v. 19, p. 65-78, 2001.