

MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NAS PESQUISAS EM BOVINOS

[Molecular markers and their applications in bovine research]

Atzel Candido Acosta Abad^{1*}, Fabiana de Araújo Lopes², José Wilton Pinheiro³, Rinaldo Aparecido Mota¹

¹ Laboratório de Bacterioses, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

² Programa de Gerenciamento de Rebanhos Leiteiros do Nordeste (PROGENE), Departamento de Zootecnia (UFRPE).

³ Laboratório de Bacterioses, Departamento de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE).

RESUMO - A produção bovina tem sido favorecida pelos avanços na biotecnologia, especialmente pelos progressos alcançados nos estudos da molécula DNA. Os marcadores moleculares vêm incrementar a eficiência e a rapidez com que se selecionam animais para reprodução, permitindo que o progresso genético das gerações futuras seja significativamente superior das que as originaram. Objetivou-se com esta revisão abordar as características dos principais marcadores moleculares e como são detectados em laboratório, bem como, exemplificar algumas das suas aplicações na espécie bovina e as tendências de uso dos mesmos pelos diferentes grupos de pesquisa.

Palavras-Chave: RFLP, RAPD, Minissatélite, Microsatélite, SNP, AFLP e SSCP.

ABSTRACT - The advances in biotechnology, in special way for progress in studies of the DNA molecule favored bovine production. Molecular markers have been increasing the efficiency and rapidity with which animals are selected for playback, allowing that genetic progress of future generations will be significantly higher. The aims of the present review were to summarize the main features of molecular markers and how they are detected in the laboratory, as well as illustrate some of its applications in bovine specie and trends the use by different research groups.

Keywords: RFLP, RAPD, minisatellite, microsatellite, SNP, AFLP and SSCP.

INTRODUÇÃO

Junto à descoberta da estrutura do DNA em 1953 (Watson e Crick, 1953), a tecnologia do DNA recombinante e ao advento dos marcadores moleculares, vislumbrou-se a possibilidade de utilizar a informação oriunda do fenótipo com aquela oriunda diretamente do DNA (genótipo), de forma que os processos de identificação e seleção dos micro-organismos, plantas e animais com genótipos superiores pudessem ser realizados de forma mais eficiente.

O principal objetivo da análise do DNA em espécies de animais domésticos tem sido a descrição da arquitetura genética das características de interesse econômico, determinando o número de genes e a contribuição de cada um na expressão do fenótipo. Essa finalidade, no entanto, não tem sido facilmente alcançada, especialmente, porque as características de interesse são de natureza quantitativa, ou seja, controlada por vários genes,

cada um contribuindo com uma parcela para o fenótipo (Coutinho *et al.*, 2010).

Toda característica herdável presente no DNA e que diferencia dois ou mais indivíduos é conhecida por marcadores moleculares. Estas marcas são alterações na sequência de nucleotídeos na molécula de DNA denominadas de polimorfismos. O genoma é composto por aproximadamente 90% de sequências não codificadoras, ou seja, que carregam uma sequência de nucleotídeos que não será transcrita em RNA mensageiro, nem traduzida em proteína, sendo a maioria dessas alterações estáveis e não acarretam em mudanças fenotípicas (Dias-Salman *et al.*, 2009).

As marcas na sequência de DNA próximas aos genes permitiram o acompanhamento da segregação de alelos por gerações, e por consequência, da característica de interesse a elas associada. Também se vislumbrou a possibilidade de determinar o mérito genético de um animal nos estádios embrionários ou jovens, sem a necessidade

* Autor para correspondência: E-mail: acabad80@gmail.com

de avaliação da produção ou da progênie, o que levaria a uma seleção mais rápida e eficiente (Uffo, 2003).

Pelo grande número de marcadores moleculares e suas características, que direcionam sua aplicação em pesquisas específicas, objetivou-se com esta revisão abordar características dos principais marcadores moleculares e como são detectados em laboratório, bem como, exemplificar algumas das aplicações em bovinos e as tendências de uso dos mesmos pelos diferentes grupos de pesquisa.

Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLPs)

Uma das técnicas mais usadas e das primeiras a serem desenvolvidas foram os RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein *et al.*, 1980). Quando clivados com enzimas de restrição, expressam, por eletroforese, as diferenças de comprimento de fragmentos de DNA, observadas por meio da hibridização desses fragmentos com

sequências homólogas do DNA marcado com radioatividade ou por luminescência. Os RFLPs podem ser causados por mudanças de pares de bases, rearranjo de DNA, inserção e/ou deleção ou diversidade natural na sequência de nucleotídeos entre ou dentro de populações (Watson *et al.*, 1987). O uso das enzimas de restrição possibilita a identificação de um alto número de *locus* polimórficos e, por conseguinte, foi à primeira ferramenta eficaz para a seleção assistida por marcadores. A principal limitação da técnica é o uso intensivo da mão de obra e o tempo necessário para a análise genômica. Os RFLPs apresentam expressão codominante, e, por abrangerem todo o genoma, a probabilidade de associação de marcadores com genes de interesse econômico é grande (Brammer, 2000).

A tendência na utilização desta metodologia foi aumentando com o transcorrer do tempo, mas além do desenvolvimento de outras técnicas, o número de estudos que utilizam os RFLPs se manteve estável nos diferentes anos (Figura 1).

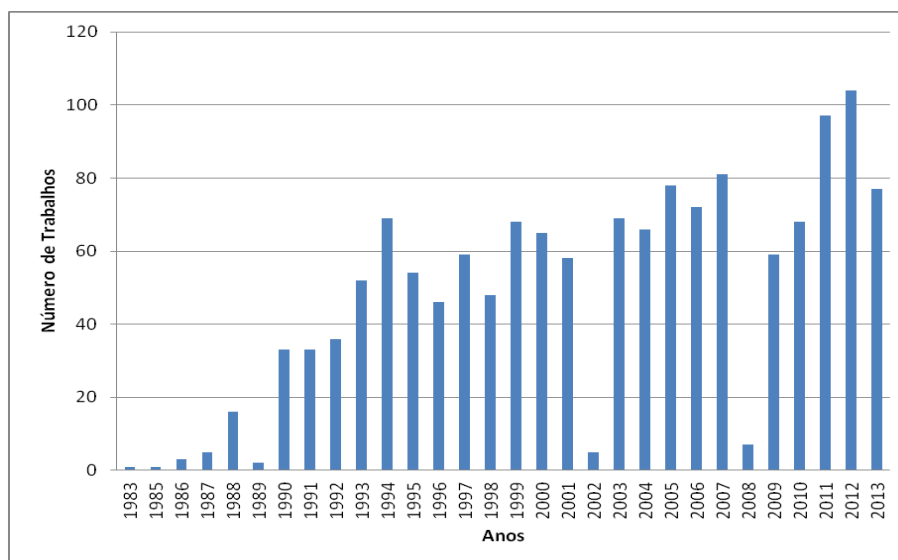


Figura 1: Frequência de pesquisas que utilizaram os RFLPs para a identificação de polimorfismos genéticos em bovinos.

Esta técnica nos últimos tempos vem sendo usada junto com a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o que vem aumentando muito sua sensibilidade. A PCR-RFLPs aumentou a sensibilidade da técnica, fazendo com que fosse mais fácil à identificação dos polimorfismos partindo de pequenas quantidades de material genético. A metodologia tem sido utilizada na caracterização de raças bovinas (Maj *et al.*, 2005; Parnian *et al.*, 2006; Alipanah *et al.*, 2008; Acosta *et al.*, 2012), e em estudos de associação a caracteres produtivos (Khatami *et al.*, 2005; Kučerova *et al.*, 2006; Hua *et al.*, 2009; Li-Juan *et al.*, 2009; Fu *et al.*, 2013).

Polimorfismo do DNA Amplificado ao Acaso (RAPDs)

A técnica denominada RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é relativamente simples, rápida e de baixo custo (Williams *et al.*, 1990). Essa técnica permitiu a realização de estudos de análise genética em espécies anteriormente não contempladas (Sartoretto e Mello-Farias, 2010), por exemplo, peixes (Bardakci e Skibinski, 1994; Becerril *et al.*, 1999; Wasko e Galetti, 2002), e abelhas (Hunt e Page, 1992; 1995; Suazo *et al.*, 1998). Diferentemente das demais técnicas de PCR, esta utiliza um único primer composto de dez pares de bases de sequências arbitrárias (Ferreira e

Grattapaglia, 1998), não requerendo o conhecimento da sequência do DNA-alvo, necessitando cumprir três condições básicas: percentual de CG entre 50-70%, não pode ter palíndromos maiores de 6 bases e que não exista complementaridade no extremo 3' (Williams *et al.*, 1993).

Marcadores RAPD têm natureza binária e segregam como alelos mendelianos dominantes, havendo apenas dois fenótipos moleculares, presença ou ausência de bandas. O polimorfismo detectado por RAPD é gerado por mutações ou por rearranjos entre os dois sítios, ou no próprio sítio de hibridização do primer. Diferenças em apenas um par de bases (mutações de ponto) podem ser suficientes para inibir a amplificação (Cornide, 2002). Portanto, a presença de um determinado marcador no padrão de bandas de dois indivíduos indica que ambos compartilham o mesmo alelo naquele *locus*. Por outro lado, a ausência da banda representa o fenótipo recessivo, não sendo possível a distinção entre homocigoto e heterocigoto. Apesar dessas limitações, os marcadores RAPD apresentam boa aceitação para construção de mapas genéticos e seleção indireta de outros caracteres. A técnica de RAPD possibilitou amplas alternativas para a biologia da conservação, desde plantas a mamíferos, possibilitando, ainda, um estudo rápido de populações ameaçadas de extinção (Almeida *et al.*, 2001). Apesar dessa técnica ser simples, a tendência da utilização desse marcador em estudos publicados é diminuir.

A principal causa do declive na utilização deste marcador deve-se à repetitividade dos resultados da técnica. Muitos são os fatores que afetam esta condição, menciona-se a concentração do DNA nas amostras ou de qualquer componente da PCR, mudança de temperatura em um de seus ciclos ou a mudança no termociclador a ser utilizado. Estes fatores tornam a técnica mais trabalhosa e dispendiosa, visto que as amostras devem ser trabalhadas em triplicatas.

O marcador RAPD é usado frequentemente em estudos de biodiversidade e caracterização de raças bovinas (Postiglioni *et al.*, 2002; Acosta *et al.*, 2010), também em búfalos de rio (Shokrollahi *et al.*, 2009) e camelos (Mehta *et al.*, 2006).

Minissatélites (VNTR)

Marcadores minissatélites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats - Número Variável de Repetições em Tandem) foram os primeiros marcadores compostos por sequências repetidas de DNA (Jeffreys *et al.*, 1985), os quais estão localizados nas regiões centroméricas e teloméricas dos cromossomos (Moyzis *et al.*, 1988).

Os VNTR são sequências de DNA cuja unidade repetitiva de 15-100 nucleotídeos é observada lado a lado em um *locus*, podendo ser repetida em até 50X. Em geral, são marcadores tipicamente codominantes, mas analisados como marcadores dominantes em estudos de diversidade genética em populações naturais (Sartoretto e Mello-Farias, 2010). O número de publicações realizadas estudando os minissatélites em bovinos é pequeno. Isto pode se dever às características deste marcador (unidade repetidas de 15-100 nucleotídeo até 50X) pois, os fragmentos amplificados podem ser consideravelmente grandes, o que diminui a eficiência da DNA-polimerase na PCR. Outra possível causa do reduzido número de trabalhos que utilizam este marcador é a complexidade da técnica e seu elevado custo.

Pode-se mencionar entre os exemplos mais frequentes de utilização do marcador minissatélite os estudos em genes candidatos ou seus promotores (Sanders *et al.*, 2006; Gautier *et al.*, 2007).

Microssatélites (SSR)

Os marcadores denominados SSR (Simple Sequence Repeats - Sequências Simples Repetidas) ou Microssatélites (Hamada *et al.*, 1982; Litt e Luty, 1989), são amplamente distribuídos no genoma dos eucariotas e são os marcadores mais polimórficos que se conhecem (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Cornide, 2002). Em geral, consistem em pequenas sequências com um a cinco pares de base que se repetem em série em número variável (geralmente de uma dezena a uma centena de vezes). Receberam essa denominação porque quando se analisava DNA por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério apareciam bandas que ficavam ao lado da banda principal. A estas bandas foi atribuído o nome de DNA satélite, pois pareciam pequenos satélites ao lado de um planeta. Mais tarde esse DNA foi caracterizado como sendo regiões de DNA repetitivo. Posteriormente, foi verificado que as repetições podiam ser classificadas em longas (satélites), curtas (minissatélites) ou muito curtas (microssatélites) (Dias-Salman *et al.*, 2009).

Geralmente, os microssatélites identificam um único *locus* no genoma e, por sua alta taxa de mutação, são frequentemente multialélicos, além de segregarem de modo codominante. Para seu estudo, utilizam-se dois pares de primers específicos (20 a 30 bases) complementares a sequências únicas que flanqueiam o microssatélite (Weber e May, 1989). A fonte de variação e mudança no número de repetições destes marcadores pode prover uma fonte de variação quantitativa para uma rápida adaptação evolutiva das espécies a mudanças ecológicas (Tautz *et al.*, 1986; Kashi *et al.*, 1997).

A mudança no comprimento dos microssatélites localizados próximo as regiões reguladoras de genes pode influenciar a transcrição destes (Kashi *et al.*, 1997).

A partir de 1994 observou-se um aumento na utilização dos marcadores microssatélites na espécie bovina (Figura 2). A frequência de

utilização destes marcadores é alta se comparamos com a frequência de utilização dos minissatélites, isso pode ser explicado pelas vantagens que apresenta os microssatélites, como a ampla distribuição em todo o genoma e poucos nucleotídeos repetidos, resultando numa reação da PCR eficiente.

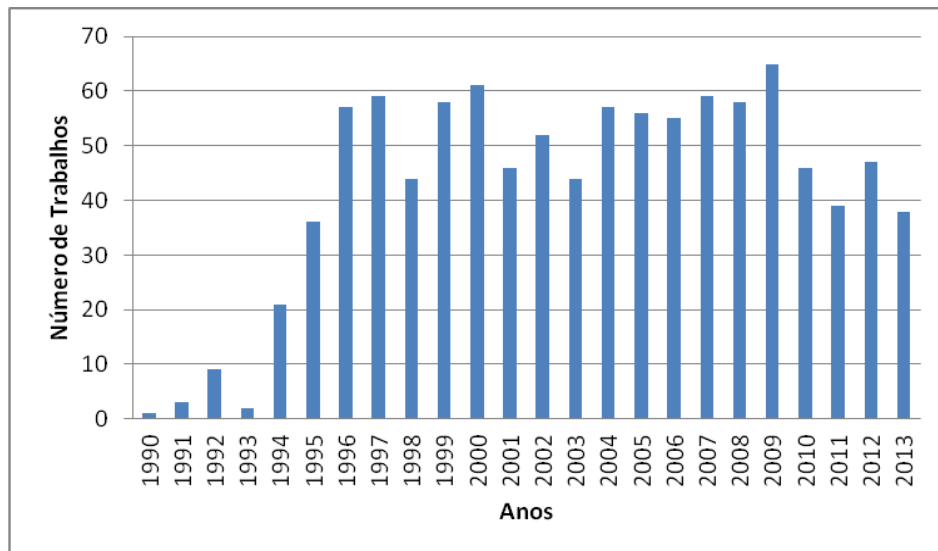


Figura 2: Frequência de pesquisas que utilizaram os microssatélites nos estudos de polimorfismos genéticos em bovinos.

Os microssatélites são utilizados em estudos de biodiversidade. A Sociedade Internacional de Genética Animal (ISAG/FAO) recomenda um conjunto de microssatélites por espécies, os quais encontram-se amplamente representados nas pesquisas publicadas, por exemplo, em estudos realizados em bovinos (Armstrong *et al.*, 2006; Egito *et al.*, 2007; Acosta *et al.*, 2013). Também foram observados estudos que utilizam estes marcadores para estabelecer as possíveis relações entre raças e aquelas que as originaram (Delgado *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2012).

Outras espécies também têm sido estudadas com estes marcadores, a exemplo dos suínos (Kim *et al.*, 2005; SanCristobal *et al.*, 2006; Megens *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2012; Herrero-Medrano *et al.*, 2012), equinos (Canon *et al.*, 2000; Ling *et al.*, 2011; Takasu *et al.*, 2012), búfalos (Vijh *et al.*, 2008) e peixes (Dupont-Nivet *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2011; Rueda *et al.*, 2011).

Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNPs)

Outra maneira de estudar polimorfismos de DNA é pelo sequenciamento de regiões do DNA com posterior alinhamento e análise comparativa das sequências com o auxílio de softwares específicos. Isto torna possível a detecção de polimorfismos pontuais ou SNPs (Single Nucleotide

Polymorphism), que podem ocorrer em regiões codificadoras ou não codificadoras do genoma.

Em regiões codificadoras, quando resultam em uma substituição de aminoácido na sequência proteica, são denominados polimorfismos não sinônimos, podendo a substituição ser conservativa ou não conservativa, em função das características dos aminoácidos envolvidos na troca (Dias-Salman *et al.*, 2009). Nesses casos, pode haver modificações estruturais e funcionais na proteína. Já no caso dos SNPs sinônimos (ou silenciosos), embora não altere a sequência proteica, eles podem modificar a estrutura e a estabilidade do RNA mensageiro e, conseqüentemente, afetar a quantidade de proteína produzida. Além disso, SNPs podem alterar o processamento (*splicing*) alternativo de RNAm; o padrão de expressão de genes por alterações em sequências promotoras; os códons de iniciação e/ou de terminação da tradução e a poliadenilação da molécula de RNA mensageiro (Guimarães e Costa, 2002).

As substituições que com maior frequência ocorrem no DNA são as que envolvem bases nitrogenadas de mesma característica estrutural, ou seja, trocas entre duas purinas (A/G ou G/A) ou duas pirimidinas (C/T ou T/C) e são denominadas transições. As transversões, por sua vez, são substituições de uma purina por uma pirimidina ou

vice-versa. Essas alterações, algumas vezes, têm origem em erros de incorporação de bases durante a replicação do DNA; em outros casos são causadas por lesões no DNA por agentes ambientais (Dias-Salman *et al.*, 2009). Caso essas mutações aconteçam em células germinativas e sejam transmitidas às gerações seguintes, fixando-se na população em uma frequência mínima de 1%, passam a ser denominadas de polimorfismos (Vignal *et al.*, 2002).

Após a identificação do SNP, podem ser utilizadas diferentes técnicas para sua análise, como é o caso da extensão do primer (Pastinen *et al.*, 1996), pirosequenciação (Ronaghi *et al.*, 1998), espectrometria de massa MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption-Time of Flight) (Andersen e Mann, 2000), microarrays ou microchips (Schena *et al.*, 1998) e discriminação

alélica usando a metodologia de PCR em tempo real com sondas TaqMan (Livak *et al.* 1995) ou usando primers modificados na posição 3' em termocicladores convencionais (Liu *et al.*, 1997).

Pelas qualidades deste marcador e o grande número de técnicas que podem ser utilizadas, a tendência na frequência de utilização dos SNPs nas pesquisas em bovinos vem aumentando (Figura 3). Um exemplo disso consiste na utilização destes marcadores na identificação e provas de paternidade (Heaton *et al.*, 2002; Van Eenennaam *et al.*, 2007), estudos de associação com caracteres quantitativos (Page *et al.*, 2002; Stone *et al.*, 2005), traçabilidade (Capoferri *et al.*, 2005) e a confecção de mapas de ligações (Snelling *et al.*, 2005). Em outras espécies como em suínos os SNPs são usados para estudos de traçabilidade (Goffaux *et al.*, 2005) e em aves em estudos de biodiversidade (Twito *et al.*, 2007).

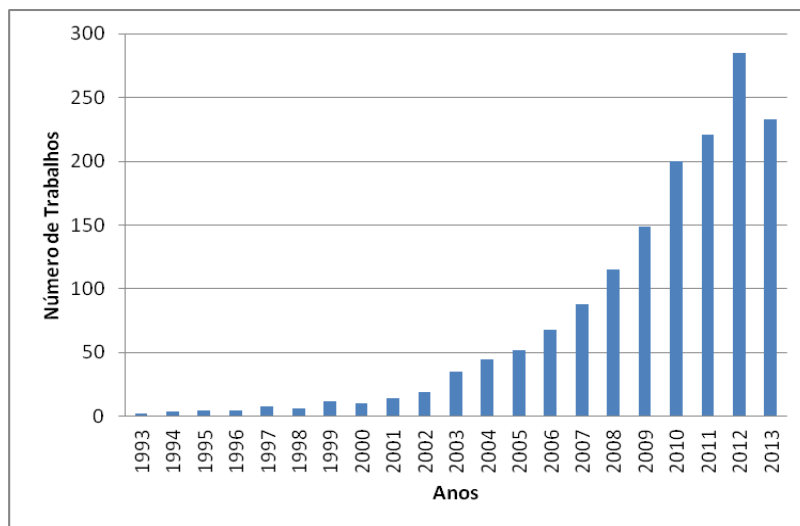


Figura 3: Frequência de pesquisas que utilizaram os SNPs para a identificação de polimorfismos genéticos em bovinos.

Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos Amplificados (AFLPs)

A técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) é uma combinação de RFLP e PCR, envolvendo quatro etapas: digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, uma de corte raro (reconhece sequências de 6pb) e outra de corte frequente (reconhece sequências de 4pb); ligação de adaptadores específicos de dupla cadeia nos extremos de restrição; amplificação seletiva de fragmentos com primers específicos e separação dos fragmentos por eletroforese em gel de poli-acrilamida. O polimorfismo obtido com a AFLP baseia-se em diferenças entre genótipos, na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial de fragmentos, possuindo assim, grande capacidade para detecção de variabilidade genética em nível de DNA (Milach, 1998).

Além de ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo, a AFLP destaca-se por seu elevado número de marcadores polimórficos analisados em um único gel, pelo poder de detecção de variabilidade genética e pela robustez do ensaio quando comparado ao ensaio RAPD, além disso, não é necessário o conhecimento da sequência de DNA. Marcadores AFLP são, portanto, dominantes (Cornide, 2002) e possuem natureza binária, não sendo possível discriminar genótipos heterozigotos dos homozigotos. Essa técnica pode ser utilizada na análise da variabilidade genética, análise de bancos de germoplasma, testes de identidade/paternidade e estudos populacionais (Ferreira, 2001). Não foi possível obter o número de pesquisas por anos que usaram o marcador AFLP para a confecção do histograma de frequência.

Polimorfismo de conformação de fita simples (SSCPs)

O marcador SSCP (Single Strand Conformations Polymorphism) permite identificar as diferenças das estruturas secundárias e terciárias dos fragmentos de DNA amplificados com diferentes sequências (estrutura primária) (Orita *et al.*, 1989), pois o DNA de fita simples forma estrutura complexa estabilizada por pontes de hidrogênio. Numa eletroforese em gel não desnaturante, a mobilidade do fragmento de DNA dependerá não somente do tamanho, como também da conformação dele, que será determinada pela sequência do DNA. Esta técnica permite a detecção de mutações em nucleotídeos únicos na cadeia de DNA sem necessidade de conhecer a sequência (Berta *et al.*, 1990) e pode identificar entre 30 e 70% de todos os polimorfismos de nucleotídeos únicos (Larsen e Nielsen, 1992).

A eletroforese é realizada em gel de poliacrilamida, e para a visualização podem ser utilizados primers marcados com radioatividade ou pode-se marcar o fragmento amplificado com nitrato de prata. Em todas as corridas têm que ser usadas amostras controles para a identificação das mutações nas amostras problemas.

O SSCP é uma metodologia simples e sensível, o que justifica o uso contínuo em as pesquisas. Em geral, tem sido usada na identificação de polimorfismos nos genes das proteínas do leite (Jann *et al.*, 2002, 2004; Ibeagha-Awemu *et al.*, 2005; Hamza *et al.*, 2010), assim como em estudos da expressão destas (Robiatille e Petitcelrc, 2000).

CONCLUSÃO

Em bovinos, são muitas as aplicações dos marcadores moleculares, podendo ser usados na identificação de indivíduos, as provas de paternidade, caracterização de populações, estudos de biodiversidade e seleção assistida. Os métodos baseados na PCR requerem uma pequena quantidade de material biológico, os resultados são obtidos em um curto intervalo de tempo e permitem a identificação de alelos individuais. Os perfis genéticos obtido com a utilização das técnicas moleculares são altamente reprodutíveis, e a falta desta característica nos marcadores RAPDs é a principal causa da redução na utilização em estudos publicados. A tendência na utilização dos marcadores moleculares é incrementar nas diferentes áreas de pesquisas, com um maior emprego daqueles que permitem a automatização do processo, como os microssatélites e os SNPs.

REFERÊNCIAS

- Acosta A., Sanz A., Ronda R., Osta R., Rodellar C., Martín-Burriel I., Gomes-Filho M.A., Uffo O., Barbosa S.B.P. & Zaragoza P. (2012) Comparación de la frecuencia alélica de las proteínas lácteas en cinco poblaciones bovinas cubanas. *Animal Genetic Resources / Recursos génétiques animales / Recursos genéticos animales* 51, 131-7.
- Acosta A., Uffo O., Sanz A., Ronda R., Osta R., Rodellar C., Martín-Burriel I. & Zaragoza P. (2013) Genetic diversity and differentiation of five Cuban cattle breeds using 30 microsatellite loci. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 130, 79-86.
- Acosta A., Vazquez S., Salazar E. & Uffo O. (2010) Estructura genética de tres poblaciones de ganado bovino autóctono cubano. *Infover Edición Especial*, 23-4.
- Alipanah M., Kalashnikova L.A. & Rodionov G.V. (2008) Kappa-Casein and PRL-RSA I genotypic frequencies in two russian cattle breeds. *Arch. Zootec.* 57, 131-8.
- Almeida C.A.S., Bonvicino C.R., Lachtermacher M., Moreira M.A.M., Olício R. & Seuánez H.N. (2001) Técnicas de avaliação da diversidade genética. In: *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais.*, pp. 268-94. Ed. Vozes, Petrópolis.
- Andersen J.S. & Mann M. (2000) Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS letters* 480, 25-31.
- Armstrong E., Postiglioni A., Martínez A., Rincón G. & Vega-Pla J.L. (2006) Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*). *Genetics and Molecular Biology* 29, 267-72.
- Bardacki F. & Skibinski D. (1994) Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity* 73, 117-23.
- Becerril C., Ferrero M., Sanz F. & Castaño A. (1999) Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis* 14, 449-56.
- Berta P., Hawkins J.B., Sinclair A.H., Taylor A., Griffiths B.L., Goodfellow P.N. & Fellous M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 348, 448-50.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314.
- Brammer S.P. (2000) Marcadores moleculares: princípios básicos e uso em programas de melhoramento genético vegetal. *Passo Fundo: Embrapa trigo*. Documento Online 3, 7.
- Canon J., Checa M.L., Carleos C., Vega-Pla J.L., Vallejo M. & Dunner S. (2000) The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics* 31, 39-48.
- Capoferri R., Galli A. & Bongioni G. (2005) Molecular traceability in meat producing animals by SNPs. In: *4th World Italian Beef Cattle Congress, Italy, April 29th—May 1st*.
- Chen Y., Hsu J., Chien C., Leu Y., Chyr C., Lin D., Lin E.-C., Chen C. & Wang P. (2012) Investigation of Genetic Relationships Among Taiwan Black Pigs and Other Pig Breeds in Taiwan Based on Microsatellite Markers. *Animal Biotechnology* 23, 278-90.

- Cornide M.T. (2002) *Marcadores moleculares: nuevos horizontes en la genética y la selección de las plantas*. La Habana, Cuba.
- Coutinho L.L., do Rosário M.F. & Jorge E.C. (2010) *Biotecnologia animal. estudos avançados* 24, 123-47.
- Delgado J.V., Martínez A.M., Acosta A.C., Álvarez L.A., Armstrong E., Camacho E., Cañon J., Cortés O., Dunner S., Landi V., Marques J.R., Martín-Burriel I., Martínez O.R., Martínez R.D., Melucci L., Muñoz J.E., Penedo M.C.T., Postiglioni A., Quiró z J., Rodellar C., Sponenberg P., Uffo O., Ulloa-Arvizu R., Vega-Pla J.L., Villalobos A., Zambrano D., Zaragoza P., Gama L.T. & Ginja C. (2011) Genetic characterization of Latin-American Creole cattle using microsatellite markers. *Anim Genet* 43, 2-10.
- Dias-Salman A.K., Giachetto P.F. & Malago W. (2009) Marcadores moleculares na bovinocultura de corte. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria* 10, 1-16.
- Dupont-Nivet M., Chevassus B., Mauger S., Haffray P. & Vandeputte M. (2010) Side effects of sexual maturation on heritability estimates in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research* 41, 878-80.
- Egito A.A., Paiva S.R., Albuquerque M.S.M., Mariante A.S., Almeida L.D., Castro S.R. & Grattapaglia D. (2007) Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten Creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. *BMC Genetics* 8, 83.
- Ferreira M.E. & Grattapaglia D. (1998) *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética Embrapa-Cenargen, Brasília, DF*
- Ferreira M.E. (2001) *Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos*. In: Garray, I.; Dias, B. (Ed.). *Conservação da Biodiversidade em ecossistemas tropicais: avanços conceituais e revisão de novas metodologias de avaliação e monitoramento*. Petrópolis: Vozes.
- Fu C., Wang H., Mei C., Wang J., Jiang B., Ma X., Wang H., Cheng G. & Zan L. (2013) SNPs at 3'-UTR of the bovine CDIPT gene associated with Qinchuan cattle meat quality traits. *Genetics and molecular research: GMR* 12, 775-82.
- Gautier M., Capitan A., Fritz S., Eggen A., Boichard D. & Druet T. (2007) Characterization of the DGAT1 K232A and Variable Number of Tandem Repeat Polymorphisms in French Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* 90, 2980-8.
- Goffaux F., China B., Dams L., Clinquart A. & Daube G. (2005) Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. *Forensic science international* 151, 239-47.
- Guimarães P.E.M. & Costa M.C.R. (2002) SNPs: Suts diferenças de um código. *Biotecnologia, Ciência e desenvolvimento* 26, 24-7.
- Guo Y., Liu X., Wang Z., Lu H. & Liu C. (2011) Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from Nhai cutlassfish (*Trichiurus nanhaiensis*). *Journal of genetics* 91, 109-12.
- Hamada H., Petrino M.C. & Takugana T. (1982) A novel repeated element with Z-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 79, 6465-9.
- Hamza A., Wang X. e Yang Z. (2010) Kappa casein gene polymorphism in Holstein Chinese cattle. *Pak. Vet. J* 30, 203-6.
- Heaton M.P., Harhay G.P., Bennett G.L., Stone R.T., Grosse W.M., Casas E., Keele J.W., Smith T.P., Chitko-McKown C.G. & Laegreid W.W. (2002) Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in US beef cattle. *Mammalian Genome* 13, 272-81.
- Herrero-Medrano J., Megens H., Crooijmans R., Abellaneda J. & Ramis G. (2012) Farm by farm analysis of microsatellite, mtDNA and SNP genotype data reveals inbreeding and crossbreeding as threats to the survival of a native Spanish pig breed. *Animal Genetics* 44, 259-66.
- Hua G.H., Chen S.L., Yu J.N., Cai K.L., Wu C.J., Li Q.L., Zhang C.Y., Liang A.X., Han L., Geng L.Y., Shen Z., Xu D.Q. & Yang L.G. (2009) Polymorphism of the growth hormone gene and its association with growth traits in Boer goat bucks. *Meat Science* 81, 391-5.
- Hunt G. & Page R., Jr. (1992) Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel types of polymorphism in the honey bee. *Theoretical and Applied Genetics* 85, 15-20.
- Hunt G.J. & Page R. (1995) Linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers. *Genetics* 139, 1371-82.
- Ibeagha-Awemu E.M., Prinzenberg E.M. & Erhardt G. (2005) High variability of milk protein genes in *Bos indicus* cattle breeds of Cameroon and Nigeria and characterization of a new *cs1*-casein promoter allele. *Journal of Dairy Research* 72, 1-9.
- Jann O., Ceriotti G., Caroli A. & Erhardt G. (2002) A new variant in exon VII of bovine β -casein gene (*CSN2*) and its distribution among European cattle breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 119, 65-8.
- Jann O.C., Ibeagha-Awemu E.M., Özbeyaz C., Zaragoza P., Williams J.L., Ajmone-Marsan P., Lenstra J.A., Moazami-Goudarzi K. & Erhardt G. (2004) Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. *Genetics Selection Evolution* 36, 1-15.
- Jeffreys A.J., Wilson V. & Thein S.L. (1985) Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.
- Kashi Y., King D. & Soller M. (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends in genetics* 13, 74-8.
- Khatami S.R., Lazebny O.E., Maksimenko V.F. & Sulimova G.E. (2005) Association of DNA Polymorphisms of the Growth Hormone and Prolactin Genes with Milk Productivity in Yaroslavl and Black-and-White Cattle. *Russian Journal of Genetics* 41, 167-73.
- Kim T., Kim K., Choi B., Yoon D., Jang G., Lee K., Chung H., Lee H., Park H. & Lee J. (2005) Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis. *Journal of Animal Science* 83, 2255-63.
- Kučerova J., Matějček A., Jandurova O.M., Sorensen P., Němcova E., Štípková M., Kottl T., Bouška J. & Frelích J. (2006) Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech J. Anim. Sci.* 51, 241-7.
- Larsen N.S. & Nielsen V.H. (1992) *Evaluation of a single strand conformational polymorphism (SSCP) with the porcine growth hormone gene. XXIII International Conference on Animal Genetic*. Interlaken, Suiza, p.68.
- Li-Juan W., Qiu-Ling L., Chang-Fa W., Hong-Mei W., Jian-Bin L., Yun-Dong G., Ming-Hai H. & Ji-Feng Z. (2009) CRS-PCR polymorphisms of the GHR gene and its relationship with milk production traits in Chinese Holstein cows. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology* 6, 215-9.
- Ling Y., Ma Y., Guan W., Cheng Y., Wang Y., Han J., Mang L., Zhao Q., He X. & Pu Y. (2011) Evaluation of the genetic

- diversity and population structure of Chinese indigenous horse breeds using 27 microsatellite markers. *Animal Genetics* 42, 56-65.
- Litt M. & Luty J.A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a nucleotide repeat within the cardiac muscle action gene. *American Journal of Human Genetics* 44, 398-401.
- Liu Q., Thorland E.C., Heit J.A. & Sommer S.S. (1997) Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Research* 7, 389-98.
- Livak K.J., Marmaro J. & Todd J.A. (1995) Towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics* 9, 341-2.
- Maj A., Pareek C.S., Klauzińska M. & Zwierzchowski L. (2005) Polymorphism of 5'-region of the bovine growth hormone receptor gene. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 122, 414-7.
- Martínez A., Gama L.T., Cañón J., Ginja C., Delgado-Bermejo J.V., Dunner S., Landi V., Martín-Burriel I., Penedo M.C.T., Rodellar C., Vega-Pla J.L., Acosta A., Álvarez L.A., Camacho E., Cortés O., Marques J.R., Martínez R., Martínez R.D., Melucci L., Martínez-Velázquez G., Muñoz J.E., Postiglioni A., Quiroz J., Sponenberg P., Uffo O., Villalobos A., Zambrano D. & Zaragoza P. (2012) Genetic Footprints of Iberian Cattle in America 500 Years after the Arrival of Columbus. *PLoS one* 7, 1-13.
- Megens H.-J., Crooijmans R., San Cristobal M., Hui X., Li N. & Groenen M. (2008) Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. *Genetics Selection Evolution* 40, 103-28.
- Mehta S., Mishra B. & Sahani M. (2006) Genetic differentiation of Indian camel (*Camelus dromedarius*) breeds using random oligonucleotide primers. *ANIMAL Genetic Resources Information* 39, 77.
- Milach S.C.K. (1998) Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: Milach, S.C.K. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: [s.n.].
- Moyzis R.K., Buckingham J.M., Cram L.S., Dani M., Deaven L.L., Jones M.D., Meyne J., Ratliff R.L. & Wu J.-R. (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 6622-6.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K. & Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 2766-70.
- Page B., Casas E., Heaton M., Cullen N., Hyndman D., Morris C., Crawford A., Wheeler T., Koohmaraie M. & Keele J. (2002) Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science* 80, 3077-85.
- Parnian M., Ghoreyshi S., Salehi A., Pashmi M. & Mola S. (2006) Polymorphism of bovine lymphocyte antigen DRB3. 2 in Holstein bulls of Iran using PCR-RFLP. *Iranian Journal of Biotechnology* 4, 197-200.
- Pastinen T., Partanen J. & Syvänen A.C. (1996) Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation. *Clinical Chemistry* 42, 1391-7.
- Postiglioni A., Rincón G., Kelly L., Llambí S., Fernández G., D'Angelo M., Gagliardi G., Trujillo J., De Bethencourt M., Guevara K., Castellano A. & Arruga M.V. (2002) Biodiversidad genética en bovinos criollos del Uruguay. análisis con marcadores moleculares. *Arch. Zootec.* 51, 195-202.
- Robiatile G. & Petitcelrc D. (2000) Expression polymorphism of kappa-casein gene in Holstein cows. *Journal of Dairy Research* 67, 107-11.
- Ronaghi M., Uhlén M. & Nyrén P. (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363-5.
- Rueda E.C., Sommer J., Scarabotti P., Markariani R. & Ortí G. (2011) Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Conservation Genetics Resources* 3, 681-4.
- SanCristobal M., Chevalet C., Haley C., Joosten R., Rattink A., Harlizius B., Groenen M., Amigues Y., Boscher M.Y. & Russell G. (2006) Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics* 37, 189-98.
- Sanders K., Bennewitz J., Reinsch N., Thaller G., Prinzenberg E.M., Kühn C. & Kalm E. (2006) Characterization of the DGAT1 Mutations and the CSN1S1 Promoter in the German Angeln Dairy Cattle Population. *Journal of Dairy Science* 89, 3164-74.
- Sartoretto L.M. & Mello-Farias P.C. (2010) Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. *Unoesc e Ciências - ACET* 1, 155-62.
- Schena M., Heller R.A., Theriault T.P., Konrad K., Lachenmeier E. & Davis R.W. (1998) Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends in biotechnology* 16, 301-6.
- Shokrollahi B., Amirinia C., Djajid N.D., Amirmozaffari N. & Ali Kamali M. (2009) Development of polymorphic microsatellite loci for Iranian river buffalo (*Bubalus bubalis*). *African Journal of Biotechnology* 8, 6750-5.
- Snelling W.M., Casas E., Stone R.T., Keele J.W., Harhay G.P., Bennett G.L. & Smith T.P. (2005) Linkage mapping bovine EST-based SNP. *BMC Genomics* 6, 74.
- Stone R., Casas E., Smith T., Keele J., Harhay G., Bennett G., Koohmaraie M., Wheeler T., Shackelford S. & Snelling W. (2005) Identification of genetic markers for fat deposition and meat tenderness on bovine chromosome 5: development of a low-density single nucleotide polymorphism map. *Journal of Animal Science* 83, 2280-8.
- Suazo A., McTiernan R. & Hall H. (1998) Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera* L.) in random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Heredity* 89, 32-6.
- Takasu M., Hiramatsu N., Tozaki T., Kakoi H., Nakagawa T., Hasegawa T., Maeda M., Murase T. & Mukoyama H. (2012) Genetic characterization of the endangered Kiso horse using 31 microsatellite DNAs. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science* 74, 161.
- Tautz D., Trick M. & Dover G. (1986) Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322, 652-6.
- Twito T., Weigend S., Blum S., Granevitze Z., Feldman M., Perl-Treves R., Lavi U. & Hillel J. (2007) Biodiversity of 20 chicken breeds assessed by SNPs located in gene regions. *Cytogenetic and Genome Research* 117, 319-26.
- Uffo O. (2003) Aplicación de los marcadores moleculares al estudio de biodiversidad del ganado bovino cubano. p. 92. Universidad Agraria de la Habana, La Habana.

Van Eenennaam A., Weaber R., Drake D., Penedo M., Quaas R., Garrick D. & Pollak E. (2007) DNA-based paternity analysis and genetic evaluation in a large, commercial cattle ranch setting. *Journal of Animal Science* 85, 3159-69.

Vignal A., Milan D., Sancristobal M. & Eggen A. (2002) A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol.* 34, 275-305

Vijh R., Tantia M., Mishra B. & Bharani-Kumar S. (2008) Genetic relationship and diversity analysis of Indian water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Animal Science* 86, 1495.

Wasko A.P. & Galetti P.M. (2002) RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia* 474, 131-7.

Watson J.D. & Crick F.H.C. (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-8.

Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M. & R. L. (1987) *Molecular biology of the Gene*. 3a ed. Editora Benjamin Cummings, San Francisco, CA, p. 732.

Weber J.L. & May P.E. (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44, 388.

Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18, 6531-5.

Williams J.G.K., Rafalski J.A. & Tingey S.V. (1993) Genetic analysis using RAPD markers. *Methods Enzymol* 218, 704-40.