

MARCADORES MOLECULARES E SUAS APLICAÇÕES NO MELHORAMENTO ANIMAL

Luciana Correia de Almeida Regitano

Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luiz, km 234, C. P. 339. CEP

13560-970 – São Carlos, SP. luciana@cnpse.embrapa.br

Introdução

Marcadores genéticos têm sido elementos fundamentais nos estudos de segregação de caracteres hereditários, na análise do comportamento de genes em populações e na reconstrução da história evolutiva de populações, entre outras aplicações.

Desde a descoberta do DNA, a genética molecular experimentou extraordinário avanço, que passou pelo desenvolvimento de métodos de análise da estrutura e da função do material genético, e de equipamentos com capacidade para análise automatizada de grande quantidade de amostras, até o desenvolvimento de métodos estatísticos e de ferramentas de informática, resultando na ciência conhecida como genômica.

Os projetos de seqüenciamento do genoma de grande número de espécies produziram volume razoável de informações, que, aliadas à evolução metodológica, permitiram o desenvolvimento de uma variedade de marcadores genéticos moleculares.

O seqüenciamento do genoma do bovino teve sua primeira versão em julho de 2005, ano em que um mapa genético com aproximadamente 4.000 marcadores foi também publicado, o que significa dizer que todos os intervalos de todos os cromossomos dos bovinos possuem pelo menos um ponto de referência. Assim como em outras espécies, tais como suínos, aves e ovinos, esse panorama vem se aprimorando com a geração maciça de dados sobre variações de seqüência resultantes da comparação de seqüências entre indivíduos.

As informações geradas pelos projetos de genoma permitiram, por exemplo, o mapeamento de mais de 1.600 mutações responsáveis por características de herança mendeliana em humanos. Em suínos e em bovinos, dezenas de doenças

hereditárias tiveram seu mecanismo molecular desvendado. Porém, o desafio de elucidar os mecanismos determinantes da variação genética de características mais complexas, entre as quais figura a maioria das características de interesse econômico dos animais domésticos, permanece (Georges & Andersson, 2003). Geralmente, essas características são controladas por muitos genes, que podem resultar em complexas interações alélicas e não alélicas, e são influenciadas pelo ambiente. Diversos estudos têm demonstrado a possibilidade de mapear genes ou blocos de genes adjacentes que influenciam uma característica quantitativa, denominados *quantitative trait loci* (QTL).

Mais recentemente, a análise de expressão em escala genômica, também denominada genética genômica ou mapeamento de transcriptoma, tem permitido a identificação de variação no padrão de expressão de conjuntos de genes expressos que, aliada à análise de marcadores, possibilita identificar regiões do genoma responsáveis pelas variações na expressão desses genes (Kadarmideen et al., 2006). Essa integração de informações estruturais e funcionais deverá permitir melhor conhecimento do controle genético das características de interesse econômico e auxiliar as decisões do melhoramento.

Marcadores moleculares

Desde a redescoberta dos princípios de Mendel, no início do século XX, o foco da atenção dos geneticistas passou a ser o gene como unidade fundamental da variação biológica. Com o desenvolvimento da genética de populações, surgiu o conceito de utilização de genes individuais como marcadores, com a finalidade de fazer inferências sobre as características de uma população, tais como o conteúdo de variabilidade, os padrões de migração, a seleção e a deriva genética.

Marcadores genéticos são caracteres de herança mendeliana simples, em que o padrão fenotípico individual pode ser experimentalmente determinado, de modo a permitir que a segregação do loco marcador responsável pelo caráter seja acompanhada. A análise de segregação requer a existência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no loco marcador.

Inicialmente, as características disponíveis para esse tipo de análise eram as mutações que produziam alterações morfológicas, como o nanismo, a ausência de asas em *Drosophila* ou a ausência de pêlos em camundongos. Entretanto, tais

mutações são pouco freqüentes nas populações naturais, em que a maior parte da variação genética é de caráter contínuo (Tanksley, 1993). Além disso, mutações que provocam alterações fenotípicas drásticas, como as citadas, geralmente comprometem a adaptação do indivíduo, o que reduz sua utilidade em estudos de comparação entre populações.

As primeiras contribuições ao estudo de marcadores genéticos em animais foram as descobertas dos polimorfismos de antígenos eritrocitários (Stormont & Cumley, 1943). A análise de marcadores foi ampliada com o desenvolvimento de técnicas de eletroforese de proteínas associadas a métodos de coloração histoquímica, que permitiram que a variação genética das proteínas passasse a ser estudada (Smithies, 1955).

Porém, com o desenvolvimento das técnicas de análise de DNA, a possibilidade de analisar variações individuais nas seqüências de DNA, independentemente de corresponderem a um peptídeo ou não, permitiu o desenvolvimento de diversos tipos de marcadores moleculares. Nesse caso, cada segmento do DNA constitui um loco e os padrões correspondentes às variações de seqüência nesse segmento constituem fenótipos moleculares. Muitos desses marcadores se utilizam da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que permitiu a automação e a simplificação das etapas de obtenção dos padrões moleculares. Nessa técnica, segmentos de DNA específicos são replicados *in vitro* e isso resulta na produção de milhares de cópias da seqüência desejada, em quantidade suficiente para permitir a pronta visualização do DNA, sem a necessidade de métodos indiretos. Além disso, os produtos da PCR podem ser utilizados na construção de sondas e de moléculas recombinantes.

Os diversos tipos de marcadores moleculares revelam variações de seqüência oriundas de diferentes mecanismos de mutação e a escolha do tipo de marcador a ser utilizado depende essencialmente da aplicação, mas deve levar em conta dificuldade técnica, custo para a obtenção do número necessário de genótipos, informatividade, distribuição pelo genoma e o tipo de interação alélica.

Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

A ocorrência de variação individual no número e no tamanho dos fragmentos formados pela digestão do DNA com uma enzima de restrição foi demonstrada por Grodzicker et al. (1975), em adenovírus. Essa variação é o resultado de mutações de

ponto, que eliminam ou criam sítios de restrição para determinada enzima, podendo também originar-se de eventos de inserção ou de deleção entre dois sítios de restrição adjacentes. Essa variação foi denominada polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, sigla derivada de *restriction fragment length polymorphism*).

O método desenvolvido para adenovírus não produziu resultados satisfatórios em eucariotos superiores pois, em virtude do tamanho do genoma dessas espécies, o número de fragmentos resultantes da digestão com enzimas de restrição é muito grande. Conseqüentemente, tentativas de separar esses fragmentos por eletroforese em gel produziram um rastro em vez de bandas discretas. A solução para esse problema surgiu com o desenvolvimento da técnica de *Southern blot* (Southern, 1975), na qual os fragmentos separados por eletroforese são transferidos para um suporte sólido, usualmente uma membrana de nitrocelulose ou de náilon, imobilizados e desnaturados. Uma vez que a molécula de DNA tem tendência a formar fitas duplas complementares, um segmento de DNA de fita simples é utilizado como sonda. A sonda é marcada com um isótopo radioativo, como o ^{32}P , ou, mais recentemente, com moléculas antigênicas que são detectadas por anticorpos associados a enzimas que catalisam reações cromogênicas ou quimiluminescentes. Como resultado, apenas os fragmentos complementares à seqüência da sonda são revelados.

As sondas utilizadas para a obtenção de marcadores do tipo RFLP podem ser ou não originadas de regiões codificadoras. O emprego de sonda de DNA complementar ao RNA mensageiro (cDNA) é o mais comum e apresenta a vantagem de não conter seqüências repetitivas. Sondagens anônimas, constituídas por fragmentos de DNA genômico ao acaso, possibilitam a rápida obtenção de novos marcadores, além de permitirem a análise de regiões não codificadoras do genoma. Porém, em virtude da abundância de DNA repetitivo no genoma dos eucariotos, quando o objetivo é a obtenção de marcadores unilocais, essas sondas devem ser submetidas a um processo de seleção, de forma a garantir que apenas aquelas que representam seqüências de cópia única sejam empregadas.

Os marcadores de RFLP são co-dominantes e muitos dos locos descritos são dialélicos, quer originados de mutações de ponto quer de mutações estruturais. Marcadores dialélicos são bastante limitados para o mapeamento genético, em conseqüência do número de cruzamentos informativos, que é função do número de

progenitores que segregam para o marcador (heterozigotos) e do número de progênies nas quais se pode atribuir um dos alelos ao progenitor. Essa relação pode ser quantificada pelo valor de conteúdo de informação polimórfica (PIC), definido por Botstein et al. (1980) como

$$PIC = \left(1 - \sum_{i=1}^{n-1} p_i^2\right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2 p_i^2 p_j^2$$

Nesta equação, o primeiro membro corresponde à proporção de indivíduos heterozigotos na população, pressupondo-se equilíbrio de Hardy-Weinberg. Essa proporção é também definida como diversidade gênica (Weir, 1996). Dessa diversidade se subtrai a proporção esperada de progênies não informativas, isto é, aquelas em que não é possível diferenciar o alelo paterno do materno. Um exemplo seria o acasalamento de dois indivíduos heterozigotos idênticos ($A_1A_2 \times A_1A_2$): em aproximadamente metade de suas progênies, as progênies heterozigotas, o alelo A_1 poderia ter origem tanto paterna quanto materna. O mesmo raciocínio seria válido para a análise da origem do alelo A_2 .

Outras desvantagens dos marcadores de RFLP são a presença de alelos raros, os quais fazem com que muitas populações apresentem padrão monomórfico, e o grau de dificuldade técnica. Como foi mencionado, a técnica original depende do desenvolvimento e da seleção de sondas com base em bibliotecas genômicas ou de cDNA e da identificação das combinações de sonda e endonuclease de restrição que revelam polimorfismos.

Para a análise de RFLP com a PCR, as extremidades da sonda que revelou o polimorfismo são seqüenciadas e as informações são utilizadas para a síntese de *primers* complementares (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Quando a posição do sítio polimórfico é conhecida, por exemplo, dentro de um gene bem caracterizado, os *primers* podem ser desenvolvidos com base em seqüências publicadas ou catalogadas em bases de dados, tais como o GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A região que contém os sítios polimórficos de restrição é amplificada e os fragmentos produzidos pela digestão do produto de amplificação podem ser então analisados em géis de agarose. A grande vantagem dos marcadores de RFLP para estudos de população é a reprodutibilidade dos padrões fenotípicos; isso permite a designação de alelos correspondentes a cada padrão de fragmentos de restrição, que podem ser facilmente

comparados entre as populações. São muito utilizados como método diagnóstico, quando, por exemplo, um loco de RFLP é associado a uma característica monogênica, tal como uma doença hereditária.

Microssatélites

Os genomas dos eucariotos abrigam grande quantidade de DNA repetitivo, classificado de acordo com o número de nucleotídeos e a complexidade da seqüência que compõe as repetições. As diferentes classes são também caracterizadas por comportamento típico quanto à distribuição no genoma e quanto ao mecanismo envolvido em suas origens (Jobse et al., 1995).

A variabilidade de seqüências repetitivas foi utilizada para a produção de perfis característicos de cada indivíduo pela técnica de *DNA fingerprinting*. Essa técnica é de grande utilidade na identificação de indivíduos ou de linhagens e em testes de paternidade. Entretanto, a aplicação em estudos de população pode ser dificultada pela elevada variação intrapopulacional, não sendo possível estabelecer um perfil característico de uma população, principalmente naquelas que possuem base genética ampla. Além disso, sua natureza multilocal não permite admitir, sem detalhada análise de segregação, que fragmentos de mesma taxa de migração sejam alelos idênticos de um mesmo loco.

Avanço importante na obtenção de marcadores hipervariáveis unilocais veio da utilização de uma classe de DNA repetitivo, as seqüências de microssatélites ou SSR (*simple sequence repeats*). Os microssatélites são caracterizados por repetições em tandem de um mono-, di-, tri- ou tetranucleotídeo, localizadas dentro de regiões de seqüência única. Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 100 pares de nucleotídeos (Tautz, 1989). Do mesmo modo que outras regiões repetitivas do genoma, a variação do número de repetições em cada loco é provavelmente resultante de erros no deslocamento da DNA-polimerase durante a replicação do DNA.

Os microssatélites poli(G) e poli(A) são os mais simples, enquanto poli(GT) são os mais freqüentes, aparecendo em aproximadamente 5 a 10 x 10⁴ locos individuais no genoma dos mamíferos. Muitos outros microssatélites foram identificados até o momento e é possível que qualquer seqüência de poucos nucleotídeos represente um microssatélite no genoma de eucariotos.

Os microssatélites podem ser amplificados de maneira específica pela técnica de PCR, utilizando *primers* que contém parte da seqüência flanqueadora. A amplificação resulta em produtos de diferente tamanho, em função do número de cópias da seqüência repetitiva delimitada pelos *primers*. A maior dificuldade técnica está relacionada à identificação dos genótipos, principalmente nos locos de microssatélites constituídos por repetições de um a dois nucleotídeos, nos quais dois alelos adjacentes diferem entre si por apenas um ou dois pares de bases, respectivamente. Há necessidade, portanto, de separar os produtos de PCR por eletroforese em gel de poliacrilamida de alta definição. A identificação dos produtos pode se valer de três estratégias:

1) Utilização de um dos *primers* marcados com isótopo radioativo. Essa marcação pode ser feita pela adição de [$\gamma^{32}\text{P}$] catalisada pela enzima T4-polinucleotideoquinase.

2) Marcação de um dos *primers* com fluoróforos e leitura em equipamento seqüenciador automático.

3) Coloração do gel por impregnação com prata.

O desenvolvimento de marcadores de microssatélites pode ser feito pela análise de seqüências contidas em bancos de dados, localizando-se aquelas que contêm SSR e delineando-se *primers* para a região que flanqueia a repetição. Outra estratégia é a seleção de fragmentos contidos em uma biblioteca genômica. A seleção dos clones que contêm microssatélites pode ser realizada pela hibridização das colônias que constituem a biblioteca com um oligonucleotídeo sintético marcado, composto pela repetição que se procura, por exemplo (dG-dT)₁₅ ou (dA-dA-dT)₁₀ para localizar as repetições de dinucleotídeos CA ou de trinucleotídeo TTA, respectivamente. Algumas metodologias utilizam o prévio enriquecimento das bibliotecas por meio de métodos que promovam a clonagem preferencial de fragmentos que contenham seqüências repetitivas.

Os clones positivos, isto é, aqueles que ficaram marcados após a hibridização, são isolados e seqüenciados para o desenvolvimento de *primers* complementares às seqüências flanqueadoras dos SSR.

Uma vez que os *primers* utilizados são complementares às seqüências de cópia única, obtém-se marcadores unilocais, altamente polimórficos e de herança

co-dominante. Esses atributos são de grande valor para a construção de mapas genéticos.

Distorções da segregação podem surgir em decorrência da “expansão” ou da “contração” do microssatélite durante a meiose. A frequência desses eventos é da ordem de 10^{-4} a 10^{-5} por loco, por gameta (Holmes, 1994). Entretanto, em presença de alterações do sistema de reparo, a taxa de mutação pode aumentar de 100 a 1.000 vezes. A instabilidade resultante tem sido associada com o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (Simpson, 1996) e com doenças hereditárias, como a síndrome do cromossomo X frágil.

Ao considerar a frequência dessas seqüências e a média do tamanho do genoma de mamífero de 3×10^9 pares de nucleotídeos, seria possível construir mapas genéticos das espécies domésticas com aproximadamente 10.000 locos de microssatélites. Em bovinos e em outras espécies domésticas, como suínos, galinhas, ovelhas, cabras e cavalos, mapas genéticos saturados foram obtidos com marcadores de microssatélites (Vignal et al., 2002).

Apesar da informatividade e da distribuição regular dos microssatélites, a padronização da designação dos alelos é complexa, uma vez que na maioria dos locos, a diferença entre alelos é de apenas dois pares de bases e as estimativas de tamanho dos fragmentos pode variar entre equipamentos e entre técnicas. Essa variação dificulta a comparação de frequências alélicas obtidas em experimentos independentes.

Polimorfismos de um nucleotídeo

Os recentes avanços dos sistemas de seqüenciamento automatizado de ácidos nucléicos têm permitido que as seqüências de diferentes indivíduos sejam comparadas. Dessa forma, variações individuais, resultantes de mutações de ponto, podem ser identificadas. Essas mutações podem ser substituições, deleções e adições de nucleotídeos, que, uma vez caracterizadas, constituem os marcadores de polimorfismos de nucleotídeos (SNPs, sigla derivada de *single nucleotide polymorphisms*). Apesar de tanto substituições quanto inserções ou deleções serem consideradas SNPs, é importante ter em mente que os dois tipos se originam de mecanismos de mutação distintos (Vignal et al., 2002). Apesar de haver muito mais possibilidades de transversões (substituições de uma purina por uma pirimidina ou

vice-versa) do que transições (substituição de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina), a razão observada entre o número de transições sobre o de transversões varia de 1,4 em humanos a 2,36 em galinhas (Vignal et al., 2002).

Os SNPs são marcadores atraentes para a análise genética, por se encontrarem em praticamente qualquer região do genoma ou em qualquer seqüência de interesse, por exemplo, em éxons de genes; isso pode ter implicações diretas nas funções da proteína correspondente. Outras características importantes são a maior estabilidade, quando comparados aos marcadores de microssatélites, além da possibilidade de automação. Essa última é uma vantagem considerável em situações que exigem a análise de grande número de indivíduos e de marcadores, como no caso da utilização de marcadores aleatórios para *scans* completos de genomas para localização de QTL.

Muitos métodos podem ser utilizados para genotipar SNPs. A maioria se baseia na obtenção e na separação de produtos de PCR que são –específicos para um alelo. Isso pode ser conseguido por meio de digestão com enzimas de restrição, de extensão de *primer*, de polimorfismo de conformação de fita simples (*Single Strand Conformation Polymorphism* - SSCP), de espectrometria de massa (*matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry*), de piroseqüenciamento e de transferência de energia ressonante (FRET); estes três últimos métodos requerem equipamentos específicos. Mais recentemente, métodos que utilizam a hibridização alelo-específica em arranjos de alta densidade surgiram como alternativa para a obtenção de SNPs em escala genômica. Apesar do elevado custo dessa metodologia, a utilização de *pools* de DNA tem sido proposta como alternativa para redução do custo em estudos de associação (Pearson et al., 2007).

A maioria dos marcadores do tipo SNPs são dialélicos, que resultam, como discutido anteriormente, em pouca informação por loco. Do ponto de vista de mapeamento, cinco marcadores desse tipo fornecem aproximadamente a mesma informação que um loco de microssatélite, de tal forma que os mapas de SNPs devem ter densidade maior do que os de microssatélites para se obter o mesmo poder de detecção de QTL. Porém, a densidade necessária ao mapeamento fino de QTL só pode ser obtida com esse tipo de marcador (Vignal et al., 2002).

Mapeamento de QTL

O mapeamento de QTL, ou seja, a detecção, a localização e a estimativa do efeito de regiões do genoma associadas a uma característica quantitativa requer grande número de animais para os quais estejam disponíveis dados de avaliação do fenótipo de interesse. O número de indivíduos necessários depende da magnitude do efeito que se deseja identificar, da herdabilidade do caráter e da estrutura da população, entre outros fatores, porém, esse número é freqüentemente da ordem de milhares. Esse requisito é particularmente restritivo em animais de grande porte, nos quais o custo de produção e de manutenção de grandes populações experimentais é elevado.

As populações comerciais têm sido úteis para o mapeamento de QTL em bovinos de leite, dos quais grandes progênies de touro, resultantes do uso intensivo de inseminação artificial, podem ser encontradas. Georges & Andersson (2003) apontaram como vantagem para o mapeamento de QTL em gado leiteiro a intensa anotação de dados referentes a avaliações fenotípicas, tais como medidas de qualidade do leite, avaliações da saúde do animal, avaliações morfométricas e informações de *pedigree* e de manejo, principalmente nos países mais desenvolvidos.

Essa situação entretanto não se aplica a bovinos de corte, cujas famílias são menores e cuja quantidade de características fenotípicas avaliadas é restrita. Além disso, características de difícil avaliação, tais como taxa de ovulação, maciez da carne e resistência a doenças, raramente são consideradas em programas de melhoramento, requerendo a utilização de populações experimentais, as quais devem ser obtidas mediante a utilização de algum delineamento genético, tais como F2, retrocruzamento ou famílias de meios-irmãos. Os resultados mais promissores de identificação de marcadores associados a caracteres de interesse econômico são os relatados com suínos, de que 1.675 QTL foram descritos em mais de 100 publicações (Rothschild et al., 2007) e algumas mutações em genes, ou em desequilíbrio de ligação com a mutação causal, têm sido regularmente utilizadas pela indústria de melhoramento de suínos.

O mapeamento de QTL em espécies domésticas beneficia-se do reduzido tamanho efetivo das populações, pois a maioria das raças são formadas a partir de pequeno número de animais fundadores. Esse fato leva à redução da complexidade

das características dentro de raças, uma vez que poucos alelos estão representados na população.

A utilização de pequeno número de indivíduos selecionados para dar origem à próxima geração leva ao aumento de endogamia e ao conseqüente aumento da probabilidade de a progênie receber dos parentais regiões do genoma que são idênticas por descendência, que podem conter alelos recessivos deletérios, ou seja, que causam doenças, malformações ou anomalias hereditárias. A utilização de marcadores como método diagnóstico para eliminar animais portadores de alelos deletérios está entre as mais promissoras aplicações dessa tecnologia. Como exemplo, podemos citar a mutação responsável pela síndrome do estresse dos suínos (Rothschild et al., 2007), a mutação no gene que codifica a proteína CD18, responsável pela síndrome de deficiência de adesão dos leucócitos, que afeta bovinos da raça Holandesa (Shuster et al., 1992), e a recente descrição de mutações independentes no gene LRP4 (*lipoprotein receptor-related protein 4*) relacionadas à sindactilia dos bovinos (Drogemuller et al., 2007).

Seleção assistida por marcadores

A seleção assistida por marcadores (MAS) tem por objetivo aumentar a acurácia da seleção. Porém, quando se utiliza MAS, apenas alguns dos genes que contribuem para a variação do caráter selecionado são avaliados. Assim, a utilização de informação de genótipo para o marcador, sem considerar as avaliações de diferença esperada na progênie, que fornecem uma visão do componente quantitativo não explicado pelo marcador, pode conduzir à rápida fixação do alelo de QTL selecionado e à maior perda de variabilidade durante o processo de seleção. A MAS deve ser realizada concomitantemente à seleção tradicional, pois dar grande ênfase a somente um marcador poderá ocasionar perda da variabilidade em outros locos e restringir a seleção no longo prazo, resultar em efeito carona ou na fixação de alelos desfavoráveis por deriva na porção do genoma não associada ao marcador. Segundo Van Eenennaam (2007), os benefícios da MAS são maiores nas características que têm baixa herdabilidade, nas que são difíceis ou caras para mensurar e nas que não podem ser medidas antes que o animal contribua para dar origem à próxima geração. Outras características que podem ser beneficentemente selecionadas com MAS são produção de leite, habilidade materna, resistência a

doenças, rendimento de carcaça, desempenho de crescimento, fertilidade, eficiência reprodutiva e características limitadas pelo sexo.

Os maiores avanços na área de MAS deverão ser experimentados quando as novas tecnologias de análise de marcadores, tais como microarranjos de DNA, que permitem a investigação simultânea de grande número de marcadores, chegarem a um custo compatível com a aplicação. Nesse caso, a seleção será feita com base no genoma do animal e não mais em informações pontuais de poucos genes.

Aliadas às técnicas de análise do genoma funcional e da genômica comparada, as informações sobre QTL deverão rapidamente conduzir à descoberta de genes e de mutações causais, aquelas que determinam a variação fenotípica. A compreensão dos mecanismos biológicos e do controle genético das características de interesse será um campo aberto para a manipulação da expressão de genes, quer via transgênese, quer via técnicas de expressão transitória, tais como o RNA de interferência.

Caracterização de recursos genéticos

Uma das premissas fundamentais do melhoramento é a existência de variabilidade genética nas características a serem selecionadas. O processo de melhoramento leva à fixação de caracteres e à perda de variabilidade, quer intencionalmente, por meio de seleção, quer acidentalmente, por meio de deriva genética resultante do reduzido tamanho efetivo das populações. A conservação de recursos genéticos animais tem por objetivo manter os repositórios de alelos e de combinações alélicas que podem vir a suprir necessidades do melhoramento animal, inclusive para nichos pouco privilegiados pelos objetivos da indústria agropecuária, como genes relacionados à adaptação a condições tropicais e de baixo investimento tecnológico (INTERNATIONAL, 2007).

Entretanto, quando se trata de animais domésticos, a manutenção de recursos genéticos requer extensas áreas e representa custo razoável. A utilização de marcadores moleculares permite o monitoramento da variabilidade genética e a estimativa de parâmetros populacionais, tais como o coeficiente de endogamia. Nas populações em que não há registro genealógico, é possível identificar a paternidade, apesar de esse processo requerer a análise de grande número de marcadores ou de padrões de *DNA-fingerprints*.

A análise de diversidade intrapopulacional pode também ser utilizada como método para identificar os acessos que constituem a menor coleção em que está representada a máxima variabilidade genética de uma unidade de preservação (*core collection*). Esse conceito tem sido amplamente utilizado em recursos genéticos vegetais e foi recentemente proposto para o manejo de coleções de animais domésticos (Egito, 2007).

Considerações finais

Os avanços metodológicos dos últimos 50 anos permitiram o desenvolvimento de um número ilimitado de marcadores moleculares. A escolha do marcador adequado a cada situação depende principalmente do objetivo do trabalho. Para construção de mapas genéticos e para mapeamento de QTL, marcadores altamente informativos podem ser melhores, porém, quando se deseja a construção de mapas de alta densidade, mesmo que menos informativos, os SNPs são mais adequados, pois se apresentam em maior frequência nos genomas. Para fins de comparação de populações, além do conteúdo de informação polimórfica, a reprodutibilidade dos fenótipos moleculares é um dos fatores a ser considerado.

Referências bibliográficas

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, n. 3, p. 314-331, 1980.

DROGEMULLER, C.; LEEB, T.; HARLIZIUS, B.; TAMMEN, I.; DISTL, O.; HOLTERSHINKEN, M.; GENTILE, A.; DUCHESNE, A.; EGGEN, A. Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (*LRP4*). **BMC Genetics**, v. 8, p. 5, 2007.

EGITO, A. A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microssatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação**. 2007. 246f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.

GEORGES, M.; ANDERSSON, L. Positional identification of structural and regulatory quantitative trait nucleotides in domestic animal species. In: COLD SPRING

HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY, 68., 2003. **Anais...** Cold Spring: Harbor Laboratory Press, p. 179-188, 2003.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. **Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology**, v. 39, v. 1, p. 439-446, 1975.

HOLMES, N. G. Microsatellite markers and the analysis of genetic disease. **British Veterinary Journal**, v. 150, n. 5, p. 411-421, 1994.

INTERNATIONAL LIVESTOCK RESEARCH INSTITUTE. **Improving utilization of farm animal genetic resources**. Disponível em: <<http://www.ilri.org/research/Content.asp?SID=15&CCID=41>>. Acesso em: 05 de junho 2007.

JOBSE, C.; BUNTJER, J. B.; HAAGSMA, N.; BREUKELMAN, H. J.; BEINTEMA, J. J.; LENSTRA, J. A. Evolution and recombination of bovine DNA repeats. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, n. 3, p. 277-283, 1995.

KADARMIDEEN, H. N.; ROHR, P. von; JANSS, L. L. G. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 6, p. 548-564, 2006.

PEARSON, J. V.; HUENTELMAN, M. J.; HALPERIN, R. F.; TEMBE, W. D.; MELQUIST, S.; HOMER, N.; BRUN, M.; SZELINGER, S.; COON, K. D.; ZISMANN, V. L.; WEBSTER, J. A.; BEACH, T.; SANDO, S. B.; AASLY, J. O.; HEUN, R.; JESSEN, F.; KOLSCH, H.; TSOLAKI, M.; DANIILIDOU, M.; REIMAN, E. M.; PAPASSOTIROPOULOS, A.; HUTTON, M. L.; STEPHAN, D. A.; CRAIG, D. W. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 1, p. 126-139, 2007.

ROTHSCHILD, M. F.; HU, Z. L.; JIANG, Z. Advances in QTL mapping in pigs. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 192-197, 2007.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI Jr, M. E.; ACKERMANN, M. R.; GILBERT, O. R. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 19, p. 9225-9229, 1992.

SIMPSON, A. J. G. Mini review: microsatellite instability in human cancer. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, p. 171-174, 1996.

SMITHIES, O. Zone electrophoresis in starch gel: group variation in the serum proteins of normal human adults. **Biochemical Journal**, v. 61, p. 629-641, 1955.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

STORMONT, C.; CUMLEY, R. W. Cellular antigens in cattle blood. **Journal Heredity**, v. 34, p. 35-41, 1943.

TANKSLEY, S. D. Mapping polygenes. **Annual Review of Genetics**, v. 27, p. 205-233, 1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.

VAN EENENNAAM, A. Marker assisted selection in beef cattle. Disponível em: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Marker_Assisted_Selection_in_Beef_Cattle.pdf>. Acesso em: 05 de junho 2007.

WEIR, B. S. **Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data**. 2. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996. 445 p.