

USO DE MARCADORES MOLECULARES NA BUSCA DE CARACTERÍSTICAS RELACIONADAS À PRODUÇÃO ANIMAL

Maria Marina Unanian
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília - DF

Palavras-chave: marcadores, DNA, bovinos

ABSTRACT

The objectives of this paper are to briefly present the current status of DNA technology and to discuss some of the applications of these technologies to improve selection programs.

INTRODUÇÃO

A produção de alimentos de alto valor nutritivo de origem animal, as fontes protéicas, tem sido o alvo da pecuária moderna, uma das mais eficientes indústrias tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento, que tem procurado aumentar a produção e produtividade utilizando raças ou indivíduos geneticamente superiores.

No entanto, é preciso observar que apesar dos contínuos esforços, a oferta de proteína animal continua insuficiente em função do crescimento populacional, sendo que, somente um grande número de animais e, principalmente, um sistema de criação baseado em técnicas modernas, poderá suprir esta lacuna.

Um dos fatores para o incremento da produção de alimentos é a variação genética existente entre rebanhos ou seus indivíduos. Ela constitui um importante componente na busca da eficiência no processo seletivo através de identificação de raças ou indivíduos com alta frequência de genes controladores de características desejáveis. Isto tornará possível moldar, de forma racional, os animais de acordo com a demanda.

Uma das mais adequadas tecnologias para caracterizar e quantificar o potencial de uma espécie, raça ou indivíduo, com conseqüente uso no incremento da produção de alimentos, é a tecnologia do DNA.

A tecnologia do DNA possibilita o estudo dos animais de uma população diretamente a nível de genes, muitas vezes únicos, em vez de utilizar os métodos genéticos quantitativos que estimam as variações genotípicas através das medidas fenotípicas. Esta técnica proporcionará o entendimento da estrutura e organização do genoma, assim como da diversidade dos genes controladores de processos fisiológicos (crescimento, reprodução, lactação ou ainda resistência à doenças). A tecnologia do DNA constitui uma opção moderna e econômica, pois promete acelerar os esquemas tradicionais de seleção de animais de alta produção pela redução do tempo e custo dos testes de progênie.

Além de identificar animais de alta produção, a tecnologia do DNA poderá ser usada, no futuro, para combinar o material genético com propósitos econômicos, suprimindo demandas de mercado, ou ainda, para adequar animais à meios ambientais ou sistemas de manejos específicos. Ainda deverá permitir a caracterização e conservação da variabilidade genética, e mudar a maneira de selecionar os animais.

MARCADORES MOLECULARES E A SELEÇÃO

Os **marcadores moleculares** são **proteínas ou DNA**, estes últimos também chamados de **marcadores genômicos**. Das **proteínas**, cujo conjunto constitui o **proteoma**, as isoenzimas e

os grupos sanguíneos são as mais representativas. Embora estes métodos apresentem limitações em função do número de alelos por loco (Arranz et al., 1996) continuam sendo bastante utilizados para estabelecer a distancia genética entre raças (Kustermann et al., 1996), assim como em estudos de identificação de similaridade imunogênica e de resistência a doenças.

Os marcadores de DNA, ou genômicos, são regiões cromossômicas (nos bovino 30, nos ovinos 27 e nos suínos de 19) (Figura 1). Estas regiões, freqüentemente, possuem seqüências curtas e repetitivas de DNA que apresentam várias formas (polimorfismo) e que são os marcadores anônimos (não relacionados a genes conhecidos), além dos genes candidatos. Enquanto que, os marcadores anônimos, provavelmente, não tem um efeito fisiológico, os genes candidatos possuem conhecida função fisiológica (Barendse, 1998).

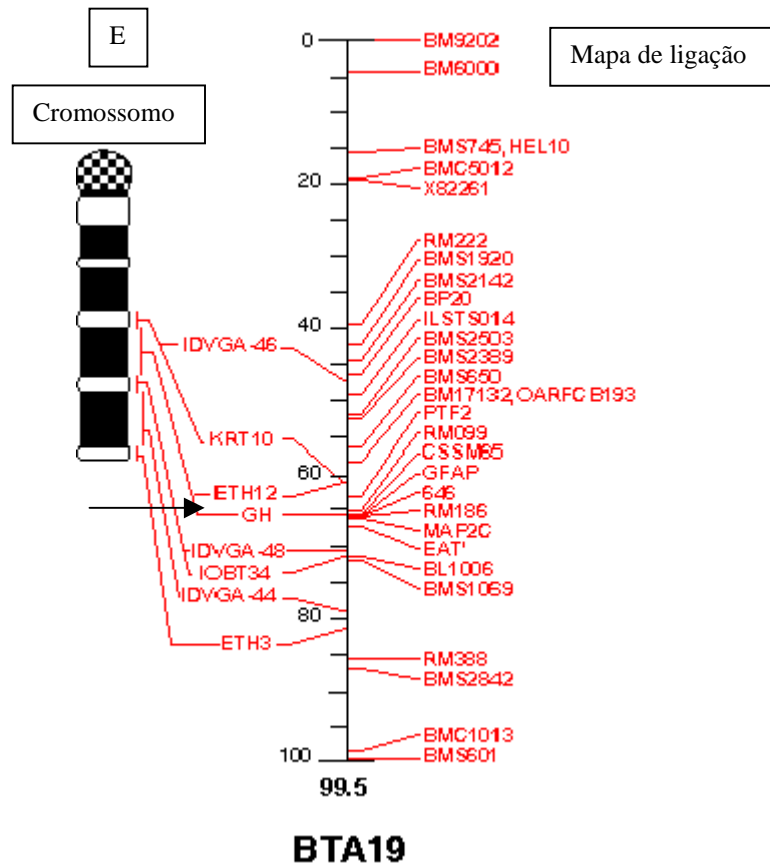


Figura 1. Representação gráfica do cromossomo bovino 19: mapa citogenético (E) e de ligação com os marcadores de DNA. A seta indica a localização do gene do hormônio de crescimento (GH) na região 19q17-qter do BTA19.

Os genes podem ser visualizados utilizando o RFLP (restriction fragment length polymorphisms), SSCP (single strand conformational polymorphisms) ou DGGE (denaturant gradient gel electrophoresis) (Barendse, 1998).

O uso dos marcadores de DNA esta na dependência do seu grau de polimorfismo ligado ou localizado perto do gene que afeta características de importância econômica. Quanto maior o número de alelos, maior a informação fornecida pelo marcador.

Dentre as primeiras técnicas que permitiram identificar as diferenças genéticas com base na estrutura do DNA foi o RFLP (Figura 2). Nos anos 80 Botstein et al. (1980) propuseram o uso desse método para identificação de polimorfismo ao nível de DNA, que proporcionou o início dos estudos de ligação genética e a construção do mapa genômico humano, e posteriormente, das demais espécies. Os marcadores RFLP tem a vantagem de serem numerosos, dialéticos, co-dominantes, e herdados de forma Mendeliana, o seu uso tendo sido adotado consideravelmente em populações segregantes, trazendo esperanças de uma aplicação prática no melhoramento animal (Beckmann & Soller, 1989). No entanto, para mapeamento dentro de populações segregantes estes marcadores tem limitações devido a dificuldade de traçar os alelos de geração a geração e, ainda, dependem do grau de consangüinidade que interfere no número de animais necessários para encontrar associação de RFLP com as características de interesse econômico ou características quantitativas (QTL, quantitative trait loci) (Rocha et al., 1992).



Figura 2. Eletroforese do produto de digestão do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH) com a enzima Alu I, em animais da raça Nelore; M indica o marcador.

A outra classe de marcadores, muito utilizada atualmente, são os microsátélites que são regiões do DNA, que contêm seqüências repetitivas simples, dispostas em tandem, herdados de forma Mendeliana, e ocorrem abundantemente no genôma dos eucariotas (Holmes, 1994; Bishop et al., 1995). A taxa de mutação de microsátélites é estimada entre 5×10^{-4} e 10^{-5} , isto é baixa, portanto permitindo o seu uso em estudos de ligação e associação à doenças genéticas e outras características qualitativas ou quantitativas (QTL), desde que exista desequilíbrio de ligação entre o marcador e o loco candidato. Estes marcadores são muito úteis, principalmente, em populações onde o número de progênies é limitado (Teale et al., 1994), pelo seu alto grau de polimorfismo, eficácia para diferenciar raças muito semelhantes, por permitirem identificar alelos raça-rebanhos específicos, e pela facilidade de processamento. Também podem ser utilizados em teste de paternidade e construção de mapas genéticos (Holmes, 1994).

Ainda são úteis no estudo da caracterização de populações, isto é identificação de caracteres quantitativos ou QTLs, os marcadores RAPD (random amplified polymorphic DNA) (Figura 3).

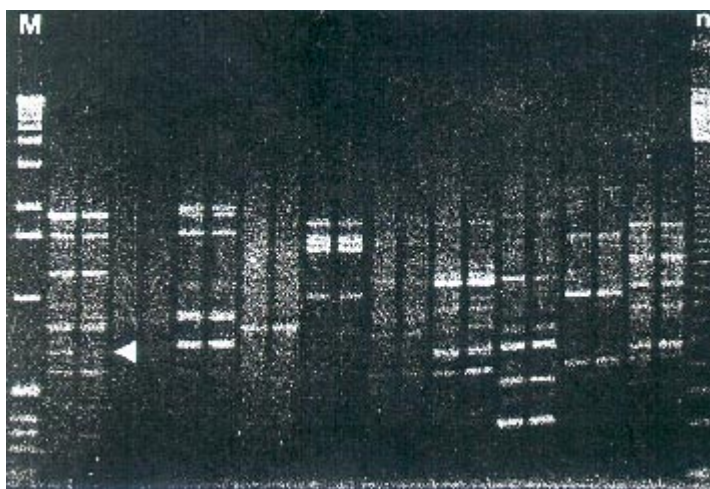


Figura 3. Padrão de amplificação RAPD em animais da raça Nelore; a seta indica a banda polimórfica encontrada entre os *pools* fenotípicos; M indica o marcador de 1 kb e n o de 123bp.

Os marcadores RAPD são usualmente dominantes porque os polimorfismos são detectados como presença ou ausência de bandas. Esses marcadores possibilitam um método rápido para a análise de populações, tendo a vantagem de não precisar de informação sobre a seqüência de DNA a ser amplificada. Entretanto, produzem resultados pouco informativos para estudos de ligação genética devido ao seu modo dominante de herança e a baixa repetibilidade da técnica (Carnwath, 1994). Este método, porém, é melhor do que a eletroforese de proteínas ou cromatografia líquida de precisão.

Além dos marcadores já citados, os AFLP e SNP são bastante utilizados em bovinos, não porém nas demais espécies animais por não trazerem as informações desejadas. Estes marcadores apresentam um grande polimorfismo e são analisados de forma rápida e a baixo custo (Barendse, 1998).

O estudo do material genético genômico a nível de DNA foi iniciado com a construção dos mapas genéticos, cujo objetivo, inicial, foi a identificação de genes controladores de características de interesse econômico (QTL) e favorecer a utilização destes na seleção assistida por marcadores (MAS, marker-assisted selection). Ainda, houve o objetivo de proporcionar informações necessárias ao estudo da evolução genética (Barendse, 1998).

O mapeamento dos genes controladores de QTL deverá elevar a freqüência de alelos desejáveis, uma vez que a seleção poderá utilizar diretamente os alelos reconhecidamente ligados ao QTL favorável. A MAS pode ser praticada para aumentar a introdução (introgressão) de alelos desejáveis de uma raça a outra dentro da mesma espécie, ou como complemento da seleção tradicional (seleção com base nos fenótipos). Deve ainda aumentar a precisão da seleção, e pode ser utilizada para selecionar animais para determinados QTL, desde a idade jovem, reduzindo com isso o intervalo entre gerações (Wilmot et al., 1992). O uso da MAS poderá ser uma opção para seleção de características de baixa herdabilidade.

O número de marcadores genéticos genômicos, graças aos esforços de vários grupos de pesquisa, tem aumentado consideravelmente desde a divulgação dos primeiros mapas genéticos em 1994 e 1995.

Em bovinos, segundo Barendse (1998), foram descritos cerca de 600 genes e 1600 marcadores de DNA (anônimos) (<http://spinal.tag.csiro.au/>). Em recente revisão foi verificado, considerando vários mapas genéticos, a existência de 2850 marcadores na espécie bovina

(<http://loco.jouy.inra.fr/>), 1774 na suína (<http://www.ri.bbscr.ac.uk/>) e mais de 1000 na ovina (<http://sol.marc.usda.gov>) (Kappes, 1999).

O programa de seleção de animais de alto valor zootécnico tem tido, em todos os países produtores de proteína animal, os mesmos objetivos, ou seja: aumento da taxa de crescimento, eficiência nutricional, composição de carcaça, produção de leite, performance reprodutiva e resistência a doenças (Lasley, 1977). Em várias espécies animais, como a bovina, suína e ovina (abordadas neste trabalho), hoje é possível identificar animais portadores de algumas das doenças genéticas, além de características de produção

O QUE OS MARCADORES JÁ IDENTIFICAM

Marcadores Associados às Características Produtivas

Em bovinos, o interesse para produzir proteína levou a procura de marcadores através dos quais, atualmente, é possível identificar animais produzindo **leite de alta qualidade**. Esta característica sendo monogênica pode ser diretamente analisada pela seqüência dos seus genes. Trata-se dos genes da kappa-caseína e β -lactoglobulina, cujo alelo B indica leite com maior porcentagem de proteína e gordura, respectivamente (Ng-Kawai-Hang et al., 1991; Bovenhuis et al., 1992).

A presença destes genes foi verificada em vários rebanhos na Europa, Canada e Estados Unidos, esta técnica sendo utilizada na seleção de animais uma vez que seus genótipos já constam de catálogos de venda de sêmen.

A característica **produção de leite** foi associada a um marcador próximo ao gene da prolactina (Cowan et al., 1989), sendo que os animais portadores transmitem a habilidade de produzir 283 kg/leite/ano a mais. Ainda, a mesma característica pode ser identificada pelo gene do hormônio de crescimento (GH) (Yao et al., 1996), e o Georges et al. (1994) encontraram evidências para o QTL controlador da produção de leite nos cromossomos 1, 6, 9, 10 e 20.

A característica **ganho de peso ao nascer** foi associada ao gene β -lactoglobulina, fator de transcrição pituitária (PIT1), ao fator de crescimento IGF-I e kapa-caseína por Moody et al. (1996). Estes autores ainda encontraram relação entre o **ganho de peso até desmame** e os genes β -lactoglobulina, IGF-I e kapa-caseína, além do hormônio de crescimento (GH), e o **ganho pós-desmame** com o GH e PIT1. A associação do GH ao ganho de peso pós-desmame em zebuínos da raça Nelore foi, também, observada por Unanian et al. (1998).

Ainda referente ao peso, Beever et al. (1990) localizaram QTLs no cromossomo 12 (BTA12) influenciando o **peso até desmame, ao desmame e 12 meses de idade**, e o Rocha et al. (1992), no BTA15 e BTA19, para o **peso ao nascer e ao desmame em função do genótipo materno**.

Um estudo que teve o objetivo de identificar QTLs responsáveis por variação no crescimento e características de carcaça foi desenvolvido pela Texas A&M University, tendo sido relacionada a **taxa de crescimento** ao gene responsável pela hipertrofia muscular (MH), a área do olho do lombo e rendimento de carcaça ao gene da miacina (MYL1) e a maciez da carne ao gene da calpastatina (Taylor et al., 1996).

Às **características de carcaça**, respectivamente os fenótipos massa muscular abundante e magra acompanhada de diminuição na ingestão de alimentos e aumento da conversão alimentar, tem sido associadas com a musculatura dupla ou hipertrofia muscular (gene mh), sendo que uma única cópia do alelo mh/+ apresentaria estes efeitos sobre a carcaça sem efeitos negativos sobre a fertilidade (Casas et al., 1998). Ainda, Taylor et al. (1998) encontraram QTLs relacionados a espessura da gordura subcutânea (QTL próximo ao GH) e os níveis de ácidos graxos saturados x insaturados da gordura subcutânea.

Em **suínos** Andersson et al. (1994) descreveram QTLs associados à taxa de crescimento e acúmulo de gordura e, em **ovinos**, Parsons et al. (1998) à qualidade da lã (gene da queratina).

Marcadores Associados às Características Reprodutivas

As características reprodutivas que já foram associadas aos marcadores são a **taxa de ovulação** (Kappes, 1996), **partos normais** (Ashwell et al., 1997). A **determinação de sexo** de embriões pela presença de DNA Y - específico já constitui um método de rotina nos rebanhos europeus e norte-americanos em função da demanda e interesse econômico (Land, 1989). Outros exemplos de efeitos de genes únicos são as **patologias espermáticas** “knobb” e defeitos de acrossôma da raça Holstein, e espermatozoides sem cabeça da raça Guernsey (Land, 1989). Ainda a **puberdade precoce**, diagnosticada pela concentração de testosterona, e o **crescimento testicular** foram associados ao gene do hormônio de crescimento (Unanian et al., 1998).

Em **ovinos** da raça Merino o gene Booroola, de efeito dominante, foi associado a uma maior fertilidade (Land, 1989).

Marcadores Associados à Doenças

As doenças que já podem ser identificadas através de marcadores são a **deficiência de agregação leucocitaria bovina** (“BLAD”) (Schuster et al., 1992) e **deficiência da uridina monofosfato sintase** (DUMPS) (Schwenger et al., 1994), ambas características dos bovinos da raça Holstein, **degeneração mieloencefalopática progressiva** em bovinos, quase exclusivamente observada em animais da raça Pardo Suiço (weaver disease) (Georges et al., 1993), **encefalite esponjosa bovina** (BSE) (Neibergs et al., 1994), **musculatura dupla** (Charlier et al., 1995), doença da urina em xarope de bordo (MSUD, maple syrup urine disease) em bovinos mochos das raças Hereford e Shorthorn (Healy e Dennis, 1994), e **hipertermia maligna** (MH) ou síndrome de estresse suíno (PSS) (Fujii et al., 1991).

Vários reprodutores bovinos elite, em programas de inseminação artificial, foram identificados, através de marcadores, como portadores destas doenças (por exemplo a BLAD). Graças a esta tecnologia que permite diagnósticos precisos, estes animais tem sido eliminados, trazendo consideráveis benefícios econômicos.

Uma doença muito importante de ponto de vista econômico dado o seu custo anual à indústria de leite (\$ 2 000 000 000 aproximadamente) é a mastite. A identificação da **mastite** tem sido feita indiretamente através de marcadores relacionados às **células somáticas** (contagem), altamente correlacionadas à incidência desta doença (Ashwell et al., 1996).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON, L.; HALEY, C.S.; ELLEGREN, H.; KNOTT, S.A.; JOHANSSON, M.; ANDERSSON, K.; ANDERSSON-EKLUND, L.; EDFORS-LILJA, I.; FREDHOLM, M.; HANSSON, I.; HAKANSSON, J.; LUNDSTROM, J. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.263, p.1771-1774, 1994.
- ARRANZ, J.J.; BAYON, Y.; SAN-PRIMITIVO, F. Comparison of protein markers and microsatellite in differentiation of cattle population. **Animal Genetics**, v.27, n.6, p.415-419, 1996.
- ASHWELL, M.S.; REXROAD Jr, C.E.; MILLER, R.H.; VanRADEN, P.M. Detection of quantitative trait loci for ease and type traits in na existing Holstein population. In: PLANT AND ANIMAL GENOME V, **Abstracts...**, 1997. <http://probe.nalusda.gov>
- ASHWELL, M.S.; REXROAD Jr, C.E.; MILLER, R.H.; VanRADEN, P.M. Mapping economic trait loci for somatic cell score in Holstein cattle using microsatellite markers and selective genotyping. **Animal Genetics**, v.27, n.4, p.235-242, 1996.

- BARENDSE, W. Recent progress in bovine gene mapping. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 8., 1998, Seoul. **Proceedings...** Seoul: Seoul National University, 1998. p.193-196, (Symposium Series, 1).
- BECKMANN, J.S.; SOLLER, M. Molecular markers in genetic improvement of farm animals. **Biotechnology**, v.5, p.573-576, 1987.
- BEEVER, J.E.; GEORGE, P.D.; FERNANDO, R.L.; STORMONT, C.J.; LEWIN, H.A. Associations between genetic markers and growth and carcass traits in a paternal half-sib family of Angus cattle. **Journal of Animal Science**, v.68, p.337-344, 1990.
- BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology**, v.43, p.61-70, 1995.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p.314-331, 1980.
- BOVENHUIS, H.; Van ARENDONK, J.A.M.; KORVER, S. Association between milk protein polymorphisms and milk production traits. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p.2549-2559, 1992.
- CARNWATH, J.W. Molecular genetic tools for animal biotechnology. **Embryo Transfer Newslettet**, v.12, n.1, p.8-15, 1994.
- 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 loco with carcass traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.76, p.468-473, 1998.
- CHARLIER, C.; COPPETIERS, W.; FARNIR, F.; GROBERT, L.; LEROY, P.L.; MICHAUX, C.; MINI, 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.788-792, 1995.
- COWAN, C.M.; DENTINE, M.R.; AX, R.L.; SCHULER, L.A. Structural variation around prolactin genes linked to quantitative traits in na elite Holstein sire family. **Theoretical Applied Genetics**, v.79, p.577-582, 1990.
- FUJII, J.; OTSU, K.; ZORZATO, F.; LEON, S.; KHANNA, V.K.; WEILLER, J.E.; O'BRIEN, J.; MacLENNAN, D.H. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. **Science**, v.253, p.448-451, 1991.
- GEORGES, M.; DIETZ, A.B.; MISHARA, A.; NIELSEN, D.; SARGEANT, L.S.; SORENSEN, A.; STEELE, M.R.; ZHAO, X.; LEIPOLD, H.; WOMACK, J.E.; LATHIROP, M. Microsatellite mapping of the gene causing weaver disease in cattle will allow the study of na associated quantitative trait loco. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.90, n.3, p.1058-1062, 1993.
- GEORGES, M.; NIELSEN, D.; MACKINNON, M.; MISHRA, A.; OKIMOTO, R.; PASQUINO, A.T.; SARGEANT, L.S.; STEELE, M.R.; ZHAO, X.; WOMACK, J.E.; HOESCHELE, I. Using a complete microsatellite map and the grand-daughter design to locate polygenes controlling milk production. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Gueph. Ontario. **Proceedings...** Guelph: University of Guelph, 1994.
- HEALY, P.J.; DENNIS, J.A. Molecular heterogeneity for bovine maple syrup urine disease. **Animal Genetics**, v.25, n.5, p.329-332, 1994.
- HOLMES, N.G. Microsatellite markers and the analysis of genrtic disease. **British Veterinary Journal**, v.150, n.5, p.411-421, 1994.
- KAPPES, S.M. Use of gene technology in animal breeding: the bovine genome mapping project – status and future aspects. In: GENE AND BIOTECHNOLOGY IN ANIMAL PRODUCTION AND MEAT PROCESSING, 1996, Lillehammer, **Proceedings...** Lillehammer: Norwegian Food Research. 1996. p.9-20.
- KAPPES, S.M. Utilization of gene mapping information in livestock animals. **Theriogenology**, v.51, p.135-147, 1999.
- KUSTERMANN, W.; MEDJUGORAC, I.; PIRCHNER, F. Evaluation of animal resources exemplified on native Braunvieh . 2nd. Communication: genetic distance between original Braunvieh and Brown Swiss and other breeds. **Zuchtungskunde**, v.68, n.2, p.109-130, 1996.
- LAND, R.B. Genetics and reproduction. In: Austin, C.R.; Short, R.V. **Reproduction in mammals: reproductive fitness**. Cambridge, University Press, 1989. p.62-102.
- LASLEY, J.F. **Genetics of livestock improvement**. 3.ed., Englewood Cliffs: Poentice-Hall, 1977.492p.

- MOODY, D.E.; POMP, D.; NEWMAN, S.; MacNEIL, M.D. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1784-1793, 1996.
- NEIBERGS, H.J.; RYAN, A.M.; WOMACK, J.E.; SPOONER, R.J.; WILLIAMS, J.L. Polymorphism analysis of the prion gene in BSE-affected and unaffected cattle. **Animal Genetics**, v.25, n.5, p.313-317, 1994.
- NG-KAWAI-HANG, K.F.; ZADWORN, D.; HAYES, J.F.; KUHNLEIN, U. Identification of kappa-casein genotype in holstein sires: a comparison between analysis of milk samples from daughters and direct analysis of semen samples from sires by polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2410-2415, 1991.
- PARSONS, Y.M.; POWELL, B.C.; PIPER, L.R.; COOPER, D.W. Wool keratin gene polymorphisms and production characters in australian merinos. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 8., 1998, Seoul. **Proceedings...** Seoul: Seoul National University, 1998. p.113-116, (Symposium Series, 1).
- ROCHA, J.L.; BAKER, J.F.; WOMACK, J.E.; SANDERS, L.A.; TAYLOR, J.F. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3360-3370, 1992.
- SCHWENGER, B.; TAMMEN, I.; AURICH, C. Detection of the homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.100, n.2, p.511-514, 1994.
- SHUSTER, D.E.; KEHRLI Jr., M.E.; GONZALES, R.; ROGERS, G.; CULLOR, J.; GILBERT, R. Molecular basis and prevalence of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) among Holstein cattle. **Journal Dairy Science**, v. 75 (Suppl. 1), p.286, 1992.
- TAYLOR, J.F.; COUTINHO, L.L.; HERRING, K.L.; GALLAGHER Jr, D.S.; BRENNEMAN, R.A.; BURNEY, N.; SANDERS, J. O.; TURNER, J.W.; SMITH, S.B.; MILLER, R.K.; SAVELL, J.W.; DAVIS, S.K. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v.29, p.194-201, 1998.
- TAYLOR, J.F.; DAVIS, S.K.; SANDERS, J. O. ; TURNER, J.W.; SAVELL, J.W.; MILLER, R.K.; SMITH, S.B. The Angleton project: 1996 update. In: BEEF IMPROVEMENT FEDERATION RESEARCH SYMPOSIUM AND ANNUAL MEETING, 28., 1996, Birmingham. **Proceedings...** Colby: Beef Improvement Federation, 1996. p.28-37.
- TEALE, A.J.; TAN, S.G.; TAN, J-h. Application of molecular genetic and reproductive technologies in the conservation of domestic animal diversity. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Gueph. Ontario. **Proceedings...** Guelph: University of Guelph, 1994. p.493-500.
- UNANIAN, M.M.; FELICIANO SILVA, A.E.D.; JOSAHKIAN, L.A.; CORDEIRO, C.M.T. Gene do hormônio de crescimento e sua associação com a característica precocidade sexual em bovinos machos da raça Nelore. In: CONGRESSO BRASILEIRO DAS RAÇAS ZEBUINAS, 3., 1998, Uberaba, **Anais...** Uberaba: ABCZ, 1998. P.402-409.
- WILMUT, I.; HALEY, C.S.; WOOLLIAMS, J.A. Impact of biotechnology on animal breeding. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.149-162, 1992.
- YAO, J.; AGGREY, S.E.; ZADWORN, D.; HAYES, J.F.; KUHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Genetics**, v.144, p.1809-1816, 1996.